

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

DENEYSEL HİPOTİROİDİZM OLUŞTURULAN ERİŞKİN
SIÇANLARIN HİPOKAMPÜSÜNDE OTOFAJİNİN
ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Ural Kemal KAVRAAL

Danışman
Prof.Dr. Narin LİMAN

Doktora Tezi

Mart 2021
KAYSERİ

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

DENEYSEL HİPOTİROİDİZM OLUŞTURULAN ERİŞKİN
SIÇANLARIN HİPOKAMPÜSÜNDE OTOFAJİNİN
ARAŞTIRILMASI
(Doktora Tezi)

Hazırlayan
Ural Kemal KAVRAAL

Danışman
Prof.Dr. Narin LİMAN

Bu Tez Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından K-2019-8789 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Mart 2021
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı : Ural Kemal KAVRAAL

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Deneyisel Hipotiroidizm Oluşturulan Erişkin Sıçanların Hipokampüsünde Otofajinin Araştırılması” adlı Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
Ural Kemal KAVRAAL

Danışman
Prof. Dr. Narin LİMAN

Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Feyzullah BEYAZ

Prof. Dr. Narin LİMAN danışmanlığında Ural Kemal KAVRAAL tarafından hazırlanan “Deneyisel Hipotiroidizm Oluşturulan Erişkin Sıçanların Hipokampüsünde Otofajinin Araştırılması” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

11.12.2019

JÜRİ

İmza

Danışman: Prof. Dr. Narin LİMAN.....

(Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı)

Üye : Prof. Dr.

(..... Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı)

Üye : Prof. Dr.

(..... Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı)

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

..... /...../

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu tez projesinin planlanması, yürütülmesi ve yazılması hususlarında göstermiş olduğu destek ve yardımlarından ötürü tez danışmanım Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Narin LİMAN'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca TDK-2019-8789 proje kodu ile tez projemi destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi ve Birim Personeline, tez çalışmamın deney hayvanı protokolünün tüm aşamalarında yardımcı olan Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Aykut GRAM'a, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. Öğretim Üyesi Meryem Şentürk'e, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Veteriner Hekim Kaan BOZBEK'E çok teşekkür ederim. Ayrıca vermiş oldukları derslerle Histoloji ve Embriyoloji Bilim alanında temel bilgi birikimimin oluşturulmasında emeği olan Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Güner KÜÇÜK BAYRAM'a, Prof. Dr. Feyzullah BEYAZ'a ve Doç. Dr. Emel ALAN'a çok teşekkür ederim. Çalışmalarım süresince birçok fedakârlıklar gösterip, yaşamımın her döneminde bana duydukları güven için aileme en derin duygularla teşekkür ederim.

Ural Kemal KAVRAAL

Kayseri, Mart 2021

DENEYSEL HİPOTİROİDİZM OLUŞTURULAN ERİŞKİN SIÇANLARIN HİPOKAMPÜSÜNDE OTOFAJİNİN ARAŞTIRILMASI

Ural Kemal KAVRAAL

Erciyes Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi, Mart 2021

Danışman: Prof. Dr. Narin LİMAN

KISA ÖZET

Hipotiroidizm hipoglisemiye neden olan çeşitli hormonal, biyokimyasal ve sinir sistemi anormallikleriyle bağlantılıdır. Sinir sistemi dışındaki dokularda glikoz eksikliğine bağlı olarak AMP/ATP oranında artışa neden olur. Bu oranın yükselmesi AMPK'nın fosforile olarak aktifleşmesine neden olur. Aktifleşen AMPK ise çeşitli yollarla otofajiyi indükler. Hipotiroidizmin hipokampüste AMPK aktivitesini değiştirip değiştirmediği ve hipotiroidizmin otofajiyi indükleyip indüklediği bilinmemektedir.

Çalışmada hipotiroidizm oluşturulan erişkin sıçan modelinde, tiroid hormonu yoksunluğunun hipokampus dokusunda otofaji ile ilişkili çeşitli proteinlerin ekspresyon düzeylerini değiştirip değiştirmediğinin; eğer değiştiriyorsa bu değişimin otofajinin indüklenmesi veya baskılanması yönünde olup olmadığının ve otofajinin indüklenmesinde AMPK sinyal yolağının rol oynayıp oynamadığının araştırılması hedeflendi.

Çalışmada 48 adet Wistar albino sıçan kullanıldı. Sıçan rastgele kontrol, hipotiroidili ve Levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili grup olmak üzere 3 gruba, her grupta 16 adet sıçan bulunacak şekilde ayrıldı. Kontrol grubundaki sıçanlara 1 ml serum fizyolojik ve hipotiroidi grubundaki sıçanlara 28 gün boyunca 6-n-propil tiourasil (PTU) 10 mg/kg/gün dozunda intraperitoneal olarak enjekte edildi. Levotiroksin ile tedavi edilmiş gruba ise hipotiroidi oluşturulmasının ardından 15 gün boyunca 5 µg levotiroksin 1 ml NaCl içinde sulandırılarak intraperitoneal olarak uygulandı.

Çalışmanın biyokimyasal bulguları PTU'nun primer hipotiroidizmi oluşturabildiğini, ancak hipotiroidili sıçanlarda glikoz seviyesini anlamlı olarak düşürmesine rağmen hipoglisemi oluşturmadığını gösterdi. İmmünohistokimyasal sonuçlar sıçan hipokampusünün kornu ammonis (CA) ve dentat girus (DG) bölgelerindeki nöronlarda AMPK'nın çekirdeklerde, p-AMPK α 1/2-Thr183/Thr172'nin ise genellikle sitoplazmada yerleştiğini ve bazı nöronlarda çekirdek lokalizasyonu sergilediğini ortaya koydu. ULK1 ve p-ULK1-S556'nın genellikle sitoplazmik ekspresyon sergilediği, ancak bazı nöronlarda ULK1'in intranükleer ekspresyon gösterdiği tespit edildi. mTOR'un CA bölgesindeki piramidal hücrelerin sitoplazmalarında orta yoğunlukta eksprese olduğu, dentat girüstaki granüler hücrelerde ise daha zayıf ekspresyon sergilediği, p-mTOR-Se2448'in ise nükleer immünreaksiyon gösterdiği belirlendi. TSC2'nin CA bölgesinde piramidal nöronların sitoplazmalarında orta yoğunlukta, DG'de ise daha zayıf ekspresyon sergilediği gözlemlendi. p-TSC2-Thr1462 için, granüler sitoplazmik boyanmanın TSC2'ye göre daha yoğun olduğu ve dentat girus bölgesinde de p-TSC2-Thr1462'nin eksprese olduğu saptandı. Beclin1 ve p62'nin ise nöronlarda sitoplazmik immünreaksiyon sergilediği görüldü. MAPLC3 α/β ve MAPLC3A'nın CA ve DG bölgesindeki nöronlarda kuvvetli ve homojen bir boyanma gösterdiği dikkati çekti. Western blot (WB) analiz sonuçları hipotiroidili grupta katalitik AMPK α 1/2'nin aktifleşmediğini, bu nedenle mTOR'un aktifleşmesini baskılamadığını, aktifleşen mTOR'un AMPK'nın ULK1 ile etkileşmesini önlediği ve dolayısı ile otofajiyi inhibe ettiğini gösterdi. Levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidili grupta ise WB sonuçları katalitik AMPK'nın aktifleştiğini, bu nedenle mTOR'un aktifleşmediğini ortaya koydu. Ancak bu grupta hem ULK1 ile p-ULK1-S556 ve hem de TSC2 ile p-TSC2-Thr1462 ekspresyon düzeylerinin diğer gruplara göre düşük bulundu. Çalışma gruplarında Beclin 1, LC3 ve p62'nin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında farklılık göstermediği tespit edildi.

Sonuç olarak bu bulgular PTU ile indüklenmiş hipotiroidizmin otofaji ile ilişkili çeşitli proteinlerin ekspresyonlarını AMPK sinyal yolağı üzerinden önemli ölçüde değiştirmediğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Deneysel Hipotiroidizm, Hipokampus, Otofaji, Sıçan

INVESTIGATION OF AUTOPHAGY IN THE HIPPOCAMPUS OF ADULT RATS WITH EXPERIMENTAL HYPOTHYROIDISM

Erciyes University, Graduate School of Healthy Sciences

Department of Histology and Embryology

Ph.D. Thesis,

March 2021

Supervisor: Prof. Dr. Narin LİMAN

ABSTRACT

Hypothyroidism is associated with a variety of hormonal, biochemical, and nervous system abnormalities that cause hypoglycemia. It causes an increase in AMP / ATP ratio due to glucose deficiency in tissues other than the nervous system. Increasing this ratio causes AMPK to be activated as phosphorylated. Activated AMPK induces autophagy in various ways. Whether hypothyroidism alters AMPK activity in the hippocampus and whether hypothyroidism induces autophagy is unknown.

In this research, it was aimed to investigate whether thyroid hormone deprivation changes the expression levels of various autophagy-related proteins in the hippocampus tissue in an adult rat model with hypothyroidism, if it does, whether this change is in the direction of inducing or suppressing autophagy and if the AMPK signaling pathway plays a role in inducing autophagy.

In the study, 48 Wistar albino male rats were used. The rats were randomly divided into 3 groups as control, hypothyroid and Levothyroxine-treated hypothyroid group, with 16 rats in each group. The rats in the control group were injected with 1 ml of saline. 6-n-propyl thiouracil (PTU) at a dose of 10 mg/kg/day intraperitoneally injected to the rats in the hypothyroid group for 28 days. For the rats in the Levothyroxine-treated group, after inducing hypothyroidism, 5 µg of levothyroxine was diluted in 1 ml of NaCl and intraperitoneally administered for 15 days.

The biochemical findings of the study indicated that PTU could cause primary hypothyroidism, but although it significantly decreased glucose level in hypothyroid rats, it did not cause hypoglycemia. Immunohistochemical results revealed that AMPK

is located in the nuclei of neurons in the corn ammonis (CA) and dentate gyrus (DG) regions of the rat hippocampus, whereas p-AMPK α 1 / 2-Thr183 / Thr172 is located in the cytoplasm and exhibits nuclear localization in some neurons. It was observed that ULK1 and p-ULK1-S556 generally exhibited cytoplasmic expression, but intranuclear expression of ULK1 in some neurons. It was determined that mTOR was expressed at moderate immunostaining intensity in the cytoplasm of pyramidal cells in the CA region, while the granular cells in the DG showed a weaker expression, and p-mTOR-Se2448 displayed nuclear immunoreaction. It was observed that TSC2 exhibited moderate immunostaining intensity in the cytoplasm of pyramidal neurons in the CA region and weaker expression in the DG. It was detected that granular cytoplasmic immunostaining for p-TSC2-Thr1462 was more intense than that of TSC2, and p-TSC2-Thr1462 was also expressed in the DG. Beclin1 and p62 were observed to exhibit cytoplasmic immunoreactions in neurons. It was noticed that MAPLC3 α / β and MAPLC3A showed a strong and homogeneous immunostaining in the neurons in the CA and DG regions. The Western blot (WB) analysis results showed that the catalytic AMPK α 1/2 was not activated in the hypothyroid group, therefore it did not suppress the activation of mTOR, the activated mTOR prevented AMPK from interacting with ULK1 and thus inhibited autophagy. In the hypothyroid group treated with Levothyroxine, WB results also revealed that catalytic AMPK was activated, therefore mTOR could not be activated. However, expression levels of both ULK1 and p-ULK1-S556 and TSC2 and p-TSC2-Thr1462 were found to be lower in this group compared to the other groups. The expression levels of Beclin 1, LC3 and p62 in the study groups did not differ between the groups.

In conclusion, these findings show that PTU-induced hypothyroidism does not significantly alter the expression of various autophagy-related proteins through the AMPK signaling pathway.

Keywords: Autophagy, Experimental Hypothyroidism, Hippocampus, Rat

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
TEŞEKKÜR	iv
KISA ÖZET	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	xi
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tiroid Bezi	4
2.1.1. Tiroid Bezinin Embriyolojik Gelişimi	4
2.1.2. Tiroid Bezinin Anatomik ve Histolojik Yapısı	5
2.1.3. Tiroid Hormonlarının sentez ve salgılanmasının düzenlenmesi	7
2.1.4. Tiroid Hormon Sentezi.....	8
2.1.5. Tiroid Hormonların etki mekanizmaları	9
2.1.6. Tiroid Bezi Bozuklukları.....	13
2.2. Tiroid bezi hormonları ve Sinir sistemi	15
2.2.1. Hipokampal oluşum	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM	37
3.1. Deney hayvanları ve deney gruplarının oluşturulması.....	37
3.2. Kan glikoz düzeylerinin ölçümü	38
3.3. Plazma T3 ve T4 düzeylerinin ölçümü	38
3.4. Doku örneklerinin alınması.....	38
3.4.1. Histoloji, İmmünohistokimya ve İmmünfloresan teknikleri için doku örneklerinin alınması.....	39
3.4.2. Western blot analizi için doku örneklerinin alınması	41
3.5. İmmünohistokimyasal ve İmmünofloresan boyamaların semikantitatif değerlendirilmesi.....	44
3.6. Kantitatif değerlendirmeler ve istatistiksel analiz.....	45

4. BULGULAR	47
4.1. Tiroid bezindeki morfolojik değişiklikler	47
4.2. Kan glikoz değerleri	50
4.3. Canlı ağırlık düzeyleri	51
4.4. Tiroid stimule edici hormon (TSH), serbest T3 (sT3) ve serbest T4 (sT4) hormon düzeyleri	53
4.5. Otofaji ile ilişkili proteinlerin ekspresyonları ve immünlokalizasyonları	55
4.5.2. ULK1 ve p-ULK1 ekspresyonu ve immünlokalizasyonu	69
4.5.3. mTOR ve p-mTOR ekspresyonu ve immünlokalizasyonu	77
4.5.4. TSC2 ve p-TSC2 immünlokalizasyonu ve ekspresyonu	87
4.5.5. Beclin 1 ve p-62 ekspresyonu ve immünlokalizasyonu	95
4.5.6. Otofazom belirteçi MAPLC3'ün immünlokalizasyonu ve ekspresyonu ..	102
5. TARTIşMA VE SONUÇ	111
6. KAYNAKLAR	133

EKLER

ÖZGEÇMİş

KISALTMALAR VE SİMGELER

AD	Alzheimer hastalığı
AMP	Adenozin monofosfat
AMPK	Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz
APUD	Ön maddelerini alan ve dekarboksile eden hücreler
ATF	Activating Transcription Factor
ATP	Adenozin trifosfat
BSA	Bovine serum albumin
CA	Kornu ammonis
CaMKK	Ca ²⁺ /kalmodulin-bağımlı kinaz kinaz β
DAG	Diaçilgliserol
DAPK	Ölümle ilişkili protein kinaz
DG	Dentat girus
DIO	Deiyodinaz
DIT	Diiyodotirozin
ECL	enhanced chemiluminescence
ER	endoplazmik retikulum
fEPSP	Alan uyarıcı post-sinaptik potansiyelleri
FSH	Folikül uyarıcı hormon
GPCR	G-protein bağlı reseptör
hCG	İnsan koryonik gonadotropin
HD	Huntington hastalığı
IP3	İnositol trifosfat
LC3	hafif zincir 3
LH	Luteinleştirici hormon
LKB	Liver kinaz B
LTP	Uzun dönemli potansiyasyon
MAPK	mitojenle etkileşen protein kinaz
MIT	Monoiyodotirozin
mTOR	Rapamisin'in memeli hedefi
mTORC	apamisin'in memeli hedefi kompleks
NIS	Sodyum iyodür simporter

NMDA	N-Metil-D-aspartat
NPC	nöronal kök hücresi öncülleri
PAS	periodik asit Schiff
PBS	Fosfat buffer salin
PD	Parkinson hastalığı
PE	fosfatidiletanolamin
PI3K	Fosfatidilinositol 3-kinaz'
PRL	Prolaktin
PTU	Propiltiourasil
RHOA	Ras homolog family member A
ROS	Reaktif oksijen türleri
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid
SGA	Subgranüler alan
SVA	Subventriküler alan
T3	Triiyodotironin
T4	Tiroidksin
TAK	β -aktive kinaz
TBS	Tris-Buffered Saline
TGB	Triglobulin
TH	Tiroid hormonu
TPO	Tiroidperoksidaz
TR	Tiroid reseptörü
TRE	Tiroid response element
TRH	Tirotropin salgılatıcı hormon
TRHR	Tirotropin salgılatıcı hormon reseptörü
TSC2	Tuberoz skleroz kompleks 2
TSH	Tiroid stimüle edici hormon
TSHR	Tiroid hormon reseptörü
UCP1	Uncoupling protein
ULK	Unc-51 benzeri otofajiyi aktive eden kinaz

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Tablo 2.1. Tiroid hormonu T3 tarafından pozitif ve negatif yönde regüle edilen bazı genler.....	11
Tablo 3.1 . Antikor listesi.....	46
Tablo 4.1. Kontrol, hipotiroidili ve levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili sıçanların hipokampusünde, otofajiyle ilişkili proteinlerin lokalizasyonları ve boyanma yoğunlukları	56
 Şekil 2.2.1. Sıçan hipokampusünün genel yapısı (Yu ve Song, 2014)’den alınmıştır. CA: Kornu ammonis, DG: Dentat girus, EC: Entorinal korteks.....	18
Şekil 2.2.2. Kemirgen dentat girusu (DG).	22
Şekil 2.2.3. Rat hipokampus diyagramı. Kesikli çizgi CA1’i CA2’den ayırır; SO: Stratum oriens, SP: Stratum pyramidale, SR: Stratum radiatum, SML: Stratum molekulare, ML: Dentat girusun moleküler katmanı, GL: Granüler hücre katmanı, H: Dentat girus katmanı, SL: stratum lucidum (Kaynak: Jiang ve Swann, 1997).	24
Şekil 2.2.4. Sıçanlarda hipokampusün histolojik görünümü. Ok: Dentat girus, M: Moleküler katman, G: Granüler katman, P: Pleomorfik katman, S: Supra-piramidal katman, I: Infra-piramidal katman, CA: Kornu ammonis. Krezil Violet Asetat boyaması.	25
Şekil 4.1.1. Kontrol (A), hipotiroidili (B) ve Levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidili (C) sıçanların tiroid bezlerinin (ok) makroskopik görüntüsü.	47
Şekil 4.1.2. Kontrol grubu sıçanlardan alınan tiroid bezinin histolojik görünümü. K: Kolloid, F: Follikül epitel hücreleri, , Ok: C hücreleri. PAS boyaması (A ve B) ve Mallory’nin modofiyeye üçlü boyaması (C ve D). Objektif büyütmesi, A, 40X; B, 100X C, 20X, D: 40X.	48
Şekil 4.1.3. Hipotiroidili sıçanlardan alınan tiroid bezinin histolojik görünümü. K: Kolloid, F: Follikül epitel hücreleri. PAS boyaması (A ve B) ve Mallory’nin modifiye üçlü boyaması(C ve D). A: 40X objektif büyütmesi, B: 100X, C: 20X, D: 40X objektif büyütmesi.	49

- Şekil 4.1.4.** Levotiroksin ile tedavi edilen sıçanlardan alınan tiroid bezinin histolojik görünümü. K: Kolloid, F: Follikül epitel hücreleri. PAS boyaması (A ve B) ve Mallory'nin modifiye üçlü boyaması(C ve D). A: 40X objektif büyütmesi, B: 100X, C: 20X, D: 40X objektif büyütmesi..... 50
- Şekil 4.2.1.** Kan glikoz değerleri. K: Kontrol grubu, H: Hipotiroidili grup, H+L: Levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidili grup. *: Gruplar arası farklılıkların %95 oranında ($P<0.05$) önemli olduğunu göstermektedir. 51
- Şekil 4.3.1.** Sıçanların deneme öncesi ve deneme sonrası canlı ağırlıkları. K: Kontrol grubu, H: Hipotiroidili grup, H+L: Levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidili grup. *: Gruplar arası farklılıkların %95 oranında ($P<0.05$) önemli olduğunu göstermektedir. 52
- Şekil 4.3.2.** Sıçanların deneme öncesi ve deneme sonrası canlı ağırlık artış oranları. K: Kontrol grubu, H: Hipotiroidili grup, H+L: Levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidili grup. *: Gruplar arası farklılıkların %95 oranında ($P<0.05$) önemli olduğunu göstermektedir. 53
- Şekil 4.4.1.** Sıçanların deneme öncesi ve deneme sonrası TSH hormon düzeyi. K: Kontrol grubu, H: Hipotiroidili grup, H+L: Levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidili grup. *: Gruplar arası farklılıkların %95 oranında ($P<0.05$) önemli olduğunu göstermektedir. 54
- Şekil 4.4.2.** Sıçanların deneme öncesi ve deneme sonrası serbest T3 ve serbest T4 hormon düzeyleri. K: Kontrol grubu, H: Hipotiroidili grup, H+L: Levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidili grup. *: Gruplar arası farklılıkların %95 oranında ($P<0.05$) önemli olduğunu göstermektedir. 54
- Şekil 4.5.1.** Sıçan dokularında pozitif (A-I) ve negatif kontrollerde (J-K) immünboyanmalar. İmmünohistokimya tekniği. A: sıçan kolon, B: böbrek, C: karaciğer, D: böbrek, E: karaciğer, F: testis, G: testis, H: deri, I: akciğer, J: hipokampus, K: hipokampus. Objektif büyütmesi: A-F, 20X; G, 10X; H-I, 40X; J-K, 4X. 55

- Şekil 4.5.2.** Kontrol, hipotiroidili ve Levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili sıçanların hipokampusünde AMPK ve p-AMPK ekspresyonları. Western blot analiz yöntemi. *: Gruplar arası farklılıkların %95 oranında ($P<0.05$) önemli olduğunu göstermektedir. 60
- Şekil 4.5.3.** Kornu ammonisdeki CA1 ve CA2 bölgesinde stratum piramidaledeki AMPK immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Strepavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 4X; D-F, 20X; G-I, 100X; J-L, 20X; M-O, 100X..... 61
- Şekil 4.5.4.** Kornu ammonis'deki CA3 bölgesinde AMPK immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Strepavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X; M-O, 20X; P-S, 100X. 62
- Şekil 4.5.5.** Hipokampusün dentat girus bölgesinde AMPK immünlokalizasyonu. PL: Pleomorfik katman, GL: Granüler katman, ML: Moleküler katman. Strepavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X..... 63
- Şekil 4.5.6.** Hipokampusün kornu ammonis ve dentat girusunda AMPK immünreaksiyon. İmmünfloresan yöntemi. Objektif büyütmesi 40X..... 64
- Şekil 4.5.7.** Kornu ammonis'deki CA1 ve CA2 bölgesinde p-AMPK immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Strepavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 4X; D-F, 20X; G-I, 100X; J-L, 20X; M-O, 100X. 65
- Şekil 4.5.8.** Kornu ammonis'deki CA3 bölgesinin p-AMPK immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Strepavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X; M-O, 20X; P-S, 100X..... 66
- Şekil 4.5.9.** Hipokampusün dentat girus bölgesinin p-AMPK immünlokalizasyonu. PL: Pleomorfik katman, GL: Granüler katman, ML: Moleküler katman. Strepavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X..... 67

- Şekil 4.5.10.** Hipokampusün kornu ammonis ve dentat girusunda p-AMPK immünreaksiyon. İmmünfloresan yöntemi. Objektif büyütmesi 40X..... 68
- Şekil 4.5.11.** Kontrol, hipotiroidili ve levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili sıçanların ULK1 ve p-ULK1 ekspresyonları. Western blot analiz yöntemi. *: Gruplar arası farklılıkların %95 oranında ($P<0.05$) önemli olduğunu göstermektedir. 70
- Şekil 4.5.12.** Kornu ammonis'deki CA1 ve CA2 bölgesinin ULK1 immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Strepavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 4X; D-F, 20X; G-I, 100X; J-L, 20X; M-O, 100X. 71
- Şekil 4.5.13.** Kornu ammonis'deki CA3 bölgesinin ULK1 immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Strepavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X; M-O, 20X; P-S, 100X. 72
- Şekil 4.5.14.** Hipokampusün dentat girus bölgesinin ULK1 immünlokalizasyonu. PL: Pleomorfik katman, GL: Granüler katman, ML: Moleküler katman. Strepavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X..... 73
- Şekil 4.5.15.** Kornu ammonis'deki CA3 bölgesinin p-ULK1 immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Strepavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 4X; D-F, 20X; G-I, 100X; J-L, 20X; M-O, 100X. 74
- Şekil 4.5.16.** Kornu ammonis'deki CA3 bölgesinin p-ULK1 immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Strepavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X; M-O, 20X; P-S, 100X..... 75
- Şekil 4.5.17.** Hipokampusün dentat girus bölgesinin p-ULK1 immünlokalizasyonu. PL: Pleomorfik katman, GL: Granüler katman, ML: Moleküler katman. Strepavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X..... 76

- Şekil 4.5.18.** Kontrol, hipotiroidili ve levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili sıçanların mTOR ve p-mTOR-Se2448 ekspresyonları. Western blot analiz yöntemi. *: Gruplar arası farklılıkların %95 oranında ($P<0.05$) önemli olduğunu göstermektedir. 78
- Şekil 4.5.19.** Kornu ammonis'deki CA1 ve CA2 bölgesinde mTOR immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 4X; D-F, 20X; G-I, 100X; J-L, 20X; M-O, 100X. 79
- Şekil 4.5.20.** Kornu ammonis'deki CA3 bölgesinde mTOR immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X; M-O, 20X; P-S, 100X..... 80
- Şekil 4.5.21.** Hipokampusün dentat girus bölgesinin mTOR immünlokalizasyonu. PL: Pleomorfik katman, GL: Granüler katman, ML: Moleküler katman. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X..... 81
- Şekil 4.5.22.** Hipokampusün kornu ammonis ve dentat girusunda mTOR immünreaksiyon. İmmünfloresan yöntemi. Objektif büyütmesi 40X..... 82
- Şekil 4.5.23.** Kornu ammonis'deki CA1 ve CA2 bölgesinin p-mTOR immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 4X; D-F, 20X; G-I, 100X; J-L, 20X; M-O, 100X. 83
- Şekil 4.5.24.** Kornu ammonis'deki CA3 bölgesinin p-mTOR immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X; M-O, 20X; P-S, 100X..... 84
- Şekil 4.5.25.** Hipokampusün dentat girus bölgesinin p-mTOR immünlokalizasyonu. PL: Pleomorfik katman, GL: Granüler katman, ML: Moleküler katman. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X..... 85

- Şekil 4.5.26.** Hipokampusün kornu ammonis ve dentat girusunda p-mTOR immünreaksiyon. İmmünfloresan yöntemi. Objektif büyütmesi 40X..... 86
- Şekil 4.5.27.** Kontrol, hipotiroidili ve levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili sıçanların TSC2 ve p-TSC2 ekspresyonları. Western blot analiz yöntemi. *: Gruplar arası farklılıkların %95 oranında ($P<0.05$) önemli olduğunu göstermektedir. 88
- Şekil 4.5.28.** Kornu ammonis'deki CA1 ve CA2 bölgesinin TSC2 immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Strepavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 4X; D-F, 20X; G-I, 100X; J-L, 20X; M-O, 100X. 89
- Şekil 4.5.29.** Kornu ammonis'deki CA3 bölgesinin TSC2 immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Strepavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X; M-O, 20X; P-S, 100X. 90
- Şekil 4.5.30.** Hipokampusün dentat girus bölgesinin TSC2 immünlokalizasyonu. PL: Pleomorfik katman, GL: Granüler katman, ML: Moleküler katman. Strepavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X. 91
- Şekil 4.5.31.** Kornu ammonis'deki CA1 ve CA2 bölgesinin p-TSC2 immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Strepavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 4X; D-F, 20X; G-I, 100X; J-L, 20X; M-O, 100X. 92
- Şekil 4.5.32.** Kornu ammonis'deki CA3 bölgesinin p-TSC2 immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Strepavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X; M-O, 20X; P-S, 100X..... 93
- Şekil 4.5.33.** Hipokampusün dentat girus bölgesinin TSC2 immünlokalizasyonu. PL: Pleomorfik katman, GL: Granüler katman, ML: Moleküler katman. Strepavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X. 94

- Şekil 4.5.34.** Kontrol, hipotiroidili ve levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili sıçanların Beclin1 ve p62 ekspresyonları. Western blot analiz yöntemi. 95
- Şekil 4.5.35.** Kornu ammonis'deki CA1 ve CA2 bölgesinin Beclin1 immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 4X; D-F, 20X; G-I, 100X; J-L, 20X; M-O, 100X. 96
- Şekil 4.5.36.** Kornu ammonis'deki CA3 bölgesinin Beclin1 immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X; M-O, 20X; P-S, 100X..... 97
- Şekil 4.5.37.** Hipokampusün dentat girus bölgesinin Beclin1 immünlokalizasyonu. PL: Pleomorfik katman, GL: Granüler katman, ML: Moleküler katman. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X..... 98
- Şekil 4.5.38.** Kornu ammonis'deki CA1 ve CA2 bölgesinin p62 immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 4X; D-F, 20X; G-I, 100X; J-L, 20X; M-O, 100X. 99
- Şekil 4.5.39.** Kornu ammonis'deki CA1 ve CA2 bölgesinin p62 immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X; M-O, 20X; P-S, 100X..... 100
- Şekil 4.5.40.** Hipkampusün dentat girus bölgesinin p62 immünlokalizasyonu. PL: Pleomorfik katman, GL: Granüler katman, ML: Moleküler katman. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X. 101
- Şekil 4.5.41.** Kontrol, hipotiroidili ve levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili sıçanların MAPLC3 α/β ve MAPLC3 ekspresyonları. Western blot analiz yöntemi. 102
- Şekil 4.5.42.** Kornu ammonis'deki CA1 ve CA2 bölgesinde MAPLC3 α/β immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Streptavidin biotin

- peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 4X; D-F, 20X; G-I, 100X; J-L, 20X; M-O, 100X. 104
- Şekil 4.5.43.** Kornu ammonis'deki CA3 bölgesinin MAPLC3 α/β immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X; M-O, 20X; P-S, 100X..... 105
- Şekil 4.5.44.** Hipokampusün dentat girus bölgesinin MAPLC3 α/β immünlokalizasyonu. PL: Pleomorfik katman, GL: Granüler katman, ML: Moleküler katman. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X..... 106
- Şekil 4.5.45.** Kornu ammonis'deki CA1 ve CA2 bölgesinde MAPLC3A immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 4X; D-F, 20X; G-I, 100X; J-L, 20X; M-O, 100X. 107
- Şekil 4.5.46.** Kornu ammonis'deki CA3 bölgesinin MAPLC3A immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X; M-O, 20X; P-S, 100X..... 108
- Şekil 4.5.47.** Hipokampusün dentat girus bölgesinin MAPLC3A immünlokalizasyonu. PL: Pleomorfik katman, GL: Granüler katman, ML: Moleküler katman. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X..... 109
- Şekil 4.5.48.** Hipokampusün kornu ammonis ve dentat girusunda MAPLC3 α/β immünreaksiyon. İmmünfloresan yöntemi. Objektif büyütmesi 40X..... 110

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Beyin için önemli bir metabolik substrat olan glikoz ile bilişsel performans arasında doğrudan bir ilişki vardır. Glikoz yoksunluğunun (hipoglisemi) erişkin nörojeniz ile sinaptik plastisitede yer alan sinyal yollarını değiştirerek otofajiyi indüklediği ve nörodejeneratif bozukluk riskini artırdığı bilinmektedir (Hall ve ark., 1989; Parsons ve Gold, 1992; Gold, 1995; Manning ve ark., 1998; Erickson ve ark., 2006; Hoyland ve ark., 2008; Krebs-Kraft ve Parent, 2008). Hipokampüste, glikoz yoksunluğunun kornu ammonis 1 (CA1) alanındaki sinaptik alan potansiyellerinin inhibisyonuna yol açtığı, düşük glikozlu ortamın, alan uyarıcı post-sinaptik potansiyelleri (fEPSP) önemli derecede azalttığı, yüksek glikozlu ortamın fEPSP üzerinde çok az etkisinin bulunduğu tespit edilmiştir (Kamal ve ark., 1999). Glikozun öğrenme ve hafıza görevlerini etkileme yeteneği, öğrenme ve hafıza mekanizmalarının metabolik kontrol altında olduğunun önemli bir göstergesidir (Potter ve ark., 2010). Klinik öncesi araştırmalardan elde edilen bulgular, glikoz metabolizmasını düzenleyebilme ve insülin sinyalizasyonuna katkıda bulunma potansiyeli nedeniyle tiroid hormonunun (TH) özellikle de hipokampüste bellek ile ilgili süreçlerin önemli bir düzenleyicisi olabileceği hipotezini desteklemektedir (Gould ve ark., 1991; Smith ve ark., 2002; Samuels, 2008; Fernandez-Lamo ve ark., 2009). TH'nun erişkin beyninde bölgesel glikoz metabolizmasını ve psikiyatrik semptomları düzenlediği bildirilmiştir (Bauer ve ark., 2009). Hipotiroidizm hipoglisemiye neden olan çeşitli hormonal, biyokimyasal ve sinir sistemi anormallikleriyle bağlantılıdır. Hipotiroidizmde hem iskelet kasında hem de yağ dokusunda glikoneogenezin rolü azalır (McCulloch ve ark. 1983), ayrıca glikojenoliz de bozulur (McDaniel ve ark.,1977). Bu biyokimyasal kusurlar, hipoglisemiden kurtulmayı geciktirir (Kalra ve ark. 2014). Hipotiroidizmdeki diğer anormallikler, glukagon salınımında bir azalma (Clausen ve ark., 1986), glukagonun

hepatositler üzerindeki etkisinin azalması (Müller ve Seitz, 1987) ve insülin klirensinin yavaşlatılmasını içerir (Shah ve ark., 1975).

Hipokampusün hipotiroidizme bağlı hipoglisemiden etkilenip etkilenmediği bilinmemektedir. Memelilerde glikoz eksikliğinin çeşitli doku ve organlarda otofajiyi indüklediği (Maruyama ve ark. 2008; Williams ve ark., 2009; Singh ve Cuervo, 2011; Kobayashi ve ark., 2012), otofaji ile karbonhidrat metabolizması arasında bir etkileşimin olduğu ve ayrıca otofaji ile hücrel enerji dengesi arasında dinamik bir geri bildirimin bulunduğu son yıllardaki çalışmalarda ortaya konmuştur (Singh ve Cuervo, 2011). Bununla birlikte glikoz eksikliğinin hipokampal otofajiyi etkileyip etkilemediği bilinmemektedir. Sinir sistemi dışındaki dokularda glikoz eksikliği hücrede adenosin trifosfat (ATP) konsantrasyonunun azalmasına ve adenosin monofosfat (AMP) düzeyinin artmasına yani AMP/ATP oranında bir artışa neden olur. AMP düzeyindeki artış bir hücrel enerji sensörü olan adenosin monofosfat ile aktive olan protein kinaz (AMPK)'ın yukarı akış kinazlar tarafından fosforile olarak aktifleşmesini sağlar (Stein ve ark., 2000; Hardie ve Hawley, 2001; Hardie, 2011). Aktifleşen AMPK otofajiyi indükler (Gwinn ve ark., 2008). Son on yılda elde edilen veriler AMPK'nın nöronlarda enerji üretimi ve tüketiminin düzenlenmesi için gerekli olduğunu ve merkezi sinir sistemi fizyopatolojisinde önemli rol oynadığını göstermektedir (Rosso ve ark., 2017). Yetişkin beyinde, AMPK'nın yaşlanma sürecinde yer alan hücrel olayları yönettiği, Alzheimer hastalığı (AD), Huntington hastalığı (HD) ve Parkinson hastalığı (PD) gibi çeşitli beyin hastalıklarıyla AMPK sinyalizasyonunun işlev bozukluğunun ilişkili olduğu da bildirilmektedir (Won ve ark., 2010; Ma ve ark., 2014). Hipotiroidizmde hipokampal AMPK aktivitesinin değişip değişmediği ve tiroid hormon yetersizliği ile AMPK aktivitesi arasında bir ilişkinin bulunup bulunmadığı bilinmemektedir. Otofajinin nöronları beslenme açlığından koruduğu dolayısıyla nöroprotektif bir rol oynadığı bilinmektedir (Kaushik ve ark., 2011). Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalar i) otofajinin nöronlarda da normal koşullar altında yapısal olarak meydana geldiğini, ii) yapısal otofajinin nöronal sağkalımdan sorumlu olduğunu (Poels ve ark., 2012), iii) yapısal otofajinin bozulmasının nörodejenerasyona yol açtığını ve iv) ayrıca bozulmuş otofajinin birçok nörogelişimsel ve nörodejeneratif bozuklukların patogeneğinde rol oynadığını göstermiştir (Hara ve ark., 2006; Komatsu ve ark., 2006; Vijayan ve Verstreken, 2017). Tiroid hormonu ve otofajinin iskelet kası büyümesinin, rejenerasyonunun ve farklılaşmasının düzenlenmesinde benzer işlevleri paylaştığı, TH

ile indüklenen otofajinin, mitokondriyal reaktif oksijen türleri (ROS) ile AMPK ve Unc-51 benzeri otofajiyi aktive eden kinaz (ULK1)'in aktivasyonunu ve rapamisin'in memeli hedefi (mTOR) yolağının inhibisyonunu içerdiği, ayrıca TH kaynaklı otofajinin, iskelet kasında mitokondriyal aktiviteyi ve biyogenezi korumak için gerekli olduğu (Lesmana ve ark., 2016) ve TH'nun karaciğerde otofajiyi arttırdığı gösterilmiştir (Sinha ve ark., 2012). Bununla birlikte yapılan literatür taramalarında hipotiroidizmin hipokampüste otofagozom oluşumunu indükleyip indüklediği ve otofajiyi inhibe ya da modüle edip etmediği bilinmemektedir. Yukarıda özetlenen çalışmalarla elde edilen sorular, TH yetersizliğinin AMPK sinyal yolağını modüle veya inhibe ederek ve mTOR'u baskılayarak veya aktive ederek hipokampüste otofajiyi değiştirip değiştirmediği düşüncesinin test edilmesini gerekli kılmaktadır.

Bu tez çalışmasında tiroid hormonlarının yetersizliğine bağlı olarak şekillendiği bilinen bilişsel bozukluklarda otofajik mekanizmalardaki değişikliklerin rolünün olup olmadığının ortaya konması amaçlanmıştır. Çalışmada propiltiourasil (PTU) verilerek hipotiroidizm oluşturulan erişkin sıçan modelinde tiroid hormonu yoksunluğunun; hipokampus dokusunda AMPK α 1, fosfo-AMPK α 1, tuberin (tuberoz skleroz kompleks 2, TSC2), mTOR, fosfo-mTOR, ULK1, fosfo-ULK1, BECLIN1 gibi otofaji ile ilişkili çeşitli proteinlerin ve otofagozom oluşumunda önemli rol oynayan LC3'ün ekspresyon düzeylerini değiştirip değiştirmediğinin; eğer değiştiriyorsa bu değişimin otofajinin indüklenmesi veya baskılanması yönünde olup olmadığının ve otofajinin indüklenmesinde AMPK sinyal yolağının rol oynayıp oynamadığının araştırılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tiroid Bezi

Tiroid bezi, boynun ön yüzeyinde, larinksin hemen altında bulunan ve isthmus adı verilen bir parça ile birbirine bağlanan iki lobdan (sol ve sağ) oluşan kelebek şeklinde bir organdır. Endokrin bir organ olarak işlev gören tiroid bezi tiroid hormonları ile kalsitonin hormonunu üretir. Böylece metabolizmanın, büyümenin ve kalsiyum gibi elektrolitlerin serum konsantrasyonlarının düzenlenmesine katkı sunar. Buradan salgılanan ana tiroid hormonları tiroksin olarak da bilinen tetraiodotironindir (tetraiodo-thyronine, tiroksin, T4) (ve 3,5,3 triiyodo-L-tironinin (3,5,3-triiodo-L-thyronine, T3) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551611/>, Erişim tarihi: 21 Ocak 2021).

2.1.1. Tiroid Bezinin Embriyolojik Gelişimi

Tiroid bezi memelilerde yutak endoderminden köken alan ve ilk gelişen endokrin bezdir. İnsanlarda gebeliğin üçüncü haftasında (20-24. günler arasında), primitif farinksin tabanındaki endodermal hücreler çoğalır ve tiroid divertikülü oluşur. Gebeliğin beşinci haftasından itibaren, tiroid divertikülü anterior olarak hyoid kemiği ve laringeal kıkırdığı geçerek orta hat boyunca kaudale doğru göç eder. Tiroid göç süresince, tiroglossal duktus yoluyla dile bağlı kalmaya devam eder. Bu durumda tiroid dokusunun dil bölgesindeki alışılmadık yerini ve gelişim boyunca görülen triglossal duktus kistlerinin varlığını açıklar (Manuchehri, 2008). Erken göç sırasında tiroid bezinin içi boştur; daha sonra tiroidin foliküler elemanları meydana gelir Tiroid bezinin sağ ve sol loblara ayrılması gebeliğin 5. haftasında gerçekleşir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551611/>, Erişim tarihi: 21 Ocak 2021).

Ayrıca, beşinci haftada, ultimobranşiyal cisimcikler dördüncü / beşinci faringeal keselerden oluşmaya başlar. Ultimobranşiyal cisimcikler gelişen tiroid bezinin superior dorsolateral kısmıyla kaynaşır ve Zuckerkandl tüberkülünü oluşturur (Chintamani, 2013). Ultimobranşiyal cisimcikler tiroid bezi içerisine yerleşir ve daha sonra

parafoliküler C hücrelerine farklılaşır. Önceleri parafoliküler C hücrelerinin nöral krista hücrelerinden köken aldığı düşünülürken, son çalışmalar, bunların endodermden köken aldığını ortaya koymuştur. Parafoliküler C-hücreleri tiroidin üst lateral bölümünde çoğunlukta iken, tiroidin alt üçte birinde bulunmazlar. Tam gelişmiş C hücreleri, osteoklast fonksiyonunu inhibe ederek serum kalsiyum düzeyini azaltan kalsitonin hormonunu salgılar. Gebeliğin 7. haftasında tiroid bezi erişkindeki yerine ulaşır. Gebeliğin 10. haftasında triglossal duktustan geriye yalnızca foramen sekum kalır. Bazı durumlarda, kanalın eksik obliterasyonu, tiroglossal kanal kistleri, lingual tiroid veya piramidal lob gibi anormalliklere yol açabilir. Tiroid bezinde hücrel farklılaşma ve olgunlaşma gebeliğin 12. haftasına kadar devam eder. Onikinci haftada fonksiyonel olgunlaşma tamamlanır (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551611/>, Erişim tarihi: 21 Ocak 2021).

2.1.2. Tiroid Bezinin Anatomik ve Histolojik Yapısı

İnsanda tiroid bezinin sağ ve sol lobları, ortada bulunan bir yapı olan isthmus ile birbirine bağlanmıştır. Ancak sıçanlarda isthmus bulunmaz. Dolayısıyla tiroid bezi, trakeyanın yanlarında yerleşen 2 ayrı loptan oluşur (Mota ve Serkiz, 2019). Tiroid lobları fibro-elastik bağ dokusundan oluşan bir kapsül ile sarılmıştır. Bu kapsülden ayrılan bağdoku, bölmeleriyle miktarı 20-30 milyon kadar olan foliküller içeren, düzensiz biçim almış, farklı büyüklükte lopçuklara ayrılmıştır. Her bir lopçuk tiroid bezinin yapısal ve fonksiyonel birimleri olan ve tiroid folikülleri olarak adlandırılan bir folikül kümesi içerir (Rykova ve ark, 2019). Diğer endokrin bezlerin aksine tiroid, ekzokrin bez yapısını andırır. Foliküller, erişkin hayvanlarda oval veya yuvarlak, genç hayvanlarda az veya çok tubuler yapıda veya dallanmıştır. Tek katlı epitelle örtülü olan foliküllerin çapları 20-500 µm arasında değişir. Epitel hücreleri bazal membran olmaksızın direkt olarak bağ doku üzerine oturur. Her bir folikülün lümeni kolloid adı verilen follikül epitel hücrelerinin salgılarından oluşan jel benzeri bir madde ile doludur. İnaktif tiroid bezindeki foliküllerde epitel hücreleri yassılaşmış olduğu halde, sekresyonun aktif olduğu foliküllerde yüksek prizmatiktir. Folikül etrafında geniş bir kapillar ağ bulunur. Bu damarların endotel hücreleri pencerelidir.

Folikül epitel hücreleri asidofilik sitoplazmalı olup lümene bakan yüzeyleri düzgün olmayan mikrovilluslarla örtülüdür. Folikül epitel hücreleri belirgin bir kutuplaşma gösterirler. Hücrelerde çekirdek hücrenin bazalinde yerleşirken, mitokondriyonlar,

lizozomlar, granüllü endoplazmik retikulum, ribozom ve polizomlar sitoplazmanın her tarafına dağılmıştır. Golgi kompleksi supranükleer bölgede bulunur. Apikal sitoplazma iki tip vezikül içerir. Bunlardan apikal veziküller Golgi kompleksinden köken alan ve tiroglobulin içeren veziküller olup eksositozla folikül lümenine salgılanırlar. Diğer tip veziküller olan büyük endositotik veziküller luminal yüzeyde bulunurlar ve membranla çevrili kolloid damlacıkları olarak adlandırılırlar ve lizozomlarla fagolizozomları şekillendirirler.

Folikül epitel hücreleri tarafından salgılanan ve tiroid bezi hormonlarını taşıyan kolloid proteinler, glikoproteinler ve enzimleri içerdiğinden genellikle asidofiliktir ve glikoprotein içeriğinden dolayı PAS-pozitif reaksiyon verir. İnaktif foliküllerde hafifçe bazofilik veya asidofilik olabilir. Periferi düzgündür ve vakuollere sahip değildir. Epitelin yüksekliği ile birlikte folikül büyüklüğü de foliküler aktivitenin belirleyicisidir. Foliküler aktivite ile folikül çapı arasında ters orantı vardır. Küçük foliküller yüksek prizmatik epitelle örtülüdür ve aktiftirler. Büyük foliküller ise basık epitelle örtülüdür ve inaktiftirler (Liman, 2010).

Tiroid bezinde foliküller arasındaki bağ dokusu içerisinde tek veya gruplar halinde C hücreleri veya parafoliküler hücreler olarak adlandırılan ikinci bir hücre tipi bulunur. Hematoksilen-Eozin (HE) boyası ile boyandıklarında açık renkli olarak görülen parafoliküler hücreler, amin ön maddelerini alan ve dekarboksile eden hücreler sistemine (APUD) ait olan nöroendokrin hücrelerin bir alt tipidir. Foliküllerin bazal laminası ile folikül epitel hücreleri arasında tek tek bulunabildikleri gibi, özellikle köpekte belirgin olmak üzere aynı yerde veya folikül dışında gruplar halinde bulunurlar. Soluk veya açık boyanan bu hücreler az miktarda endoplazmik retikulum, bol Golgi kompleksi, birçok mitokondriyon ve çok sayıda membranla çevrili elektron yoğun salgı granülleri içerirler. Arjirofilik özellikteki bu hücreler, gümüşleme ile kahverengi veya siyah boyanırlar ve bir polipeptid hormon olan tirokalsitonin (kalsitonin) hormonunu üretirler. Kalsitonin hormonu içeren granüller, hücrenin kapillarlara yakın kutbunu tercih ederler. Bu hormon, kemik erimesini (kemiğin parçalanması ve ardından minerallerin kana salınması) azaltarak ve böbreklerde kalsiyumun geri alımını sınırlayarak kandaki kalsiyum seviyelerinin düzenlenmesine yardımcı olur. Yani kalsiyum ve fosfatın kemiklerde depolanmasını sağlayan bir hormondur (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551659>, Erişim tarihi: 21 Ocak 2021).

2.1.3. Tiroid Hormonlarının sentez ve salgılanmasının düzenlenmesi

Tiroid hormonlarının metabolizma, büyüme ve doku farklılaşmasındaki fonksiyonları düşünüldüğünde, bu hormonların belirli bir seviyede tutulabilmesi için güçlü bir regülasyon mekanizmasının bulunması gereklidir. Tiroid hormonunun salgılanması hipotalamus-hipofiz tiroid ekseninde regüle edilir, ancak tiroid hormonunun biyolojik aktivitesi büyük ölçüde hedef dokular düzeyinde düzenlenir. Tiroid hormonlarının salgılanması hipotalamusdan salgılanan TSH-salgılatıcı hormon (TRH) (Tirotropin Salgılatıcı Hormon veya Tirotropin Salgılatıcı faktör-TRF- olarak da adlandırılır) ve anterior (ön) hipofizden salgılanan Tiroid Stimüle Edici Hormon (TSH) ile kontrol edilir.

Hipotalamusdan salgılanan TRH ön hipofizin tirotrop hücrelerinin TSH salgılamaları için aktive eder. TRH, tirotrop hücrelerin membranında eksprese olan Tirotropin salgılatıcı hormon reseptörü (TRHR) adı verilen G-protein bağlı reseptöre (GPCR) bağlanarak bu hücrelerin TSH salgılamalarını sağlar (Gershengorn, 1993). Aynı zamanda TRH laktotrop hücreleri prolaktin (PRL) salgılamaları için uyarır. TRH, tirotrop hücrelerin membranındaki TRHR'ye bağlandığında, fosfolipaz C'yi aktive eder, bu da inositol trifosfat (IP3) ve diaçilgliserol (DAG) oluşumuna neden olur. Bu, TSH'un kana ekzositozunu uyaran sitoplazmik kalsiyum iyon konsantrasyonunda bir artışa yol açar.

Tirotrop hücreler anterior hipofiz bölgesindeki hormon salgılayan hücrelerin %5'ini oluşturur. Bunlara göre biraz daha küçük hücreler olup, çapları 120-150 µm arası değişir. Tirotropin olarak da bilinen TSH tirotrop hücrelerden salgılandıktan sonra tiroid bezindeki epitel hücrelerinde bulunan reseptörlere bağlanarak tiroid bezini tiroksin (T4) ve triiyodotronin (T3) hormonlarını sentezleyip salgılaması için uyarır. Bir glikoprotein hormon olan TSH alfa (α) ve beta (β) olmak üzere iki alt birimden oluşur. Alfa alt birimi (koryonik gonadotropin alfa), insan koryonik gonadotropin (hCG), luteinize edici hormon (LH) ve folikül uyarıcı hormon (FSH) ile neredeyse aynıdır. Alfa alt biriminin cAMP üretilmesinde görevli olan adenilat siklaza uyarılmasından sorumlu efektör bölge olduğu düşünülmektedir. Alfa zinciri 92 amino asit dizisine sahiptir (Lalli ve Sassone-Corsi, 1995). Beta alt birimi (TSHB) TSH'a özgüdür ve bu nedenle reseptör özgüllüğünü belirler. Beta zinciri 118 amino asit dizisine sahiptir (Porcellini ve ark., 2003).

Tiroid bezinden T4 salgılanmasının stimüle edilebilmesi için TSH'un tiroid foliküler hücrelerdeki tirotropin reseptör (TR) veya tiroid hormon reseptörü (TSHR) adı verilen reseptöre bağlanması gereklidir. TSHR, integral membran proteinlerinin G proteinine bağlı reseptör (GPCR) süper ailesinin bir üyesidir ve adenilil siklazı aktive ederek cAMP'ye bağımlı yolağı uyaran Gs proteinine bağlanmıştır (Farid ve Szkudlinski, 2004). Dolaşımdaki TSH'nin tiroid folikül hücrelerindeki TSHR'ye bağlanması üzerine, bir G-protein sinyal kaskadı adenilil siklazı aktive eder ve cAMP'nin hücre içi seviyeleri yükselir. cAMP, iyot pompalama dahil olmak üzere tiroid hücresinin tüm işlevsel yönlerini aktive ederek (tiroglobulin sentezi, iyotlama, endositoz ve proteoliz; tiroid peroksidaz aktivitesi gibi) T4 üretimini ve salgılanmasını artırır. T4 hormonu daha sonra periferde daha aktif formu olan T3'e dönüştürülür.

2.1.4. Tiroid Hormon Sentezi

Tiroid Hormonları, çeşitli organ ve dokular üzerinde çok sayıda kritik etkiye sahip olan hidrofobik amin hormonlardır. Tiroid hormonları, iyot atomlarının sayısına göre farklılık gösteren iki temel alt tipten oluşur. T3 ve rT3 (reverse T3) üç iyot atomuna sahipken, T4 dört iyot atomuna sahiptir. Periferik dokularda tiroid hormonu üyeleri farklı aktivite gösterir. T3 en aktif olanıdır, T4 bir şekilde aktiftir ve rT3 ise aktif değildir. Tiroid hormonları hidrofobiktir ve bu nedenle hücrelerin plazma membranlarını geçebilirler. Hedef hücrelerin içine girdikten sonra, bir tür nükleer reseptör olan TR (TSHR)'ne bağlanırlar ve daha sonra çeşitli genlerin transkripsiyonunu etkinleştirirler.

Tiroid hormonlarının sentezi, foliküler epitel hücrelerinde ve ayrıca aselüler foliküler lümen içinde meydana gelen bir seri biyokimyasal reaksiyonlarla gerçekleşir. Tiroid hormonlarının fizyolojik düzeylerinin sentezi için büyük miktarlarda iyot gereklidir. Bunun yanı sıra iyodu hücrelere taşıyan sodyum iyodür simporter (NIS) ve tiroglobulinin (TGB) treonin rezidüleri üzerindeki iyodu oksitleyen tiroperoksidaz (TPO) gibi çeşitli moleküller gereklidir.

Tiroid hormonları sentezi hipofizden tiroid stimule edici hormonun (TSH) üretimi ve salınımı ile iyodun (I) kullanılabilirliğine bağlıdır ve dört aşamada gerçekleşir (Liman, 2010):

a. İyotun yeterli konsantrasyonlarını oluşturmak için iyon formundaki iyodür (I⁻), foliküler epitel hücrelerinin bazolateral membranında bulunan bir glikoprotein olan

sodyum-iyot simporter (NIS) adı verilen moleküler bir pompa sayesinde sitoplazma içine alınır. NIS, 2 adet Na^+ iyonu ve 1 adet iyodu birlikte hücre içine alır. TSH, NIS aktivitesini transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel mekanizmalarla kontrol eder (Bizhanova ve Kopp, 2008).

b. Sodyumun hücre içinde konsantrasyonunun az bulunması nedeniyle oluşan, hücre içine Na^+ girişi sayesinde iyot taşınımı da NIS aracılığıyla sağlanmış olur (Dohán ve ark., 2003). Böylece Na-K-ATPase pompasının sağladığı konsantrasyon farkı ile taşıma gerçekleşmiş olur.

c. İyot hücre içerisinde hidrojen peroksit varlığında tiroperoksidaz (TPO) ile okside edilir. TPO, yalnızca tiroid folikül epitel hücrelerinde eksprese edilen membranla ilişkili bir hemoglikoproteindir ve en önemli tiroid bezi antijenlerinden biridir. TPO hücrenin kolloid kısma bakan tarafında, apikalinde bulunur. Peroksidaz ile okside edilen iyod hücrenin apikaline taşınır (Liman, 2010).

d. Tiroglobulinin iyotlaştırılması ve tiroid hormonlarının şekillenmesi: Ardından tiroglobulin (TGB)'ün iyodinasyonu gerçekleşir. Tiroglobulin sentezlendikten sonra vezikül ile hücrenin apikal kısmına taşınır ve buradan da ekzositoz yolu ile lümene verilir. Tiroglobulin 660.000 kDa ağırlığında dimerik bir glikoproteindir. 134 tirozin kalıntısı bulundurur. TPO tiroglobulin glikoproteindeki tirozin kalıntılarının iyodinasyonunu katalize eder. Tiroglobulin bazı karbonhidratları (galaktoz, mannoz, N-asetilglukozamin, sialik asid) ve iyodoaminoasitleri içerir. Bir tirozin molekülüne bir iyot eklendiği zaman Üç-monoiyodotirozin (MIT) meydana gelir. İkinci bir iyod eklendiği zaman ise 3, 5-diyyodotirozin (DIT) şekillenir. İyodinleşmiş iki tirozinin birleşmesiyle bir tironin molekülü meydana gelir. İki DIT molekülünün birleşmesiyle tetraiyodotirozin (tiroksin, T_4), bir MIT ve bir DIT molekülünün birleşmesiyle triiyodotirozin (T_3) oluşur (Hugo 2008, Liman 2010). Salgılanan kolloid, follikül içinde depolanır, yavaş yavaş koyulaştırılır. Aynı zamanda epitel hücreleri dinlenme evresine girer, basık kübik veya yassılaştırmış olarak görünürler (Liman, 2010).

2.1.5. Tiroid Hormonların etki mekanizmaları

Tiroid hormonları T_3 ve T_4 hemen hemen tüm dokularda hücrelerin normal büyüme ve gelişmeleri için gerekli olmalarının yanı sıra, protein, yağ ve karbonhidrat metabolizmalarının kritik düzenleyicileridir. Tiroid hormonunun gelişme ve metabolizma üzerindeki etkileri hücresel düzeyde ortaya çıkar. Bunun için öncelikle

hormonun plazma membranından hücre içine alınması gereklidir. Bu sürece TH taşıyıcı proteinleri aracılık eder (Visser ve ark., 2011). Hücre içinde tiroid hormonları etkilerini genomik ve nongenomik mekanizmalar olarak tanımlanan iki farklı mekanizma ile gerçekleştirirler. Genomik etki mekanizması için T3 hedef hücrenin çekirdeğine girmeli ve tiroid hormonuna duyarlı genlerin transkripsiyonunu düzenleyen spesifik nüklear reseptör olan tiroid hormon reseptörlerine (TR) bağlanmalıdır (Marsili ve ark., 2011). Diğer nüklear reseptörler gibi TR'leri de DNA bağlama alanı ve COOH-terminal alanı bulundurur (Brent, 2011). Bu reseptörler iki gen THRA (TR α) ve THRB (TR β) olarak kodlanır. Bu TR'lerinin TR α 1, α 2, α 3 ve β 1, β 2, β 3 olmak üzere farklı izoformları bulunmaktadır. TR α 1 ve TR β 1 T3 ve daha az olarak da T4 sinyalizasyonuna aracılık eden fonksiyonel TR izoformlarıdır (Hodin ve ark., 1989; Williams, 2000; Margolis, 2008). TR'lerinin α ve β izoformlarının her ikisi de sumolasyon ile post-translasyonel modifikasyona uğrar (Liu ve ark., 2012). TR izoform ekspresyonunun doku spesifitesi ve her izoformun bir dokudaki göreceli ekspresyonu tiroid hormonun metabolizmadaki etkisine bağlı olarak değişir (Flamant ve Gauthier, 2013). TR α izoformu α 1 ve α 2, TR β izoformu ise β 1 ve β 2 gibi birkaç alt tipe sahiptir (Brent, 2012). TR α 2 T3 ile bağlanmaz ve T3 etkisini azaltır. TR β 2 çoğunlukla beyin ve hipofizde eksprese edilir. Gelişimsel olarak, TR α ilk olarak eksprese olur, sonrasında bunu TR β 2 takip eder. Çalışılmış olan bütün türlerde ekspresyon sırası bu şekildedir. TR β 'nin retina ve iç kulak gibi duyuşal dokularda oldukça dar bir ekspresyon aralığı vardır (Nunez ve ark., 2008). TR β karaciğer ve kalp ventriküllerinde baskın olan izoformudur. TR α 1 daha çok beyinde ve beyaz adipoz dokuda eksprese olurken, TR α ve β kahverengi adipoz dokuda eksprese olur (Ribeiro ve ark., 2010).

Tiroid hormonunun TR ile oluşturduğu kompleks hedefteki spesifik Tiroid response element (TRE)'e bağlanır. Bağlandıktan sonra hedef genlerin transkripsiyonunda artış ya da azalış meydana getirerek gen ekspresyonunda değişikliğe neden olur. Tiroid hormonu tarafından pozitif ve negatif yönde regüle edilen genlerden bazı örnekler tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Tiroid hormonu T3 tarafından pozitif ve negatif yönde regüle edilen bazı genler

T3 ile pozitif regüle edilen bazı genler	T3 ile negatif regüle edilen bazı genler
1. Yağ asidi sentaz	1. Epidermal growth factor reseptör
2. Büyüme hormonu	2. Miyozin ağır zincir β
3. Lizozom susturucu	3. Prolaktin
4. Malik enzim	4. Thyroid-stimüle edici hormon α
5. Moloney leukemia virus enhancer	5. Thyroid-stimüle edici hormon β
6. Miyelin basic protein	6. Thyrotropin-releasing hormon
7. Miyozin ağır zincir α	7. Tip II 5'-deiyodinaz
8 Fosfoenolpiruvat karboksikinaz	
9. RC3	
10. Spot 14 lipojenik enzim	
11. Tip I 5'-deyiodinaz	
12. Uncoupling protein	

Tiroid hormonlarının nongenomik aktiviteleri ise plazma membranı, sitoplazma ya da sitoplazmadaki organeller seviyesinde başlar. Sitoplazmik TR (TR β 1, TR α 1 gibi), mitokondrial TR veya plazma membran reseptörleri buna aracılık eder (Cheng ve ark., 2010; Hammes, 2015; Wrutniak, 1998). Buradaki etkiler transkripsiyon ve translasyon olmadığı için nongenomik olarak isimlendirilir. Aynı sebepten nüklear reseptörlere göre nisbeten daha hızlıdır.

Tiroid hormonları enerji metabolizmasıyla yakından ilişkilidir. Hücresel düzeyde, bu etkiler ATP ihtiyacından kaynaklanır. Bu da mitokondrideki oksidatif fosforilasyonla ATP sentezinde değişikliği gerektirir (Harper, 2008). Yakın zamanda yapılan çalışmalarda tiroid hormonlarının mitokondri ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır (Davis ve

ark., 2016). Mitokondri iç membranında bulunan uncoupling protein 1 (UCP1), aktive olduğunda elektrokimyasal proton gradyanını ortadan kaldırıp ATP sentezinde kullanılan protonun kuvvetini azaltan proton taşıyıcısı olarak görev yapar. Proton kaçağı sonucu serbest enerji ısı olarak açığa çıkar (Klingenberg ve Winkler, 1986). T3 hormonu UCP1'in transkripsiyonunu TRE'ye etki ederek artırır (Rabelo ve ark., 1995).

Plazma membranında bulunan integrin $\alpha\beta3$ reseptörü, yapısal olarak tiroid hormon reseptörlerine benzemez (Davis ve ark., 2016). Bu reseptör özellikle tümör hücrelerinde ve bölünen endotelial hücrelerde yüksek seviyelerde eksprese edilir (Davis ve ark., 2014; Davis ve ark., 2011). Integrin hücre-hücre ve hücre-ekstraselüler matriks ilişkilerinin esansiyel regülatörüdür (Plow ve ark., 2000). Yapılan çalışmalarda integrin-tiroid hormon etkileşiminin kemik dokunun demineralizasyonunu etkilediği gösterilmiştir (Hoffman ve ark., 2002). Integrin $\alpha\beta3$ iki bağlanma bölgesi içerir. S1 özellikle T3 hormonunu tanır ve fosfatidilinositol 3-kinaz'ı (PI3K) Src kinaz aracılığı ile aktive eder. S2 bölgesi mitojenle etkileşen protein kinaz 1 (MAPK1) ile MAPK2 aktivitesini düzenler ve T3 ile T4 hormonlarının her ikisini de bağlar. S2 bölgesi T4'e olan affinitesi S1 veya S2 bölgesinin T3'e olan affinitesinden daha fazladır. Her hormon bağlayıcı bölgenin spesifik aşağı akış etkisi vardır. Örneğin, S1 $TR\alpha$ 'yı sitoplazmadan çekirdeğe yönlendirir ve HIF1A transkripsiyonuna sebep olur; bu fonksiyonlar Src ve PI3K bağımlıdır. S2 MAPK1 ve MAPK2'yi aktive etmesi tümör hücrelerinin proliferasyonuna ve $TR\beta1$ 'in sitoplazmadan çekirdeğe alınmasına sebep olur (Lin ve ark., 2009). Tiroid hormonları (T3 ve T4) hücre içi pH'yı plazma membranındaki fosfolipaz C ve MAPK'ı ve intrasellüler pH'nın önemli regülatörü olan sodyum/hidrojen antiport taşıyıcısını genomik olmayan yolla kontrol ederek düzenler (D'Arezzo ve ark., 2004). Nöronlardaki sodyum akımı yine genomik olmayan mekanizmalar ile integrin $\alpha\beta3$ bağımlı olarak tiroid hormon ile artırılır (Yonkers ve Ribera, 2009; Cao J ve ark., 2011). Son olarak plazma membranında amino asit transportu da genomik olmayan mekanizmalar ile T4 hormonuyla artmaktadır (Zanatta ve ark., 2013).

Tiroid hormonları geri bildirimle tiroid eksenini TRH gen transkripsiyonunu ve TSH sentez ve salınımını inhibe ederek baskılar. Tiroid hormonu negatif geri bildirimle inhibe etmede o kadar güçlüdür ki, ortadan kalktığı zaman tirotrop hücre proliferasyonu ve TSH üretimi tekrar başlar. Bu sebeple tedavi edilmemiş tiroid bezi bozukluklarında

tiotrop hücre negatif geri bildirim inhibisyonu azalır ve takiben yüksek miktarda TSH sentezi gerçekleştiğinden kan TSH seviyeleri yükselir. Bunun da ötesinde tiroid hormonlarının tiotrop hücre proliferasyonunu baskılamasını sağladığı için, düşük tiroid hormon seviyesine sahip hastalarda tiotrop hiperplazisi görülebilir (Melmed, 2017).

Tiroid hormonlarının aktivasyonu veya inaktivasyonu deiyodinaz veya iyodür peroksidaz (DIO) olarak bilinen enzimler aracılığıyla gerçekleştirilir (Gereben ve ark., 2008). Memelilerde üç tip deiyodinaz tanımlanmıştır: tip 1 (DIO1), tip 2 (DIO2) ve tip 3 (DIO3) deiyodinaz. DIO1 ve DIO3 plazma membranında bulunurken, DIO2 endoplazmik retikulumda bulunur (Gereben ve ark., 2008). Deiodinazlar hücrelerde tiroid hormonu eylemini başlatır veya sonlandırırlar ve bu nedenle de tiroid hormonlarının aracılık ettiği biyolojik etkiler için kritik öneme sahiptirler. DIO1 ve DIO2 prohormon olan T4'ün deiyodinasyonla biyoaktif T3'e dönüştürülmesinde rol oynar; bu olay genellikle karaciğer ve böbrekte gerçekleşir. DIO1 fenolik ve tirozil halkanın ikisinin deiyodinasyonunu katalizler ve tiroid, karaciğer, böbreklerde eksprese edilir. DIO2 ise sadece fenolik halkanın deiyodinasyonunu katalizler ve merkezi sinir sistemi, tiroid, iskelet kası, kahverengi yağ dokusunda eksprese edilir (Bianco ve Conceição, 2018). Bununla birlikte, DIO3 hem aktif hormon T3'ü hem de prohormon T4'ü, tirozil halkasının deiyodinasyonu yoluyla inaktif metabolitler olan 3,3'-diiodotironin (T2) ve 3,3', 5'- Tri-iyodotironin (ters T3 veya rT3)'e dönüştürerek biyolojik olarak inaktif hale getirilebilir (Bianco ve ark., 2002; Kuiper ve ark.; Dentice ve Salvatore, 2011). Dolayısıyla, tiroid hormonlarını aktive eden DIO1 ve DIO2'nin aksine, DIO3 tiroid hormonları aktivitesinin fizyolojik bir sonlandırıcısıdır (Huang, 2005).

2.1.6. Tiroid Bezi Bozuklukları

İki ana tiroid bezi hastalığı türü hipotiroidizm ve hipertiroidizmdir. Her iki duruma da tiroid bezinin çalışma şeklini etkileyen başka hastalıklar neden olabilir.

2.1.6.1. Hipertiroidizm

Hipertiroidizm tiroid bezinden aşırı miktarda tiroid hormonunun sentezlenip salgılandığı patolojik bir bozukluktur. Hipertiroidizme neden olabilecek durumlar şunlardır:

Graves hastalığı: Bu durumda tüm tiroid bezi aşırı aktif olabilir ve çok fazla hormon üretebilir. Bu soruna genel olarak toksik guatr (tiroid bezinin büyümesi) da denir. Tiroid

stimüle edici hormon reseptörlerine karşı otoantikor üretiminin neden olduğu otoimmün bir hastalıktır (Liu ve ark., 2015).

Nodüller: Hipertiroidizm, tiroid içinde aşırı aktif olan nodüllerden kaynaklanabilir.

Tiroidit: Bu bozukluk ya ağrılı olabilir ya da hiç hissedilmeyebilir. Tiroiditte tiroid, orada depolanan hormonları salgılar. Bu birkaç hafta veya ay sürebilir.

Aşırı iyot: Vücutta çok fazla iyot bulunduğunda, tiroid ihtiyaç duyduğundan daha fazla tiroid hormonu üretir

Hipertiroidizm tipleri şunlardır:

- a. Primer hipertiroidizm: Düşük TSH, yüksek serbest T4, normal TRH stimülasyon testi bulgusu vardır.
- b. Sekonder hipertiroidizm: Yüksek TSH, anormal TRH stimülasyon testi bulgusu vardır.
- c. Subklinik hipertiroidizm: Düşük TSH ($<0.1 \mu\text{IU} / \text{ml}$), normal T3 ve T4 düzeyleri izlenir (Biondi ve ark., 2005). Levotiroksin ile TSH baskılayıcı tedavi veya aşırı hormon replasmanı (Biondi ve ark., 2005) nedeniyle ekzojen tiroid hormonuna bağlı olabilir (Batrinos, 2006). Aşırı tiroid hormonu, farklılaşmış tiroid kanserine bağlı olabilir (Biondi ve ark., 2005).
- ç. T3 hipertiroidi: Hipertiroid hastalarının %1-4'ünde rastlanır. Düşük TSH, yüksek serbest T3, normal serbest T4 düzeyleri görülür. Hipertiroidizmin antitiroid ilaçlarla erken tedavisi ile ilişkilidir.
- d. T4 hipertiroidizmi : Yüksek T4, normal T3 düzeyleri görülür.

Hücre düzeyinde T3 termogenezisde ve bazal metabolizmada artış şekillendirir. Bu durum kilo kaybı, yorgunluk ve ısıya intolerans gelişmesine neden olur. Ayrıca kardiovasküler sistemi de etkileyerek taşikardi ve hipertansiyon oluşmasını da sağlar (Doubleday ve Sippel, 2020). Bunun yanı sıra, endişe, sinirlilik, uyumakta güçlük, büyümüş bir tiroid bezi (guatr olması), kas güçsüzlüğü ve titreme ve görme sorunları belirgin diğer septomlardır. Hipertiroidi durumunda tiroid bezinde foliküler epitel hücrelerinin şeklinde, aynı zamanda folikül içerisindeki kolloid miktarında değişiklikler meydana gelir (Ferreira, 2007).

2.1.6.2. Hipotiroidizm

Hipotiroidizm tiroid hormon yetersizliğiyle karakterize patolojik durumu tanımlar (Chaker, 2017).

Hipotiroidizme neden olabilecek durumlar şunlardır:

a. Tiroidit: Bu durum tiroid bezinin iltihaplanmasıdır (şişmesidir). Tiroidit, tiroid bezinin ürettiği hormon miktarını düşürebilir.

Hashimoto tiroiditi: Ağrısız bir hastalık olan Hashimoto tiroiditi, vücut hücrelerinin tiroide saldırıp zarar verdiği otoimmün ve aynı zamanda kalıtsal bir hastalıktır.

Doğum sonrası tiroidit: Bu durum doğumdan sonra kadınların % 5 - 9'unda görülen ve genellikle geçici olan bir durumdur.

İyot eksikliği: İyot, tiroid tarafından hormon üretmek için kullanılır. İyot eksikliği, dünya çapında birkaç milyon insanı etkileyen bir sorundur.

Çalışmayan bir tiroid bezi: Bazen tiroid bezi doğumdan itibaren düzgün çalışmaz. Bu yaklaşık 4,000 yenidoğanda 1'i etkiler. Tedavi edilmezse, çocuğun gelecekte hem fiziksel hem de zihinsel sorunları olabilir.

Hipotiroidizmde yaygın olarak yorgunluk, letarji, soğuk intolerans, kilo artışı, cilt kuruluğu, konstipasyon görülür (Carlé ve ark., 2015). Histolojik olarak hipotiroidili hayvanların tiroid bezinde hem folikül epitel hücreleri hem de C hücreleri hiperaktivite belirtileri gösterirler. Hem epitel hücrelerinin yüksekliğinde hem de C hücrelerinin sayısında bir artış şekillenir (Elkalawy ve ark., 2013).

2.2. Tiroid bezi hormonları ve Sinir sistemi

Tiroid hormonları beynin olgunlaşması ve hayat boyu süren işlevi için gereklidir. Bu hormonlar genel olarak nöral gelişimin son aşamasında etkilidirler (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK285549>, Erişim tarihi: 21 Ocak 2021). Bazı çalışmalarda yetişkinlerde tiroid hormonunun nörogenez üzerindeki etkisi gösterilmiştir (Remaud ve ark., 2014; Kapoor ve ark., 2015). Yetişkin hipotiroidizmli sıçanlar öğrenmede yetersizlikler ve depresyon belirtileri gösterir (Fundaro, 1989; Kulikov ve ark., 1997). Yetişkin nörogenez; nöropsikiyatrik durumlar, bilişsel eksiklik ve depresyonla ilgilidir. Nörogenez genel olarak iki bölgede gerçekleşir: subventriküler alan (SVA) ve subgranüler alan (SGA). SVA lateral ventrikül yüzeyinin altında

bulunur, yetişkin rodentlerde olfaktorik bulb inter nöronlarını üretir. SGA dentat girusun granüler katmanının yanında bulunur ve granüler nöronları üretir. Hipotiroidizm bu alanlardaki nörogenezi baskılar ve ekzojen tiroid hormon verilmesi nörogenezi uyarır (Ambragini ve ark., 2005; Montero-Pedrazuela ve ark., 2006). T3 hormonu SVA'da nöronal prekürsörlerin diferensiyasyonunu artırır ve nöral kök hücrelerin nöroblastlara dönüşümünü teşvik eder (Kapoor ve ark., 2012). T3'ün embriyonik ve yetişkin nörogenez etkilerini baskın olarak TR α 1 sağlamaktadır (Denver ve ark., 2009; Chen ve ark., 2012).

2.2.1. Hipokampal oluşum

Beyinde iki tür serebral korteks bulunur: allokorteks (heterojenik korteks) ve neokorteks. Allokorteks, korteksin yalnızca yüzde onunu kaplayan çok daha küçük alanıdır; neokorteks ise kalan yüzde 90'ı kaplar. Neokorteks altı kortikal katmandan (sinir hücreleri katmanı) oluşurken, allokorteks yalnızca üç veya dört kortikal katmana sahip olmasıyla karakterize edilir (Strominger ve ark., 2012). Allokorteksin üç alt tipi vardır: paleokorteks, arkikorteks ve periallokorteks (Filimonoff, 1947).

Paleokorteks, üç kortikal laminadan oluşan ince, ilkel bir kortikal doku türüdür (<http://braininfo.rprc.washington.edu/centraldirectory.aspx?type=a&ID=2336>, erişim tarihi: 20 Aralık 2020). Neokorteksin iki granüler tabakası II ve IV, paleokortekte bulunmaz. Paleokorteksin ana alanları bulbus olfactoryus, koku alma tüberkülü ve piriform kortekstir.

Arkikorteks, dört adet laminadan oluşan bir kortikal doku türüdür. (D'Udine ve Gozzo, 1983) Arkikorteksin ana alanları hipokampus ve dentat girus'tur.

Periallokorteks, neokorteks ile paleo- veya arki-korteks arasındaki geçiş formudur. Bu nedenle periallokorteks alanları peripaleokorteks (anterior insular korteks) veya periarkikorteks (entorinal korteks, prekubiküler korteks, retrosplenial, suprakallozal ve subgenual alanlar) olabilir.

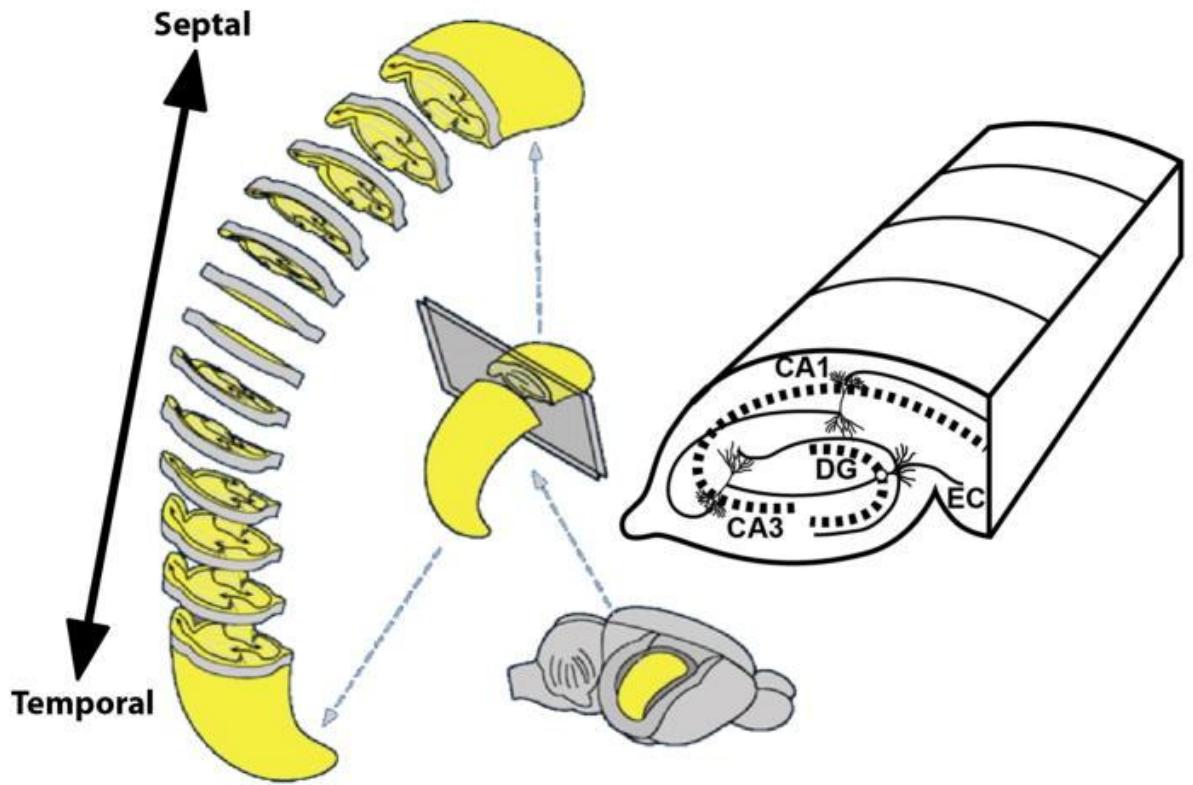
2.2.1.1. Hipokampal oluşumun Anatomik Yapısı

Hipokampus at anlamına gelen Yunanca "Hippus" ve deniz canavarı anlamına gelen "kampos" sözcüklerinden türetilmiştir. Şekil olarak denizatına benzetilmiştir. Bu özellik, ayrıntılar farklılık gösterse de, kirpiden insana kadar tüm memeli türleri için geçerlidir. Örneğin, farede, iki hipokampus, saplarından birleştirilmiş bir çift muza

benzer. Hipokampal yapılar, arkikorteksin medial temporal lob içine doğru yaptığı kıvrımlar olup temporal lobların medial kısımlarının her birinde birer tane olmak üzere beynin uzunlamasına eksenini boyunca uzanır ve lateral ventriküllerin medial duvarlarını oluşturur. İnsanlar da dahil olmak üzere primat beyinlerinde, hipokampüsün temporal lobun tabanına yakın kısmı, üst kısımdakinden çok daha geniştir. (Dekeyser ve ark., 2017). Sıçan hipokampüsü, serebral korteksin ventroposterior ve ventrolateral duvarında geniş bir yer kaplamaktadır (Bayer, 1985).

2.2.1.2. Hipokampüsün Histolojik Yapısı

Hipokampal oluşum, beynin medial temporal lobunda yerleşen bileşik bir yapı olup filogenetik olarak beynin en eski kısımlarından biridir ve limbik sistemin bir parçasını oluşturur. Hipokampal oluşum teriminin hangi beyin bölgelerini kapsadığına dair bir fikir birliği bulunmamaktadır. Bazı yazarlar hipokampal oluşumun dentat girus, kornu ammonis ve subikulum'dan oluştuğunu belirtirken (Martin, 2003), diğerleri ayrıca presubikulum, parasubikulum ve entorinal korteksi de içerdiğini ileri sürmektedirler (Amaral ve Lavenex, 2007). Burada hipokampal oluşumun arkikorteksin medial temporal lob içine doğru yaptığı kıvrımlar olduğu bilgisi doğrultusunda birinci görüş dikkate alınarak hipokampal oluşum kornu ammonis (CA), dentat girus (DG) ve subikulum olarak bölümlenmiştir.



Şekil 2.2.1. Sıçan hipokampüsünün genel yapısı (Yu ve Song, 2014)'den alınmıştır. CA: Kornu ammonis, DG: Dentat girus, EC: Entorinal korteks.

Anatomik olarak lateral ventrikülün alt boynuzunun tabanında yerleşen hipokampüste dentat girus ve kornu ammonisin her ikisi yatay yerleşmiş U veya V harfi şeklinde koyu bir bant halinde dizilen iki hücre kümesi şeklinde görülür. Kornu ammonisin U veya V harfinin açık uçlarından biri dentat girus içine uzanır. Bu kısım CA3c veya hilus olarak adlandırılır. Dentat girus dentat fasiya (fascia dentate) ve hilusu içerirken, CA anatomik ve fonksiyonel olarak CA1, CA2 ve CA3 olarak adlandırılan sıkıca paketlenmiş piramidal nöronlara sahip farklı alt bölgelere ayrılır. CA3 bölgesi, hafıza süreçlerindeki özel rolü, nörodejeneratif hastalıklara karşı duyarlılığı nedeniyle son yıllarda araştırmacıların ilgi odağı olmuştur (Cherubin ve Miles, 2015). CA3, CA3a, CA3b ve CA3c olarak bilinen bölgelere ayrılır. CA3c, DG'a en yakın olan hilusa giren kısımdır. CA3a, DG'den en uzakta olan bölümdür ve CA3b ikisi arasında yer alır (Ishizuka ve ark., 1990; Wible, 2013).

Ventriküler yüzeyden itibaren dentat girusa kadar CA şu katmanlardan oluşur:

1. Dış pleksiform katman,
2. Stratum oriens
3. Stratum pyramidale
4. Stratum radiatum
5. Stratum lakunozum
6. Stratum molekölare

(<https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/hippocampus-structure-and-functions>, Erişim tarihi: 21 Aralık 2020).

Hipokampüsün ventriküler yüzeyini örten fornıksden çıkan sinir telleri alveus adı verilen ince beyaz bir bant şeklinde görülür. Hipokampüs, uyarıcı girdisinin çoğunu entorinal korteksten alır. Entorinal korteksten hipokampüse uzanan iki sinir yolağından biri alvear yolaktır. Alvear yolak ilk olarak Cajal tarafından tanımlanmış olup, entorinal korteksin medial bölgesindeki nöronlardan çıkan afferent sinir tellerinden oluşur. Alvear yolağı oluşturan sinir telleri alveus yoluyla CA1 bölgesine ulaşırlar ve buradaki piramidal hücrelerin bazılarının dendritlerinde sinaps yaparlar (<https://aaushi.info/A14084>, Erişim tarihi: 20 Ocak 2021). Diğer sinir yolağı perforant yolaktır. Hipokampal oluşum boyunca trisinaptik devrenin birinci sinir teli yolu olan perforant yolak entorinal korteksten dentat girus, tüm CA alanları (CA1 dahil) ve subikulum dahil olmak üzere hipokampal oluşumun tüm alanlarına bağlantı sağlar. Perforant yolağın sinir telleri, kökenlerini esas olarak lateral entorinal korteksin II ve III. katmanlarında bulunan nöronlardan alır, ancak tellerin daha küçük bir kısmı V. katmandan kaynaklanır. Entorinal korteksi terk ettikten sonra, sinir telleri alttaki alba (substantia alba) katmanını ve daha sonra subikulumun piramidal hücre katmanını geçerler ve dentat girusa girmek için hipokampal fissürü geçerler veya subikulumun molekölare katmanına ve hipokampusun CA alanlarına dağılırlar. Entorinal korteksin II. katmanındaki yıldız hücrelerinin sinir telleri dentat girus ve CA3 bölgesini, III. katmanındaki piramidal

hücrelerden gelen sinir telleri ise CA1 ve subiculumu hedef alır (van Groen ve Miettinen, 2003).

1. Dış pleksiform katman: Kornu ammonisin dış pleksiform katmanı, lateral ventrikülün inferior (alt) boynuzunun yakınında bulunur ve piramidal hücrelerin aksonları ile alvear yolağın sinir tellerini içerir.

2. Stratum oriens: İnhibitör sepet hücrelerin ve yatay trilaminer hücrelerin hücre gövdeleri bu katmanda bulunur. Trilaminer hücrelerin aksonları oriens, piramidal ve radiatum katmanlarını innerve ettiğinden bu adla anılırlar. Piramidal nöronların bazal dendritleri de burada bulunur.

3. Stratum pyramidale: Hipokampusün başlıca uyarıcı nöronları olan piramidal nöronların hücre gövdelerini içerir. Bu tabaka aynı zamanda akso-aksonik hücreler, iki tabakalı hücreler ve radyal trilaminer hücreler gibi birçok inter nöronun hücre gövdelerini içerir. CA3 bölgesinde, stratum lusidum adı verilen hücresel olmayan dar bir bölge, piramidal hücre katmanının hemen üzerinde yer alır. Bu tabaka dentat girusun granüler hücrelerinin aksonları olan Mossy tellerini içerir. Stratum lusidum'un uzak ucunda, Mossy tellerinin ventral olarak büküldüğü tabakada hafif bir kalınlaşma vardır. Bu CA3 ve CA2 sınırını belirtir. Kornu ammonis ve subiculumun dominant nöronları piramidal hücrelerdir. Nöronların büyüklükleri ve yoğunlukları hipokampus boyunca değişiklik gösterir. Piramidal hücrelerin dendritik uzantıları eksitator sinaptik iletimin esas yerleridir. Bu hücrelerin dendritlerinde çok sayıda dikensi yapılar görülür (Turner ve ark., 1998). Son yıllarda yapılan çalışmalarda dendritik çıkıntıların oldukça dinamik yapılar olduğu gösterilmiştir. Bu çıkıntılarda öğrenme ve hafıza gibi fizyolojik durumlarda değişimler gözlenmiştir. Ayrıca CA1 bölgesindeki dendritik çıkıntıların yaşlanmış sıçanlarda ve Alzheimer'lı hastalarda azaldığı rapor edilmiştir (Ruan ve ark., 2006; Wible, 2013).

4. Stratum radiatum: Stratum oriens'e benzer olarak septal ve komissural teller içerir. Ayrıca, CA3'ten CA1'e doğru uzanan Schaffer kollateral sinir tellerini de içerir. Bu tabakada sepet hücreleri, iki tabakalı hücreler ve radyal trilaminer hücreler gibi birçok inter nöronun hücre gövdeleri bulunabilir.

5. Stratum lakunozum: Schaffer kollateral sinir tellerini ve aynı zamanda entorhinal korteksin yüzeysel katmanlarından gelen perforant yolağın sinir tellerini de içeren ince bir tabakadır.

6. Stratum molekölare: Hipokampustaki en yüzeysel tabakadır. Burada perforant yolağın sinir telleri piramidal hücrelerin distal, apikal dendritleri üzerinde sinapslar oluşturur (https://en.wikipedia.org/wiki/Hippocampus_anatomy, Erişim tarihi: 30 Aralık 2020). Küçük boyutu nedeniyle, genellikle stratum molekölare ile birlikte stratum lakunozum-molekölare adı verilen tek bir katman olarak tanımlanır.

Kornu ammonisin CA2 ve CA3 bölgeleri, birbiri üzerinde yakın şekilde paketlenmiş birkaç katman oluşturan büyük piramidal hücrelerin varlığı ile karakterizedir. Her iki alan da CA1 ve subikuluma benzer katmanlı bir görünüme sahiptir. Sıçanda şu özellikler CA3'ü CA2'den açıkça ayırır: CA2'nin piramidal hücre katmanı, bitişik CA3'tekinden biraz daha kalın olma eğilimindedir ve CA3 nöronları ile benzer boyuttaki büyük hücrelerin, küçük nöronlar ve CA1 nöronlarına benzer boyuttaki nöronların bir karışımıdır. CA3, CA2'de neredeyse hiç bulunmayan güçlü kalbindin pozitif Mossy telleri ile karakterizedir (http://cmbn-navigator.uio.no/rat_hippocampus_atlas/Structures/CA1.html, Erişim tarihi: 21 Aralık 2020).

Dentat girus üç katmandan oluşur:

1. Pleksiform veya moleküler katman,
2. Granüler hücre katman,
3. Polimorfik katman (Hilus).

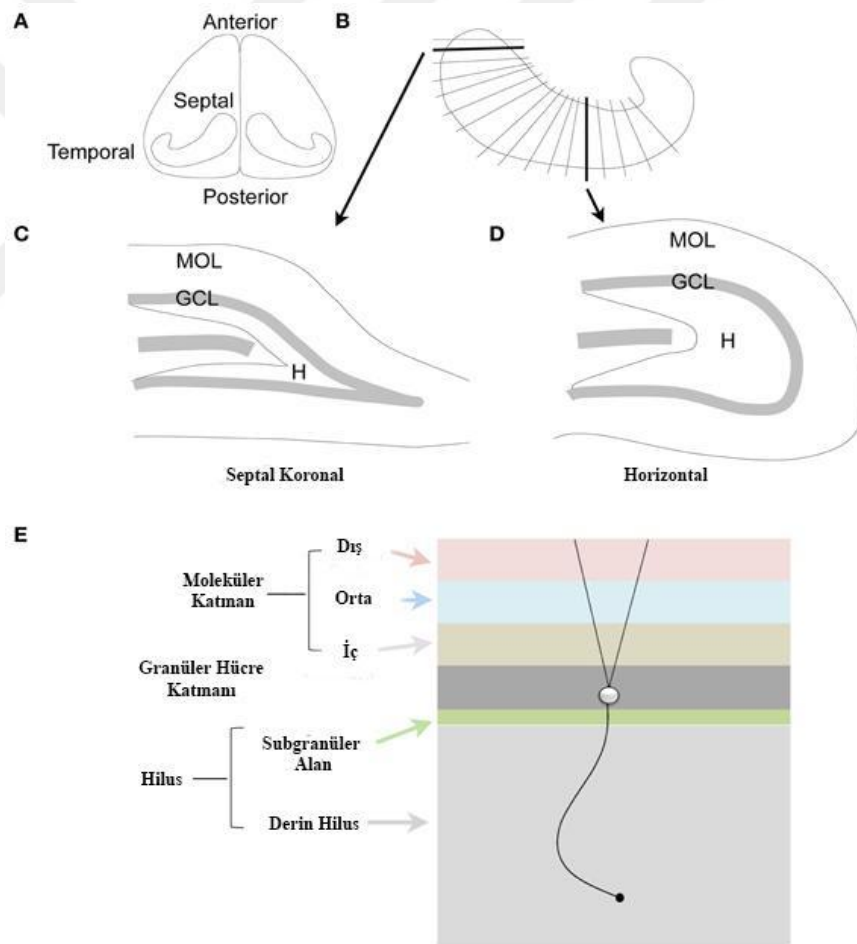
Granüler hücre ve moleküler katmanlar dentat fasiya (fascia dentate) olarak da adlandırılır.

1. Pleksiform veya moleküler katman: Kornu ammonisin moleküler katmanının yanındaki konumu nedeniyle bu şekilde adlandırılan dentat girusun moleküler katmanı granüler hücrelerin, polimorfik katman hücreleri ve piramidal sepet (basket) hücrelerinin dendritlerini ve terminal entorhinal korteks ile diğer birkaç bölgenin (presubikulum, parasubikulum) nöronlarının aksonlarını içerir. Perforant yolağın sinir telleri bu tabakadan geçerek, granül hücrelerin distal apikal dendritlerinde uyarıcı sinapslar oluşturur. Moleküler katman, yaklaşık olarak aynı genişlikte üç bölgeye bölünmüştür: dış moleküler katman; orta moleküler katman ve iç moleküler katman.

Moleküler katman içinde başlıca iki sinir hücresi tipi vardır:

a. MOPP hücresi (perforant yolla ilişkili moleküler katman hücresi): Bu hücreler moleküler katmanın derinliklerinde bulunan ve moleküler katmanın dış üçte ikisinde sonlanan üçgen gövdeli multipolar sinir hücreleridir.

b. "Avize" benzeri hücreler: Granüler hücre katmanının yüzeysel kısmına bitişik bulunan bu hücreler akso-aksonik hücreler olarak da adlandırılır. Çok sayıda kollaterallere sahiptirler ve granüler hücrelerin akson başlangıç segmentlerinde sonlanırlar. Bu hücrelerin her biri yaklaşık 1000 adet granüler hücreyi innerve eder. Bu hücreler GABA salar ve granüler hücreler üzerinde inhibe edici etkiye sahiptirler. Moleküler katmanın iç üçte birlik bölümü, yalnızca polimorfik katmandan uzantılarını alır (Amaral ve ark., 2007).



Şekil 2.2.2. Kemirgen dentat girusu (DG). (A) Kemirgen hipokampusünün dorsal görünümü. (B) Hipokampusün katmanlı organizasyonunun şeması. Koronal düzlemde ve yatay düzlemde oklarla gösterildiği gibi iki bölüm gösterilmiştir. (C) Septal hipokampüsten bir koronal kesit gösterilmektedir. MOL, moleküler katman; GCL, granül hücre katmanı; H, hilus. (D) Temporal hipokampüsten yatay bir kesit gösterilmektedir. (E) DG'nin laminar organizasyonu, dendritlerin yönünü ve Mossy teli olarak adlandırılan granül hücre aksonu tek bir granül hücrede gösterilmiştir.

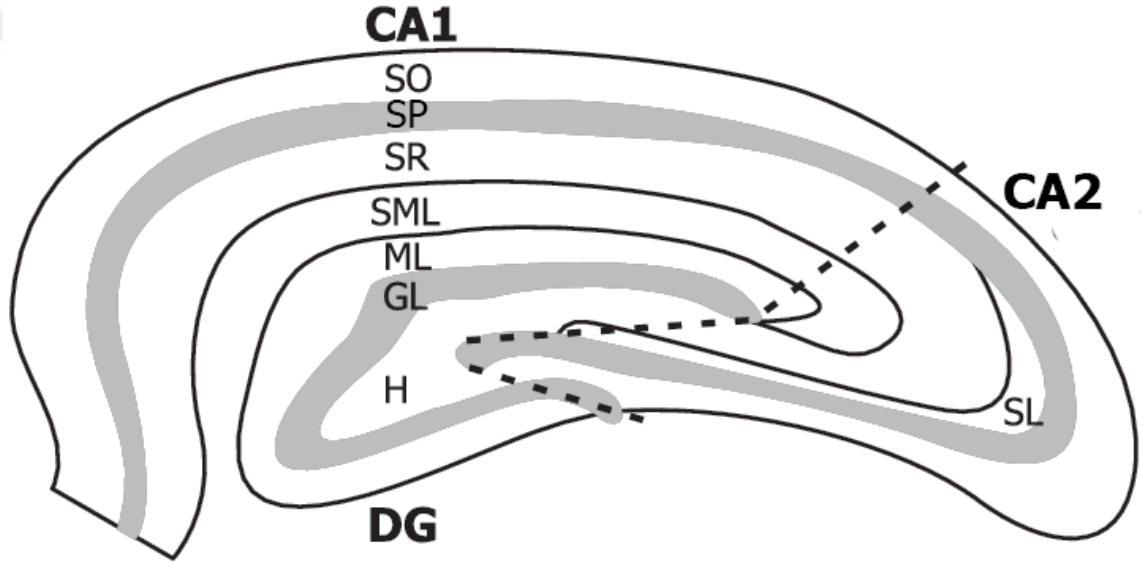
Moleküler katman, yaklaşık olarak aynı genişliğe sahip üç bölgeye ayrılmıştır: dış moleküler katman (açık kırmızı); orta moleküler katman (açık mavi); ve iç moleküler katman (açık kahverengi). Granül hücre katmanı (koyu gri), birkaç yoğun şekilde paketlenmiş granül hücre katmanına sahiptir. Granül hücre katmanının altında, hilar nöronları ve granül hücrelerin öncüllerini içeren küçük bir subgranüler bölge (açık yeşil) bulunur. Hilus, subgranüler bölgeyi ve CA3c alanıyla biten daha geniş bir alanı içerir. CA3c yakınındaki bölge bazen derin hilus (açık gri) olarak adlandırılır. (Scharfman ve Myers, 2013)'den alınmıştır.

2. Granüler hücre katmanı: Bu katman dentat girusun ana katmanıdır ve esas olarak birbirine yakın bir şekilde paketlenmiş granüler nöronlardan oluşur. Bu nöronlar yaklaşık 10 µm genişliğinde ve 18 µm yüksekliğinde eliptik bir hücre gövdesine ve bir koni şekilli dikenli apikal dendrit ağacına sahiptir. Dendrit dalları tüm moleküler katman boyunca dağılır ve dendritik ağacın en uzak uçları hipokampal fissürde veya ventriküler yüzeyde sonlanır. Bu granüler hücrelerin aksonlarına Mossy telleri de denir (Hestings ve ark., 2001). Mossy iplikleri CA3'deki piramidal hücreler ile sinaps yaparlar. Hipokampusta dentat girus nöronlarının kaybı, uzamsal hafıza yetersizliklerine neden olur. Bu nedenle dentat granül hücrelerin uzamsal anıların ve epizodik anıların oluşumunda görev yaptığı düşünülmektedir. Olgunlaşmamış ve olgun dentat granül hücreleri hafıza işlevinde farklı rollere sahiptir.

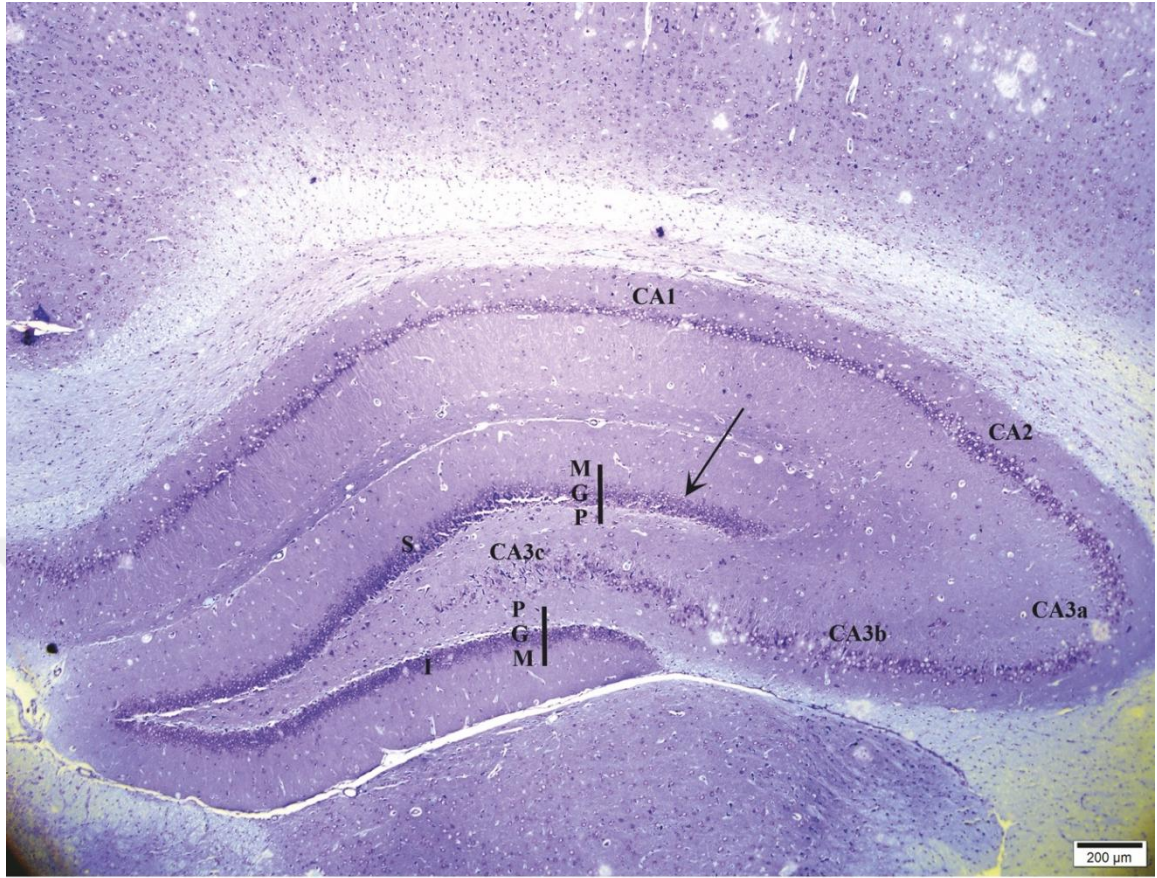
Granüler hücre katmanı ile polimorfik hücre katmanı arasındaki sınırdaki morfolojileri, aksonal uzantıları ve peptit içerikleri farklı olan birçok inter nöron bulunur. Bu inter nöronlar basket hücreleri olarak adlandırılırlar. Sıçanın dentat girusunda beş farklı tip basket hücresi bulunmuştur. Bu hücrelerin hücre gövdeleri piramidal, horizontal, mekik biçiminde veya multipolar şekilde olabilir. Dendritleri spinsizdir veya çok az sayıda spin (dikensi çıkıntı) içerir ve dentat girusun tüm katmanlarında bulunur. Aksonları, granüler hücre katmanında ve moleküler tabakalarda geniş bir pleksus oluşturur (Ribak ve Seress, 1983).

3. Polimorfik katman veya hilus: Polimorfik katman veya hilus, granül hücre katmanının içinde yer alır. Hilus önceleri başka terimlerle tanımlanmıştır: alan H5, CA3c veya polimorfik bölge gibi. Hilus, subgranüler bölgeyi ve CA3c alanıyla biten daha geniş bir alanı içerir. CA3c yakınındaki bölge bazen derin hilus olarak adlandırılır. Dentat girus hilus etrafında suprapiramidal ve infrapiramidal bölge olmak üzere iki kısma ayrılır (Schmidt ve ark., 2012). Granül hücre katmanının altında, hilar nöronları (Mossy hücreleri) ve granül hücrelerin öncüllerini içeren küçük bölge subgranüler bölge

olarak adlandırılır. Hilusda en bol bulunan hücreler Mossy hücreleridir. Görünümleri yosun kaplı bir hücreye benzediği için "yosunlu (Mossy) hücreler," olarak adlandırılmıştır. Hilar Mossy hücreleri fare, kobay, gerbil, hamster ve primatlarda tanımlanmıştır (Scharfman ve Myers, 2013). Polimorfik tabakada Mossy hücrelerinin yanı sıra füziform (mekik şekilli) hücreler de vardır. Bu hücrelerin çeşitli alt tipleri vardır, ancak hepsi moleküler katmanın dış üçte ikisine uzanır ve GABA / somatostatin salarlar (Amaral ve ark., 2007).



Şekil 2.2.3. Rat hipokampus diyagramı. Kesikli çizgi CA1'i CA2'den ayırır; SO: Stratum oriens, SP: Stratum pyramidale, SR: Stratum radiatum, SML: Stratum molekulare, ML: Dentat girusun moleküler katmanı, GL: Granuler hücre katmanı, H: Dentat girus katmanı, SL: stratum lucidum (Kaynak: Jiang ve Swann, 1997).



Şekil 2.2.4. Sıçanlarda hipokampusün histolojik görünümü. Ok: Dentat girus, M: Moleküler katman, G: Granüler katman, P: Pleomorfik katman, S: Supra-piramidal katman, I: Infra-piramidal katman, CA: Kornu ammonis. Krezil Violet Asetat boyaması.

Subiküler korteks, hipokampus ile entorinal korteks arasındaki geçiş alanını temsil eder. Hipokampus ve subiküler korteks arasındaki temel ayırt edici özellik, subiküler kortekste piramidal hücre katmanının hipokampusta olduğundan önemli ölçüde daha kalın olmasıdır (<https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/hippocampus-structure-and-functions>, Erişim tarihi: 21 Aralık 2020).

2.2.1.3. Hipokampusün Fonksiyonu

Hipokampus tipik olarak trisinaptik devre bağlamında tanımlanır. Bu, perforant yolaktan dentat girusa, dentattan CA3'e ve CA3'den CA1 alanına bilgi aktaran bir yol olarak ifade edilir. Limbik sistemin bir parçası olan hipokampus kısa ve uzun süreli bellekte bilgilerin birleştirilmesinde ve navigasyonu mümkün kılan uzamsal bellekte önemli roller oynar (Watson ve ark., 2013).

Bildirimsel hafızada hipokampüsün görevi birden fazla girdiyi birbirine bağlayarak sahneleri ve olayları meydana getiren elementlerle ilişkili depoların oluşturulmasını sağlamaktır (Cohen ve ark., 1999). Bu fonksiyon kortikal bölgeler boyunca uzun süreli hafızanın depolanmasını sağlar. Hipokampüs korteks bölgeleri boyunca, medial temporal lobda bulunan yüksek derecede birbiriyle bağlantılı bir grup beyin alanları aracılığı ile iletişimde. Dolayısıyla hipokampüsün anormal aktivasyonu özellikle hipokampus ile yüksek derecede bağlantı gösteren algısal kortikal alanları etkiler (Wible, 2013). Entorhinal korteks hipokampüsün en büyük girdisini oluşturur ve aynı zamanda CA1'in subikulum aracılığı ile çıktısını alır (Witter ve Amaral, 1991). Entorhinal korteks hipokampüse iki yol ile girdi sağlar; birisi dentat girusa ve CA3'e uzanır, diğeri CA1 ve subikulumuza uzanır. Sonrasında subikulum geri entorhinal kortekse büyük bir girdi gönderir (Wible, 2013). Entorhinal korteksin perirhinal ve parahipokampal korteksler ile kendi ana çift yönlü bağlantısı vardır. Bu nedenle hipokampüs kortikal alanlar boyunca entorhinal, perirhinal ve parahipokampal korteksler aracılığıyla iletişim kurar (Lavenex ve Amaral, 2000.; Lavenex ve ark., 2002; Suzuki ve ark., 1994). Hipokampüs aynı zamanda uzunlamasına sinir teli yolları da bulundurur (Sloviter ve Lomo, 2012.). Bu oluşum hipokampal oluşumun farklı parçaları arasındaki uyarıma izin verir. Hipokampüsün fizyolojisi kendine özgüdür ve öğrenme ile hafıza için önemli olan yüksek plastisite gösterir. Hipokampüs bazı memeli türlerinde beyindeki yeni nöron oluşturabilme yeteneğini koruyabilen birkaç bölgeden birisidir (Eriksson ve ark., 1998; Kempermann ve Gage, 2000). Hipokampüste nöroenez görülür; bu yüzden yaşam boyu değişiklikler gösterir (Epp ve ark., 2013). Hipokampüsün özellikle CA1 katmanı beyindeki en fazla N-Metil-D-aspartat (NMDA) konsantrasyonuna sahiptir (Cotman ve Monaghan, 1986). NMDA reseptörleri hafıza ve öğrenmeyi sağladığı düşünülen uzun-dönemli potansiyasyonun (LTP) temelini oluşturan glutamat reseptörüdür (Bliss 1973).

2.2.1.4. Tiroid hormonları, hipokampüs, glikoz ve otofaji arasındaki ilişki

2.2.1.4.1. Bilişsel performans, glikozun beyine yeterli miktarda ulaşması ve tiroid hormonları arasında doğrudan bir bağlantı vardır

Beyin için önemli bir metabolik substrat olan glikoz ile bilişsel performans arasında doğrudan bir bağlantı vardır. Hem sistemik hem de doğrudan intraserebral glikoz uygulamasının çeşitli türlerde beyin bölgesine bağlı olarak belleği (hafızayı) modüle

ettiği bilinmektedir (Hall ve ark.,1989; Parsons ve Gold, 1992; Gold, 1995; Manning ve ark., 1998; Erickson ve ark., 2006; Hoyland ve ark., 2008; Krebs-Kraft ve Parent, 2008). Glikozun belirli beyin bölgelerine mikroyenjeksiyonu bellek oluşumu üzerinde kolaylaştırıcı etkilere sahiptir ve birçok durumda sistemik glikoz uygulamasının etkilerini taklit eder (Ragozzino ve ark., 1998; Canal ve ark., 2005). Beyin glikoz metabolizması başta insulin olmak üzere tiroid hormonları (TH) ve glikokortikoidler tarafından düzenlenir. TH hem sistemik glikoz metabolizmasını ve hem de beyin glikoz metabolizmasını düzenleyen önemli regülatörlerdendir (Boelen 2009; Jahagirdar ve McNay, 2012). TH, ön hipofizden salgılanan tiroid uyarıcı hormonu (TSH) tarafından uyarıldığında tiroid bezinde sentezlenir ve salgılanır. Prohormon tiroksin (T4) dokulara taşınır ve deiyodinazlar adı verilen enzimler tarafından hücrelerde triiodotironin (T3) haline dönüştürülür (Bianco ve ark., 2002).

Her iki hormonun sistemik etkileri vardır. Anormal tiroid hormonu seviyeleri hipotiroid (tiroid bezi yetersizliği) ve hipertiroidi (tiroid bezinin fazla çalışması) durumlarına yol açar. Gelişme sırasında yetersiz tiroid hormonu, doğuştan gelen hipotiroidi (aynı zamanda kretinizm olarak da bilinir) ve geri döndürülemez beyin hasarı ile sonuçlanır.

Klinik olarak, TH eksikliği ile biliş arasında bir ilişkinin bulunduğu bilinmektedir (Reed ve ark., 1995). Ötiroid yaşlı bireylerde total ve serbest T4 seviyeleri bilişle pozitif korelasyon göstermekle birlikte (Prinz ve ark., 1999), hafif yükselmiş serbest T4 seviyeleri, bilişsel gerileme ve hipokampal atrofi ile ilişkili bulunmuştur (de Jong, 2006; Hogervorst ve ark., 2008; Cooke ve ark., 2014). Hipotiroidizm, sözel, görsel, ilişkisel ve çalışma belleği gibi çeşitli bilişsel işlevlerde öğrenme ve hafıza bozukluklarıyla ilişkilidir. Bu bozukluklar, tiroid durumundaki değişikliklerin bilişsel işlevsellik ile ilgili beyin bölgelerinde değişikliklere neden olabileceğini göstermektedir (de Jong, 2006). Öğrenme ve bellek ile ilişkili beyin bölümü olan hipokampus, beynin tiroid hormonu reseptör açısından zengin bir bölgesidir. Bu hipokampusün beyinde tiroid hormonları için önemli bir hedef olduğunu gösterir. Yenidoğan, perinatal, postnatal ve erişkin farelerde yapılan çalışmalar hipotiroidizmin sinaptik plastisite (yani, sinaps kuvvetlendirme ve depresyon), yapısal plastisite ve yetişkin nörogenez gibi temel hipokampal özellikleri etkilediğini ve bilişsel performansta değişikliklere neden olduğunu ortaya koymuştur (Gilbert, 2004; Ambrogini ve ark., 2005; Alzoubi ve ark., 2009; Koromilas ve ark., 2010). Hipotiroidinin hipokampusün CA1, CA3 ve dentat

girus bölgeleri üzerindeki etkilerini araştıran çalışmalar, hipokampüsün hacmindeki azalmayla uyumlu olarak dentat girus ve CA1 bölgelerindeki hücrelerin hacim, ağırlık ve sayısal yoğunluğunda azalmaya neden olduğunu ortaya koymuştur (Madeira ve ark., 1991; Gilbert, 2004). Çeşitli araştırmacılar yetişkin beyinde, tiroid hormonlarının hipokampal nörojenezin düzenlenmesinde rol oynadığını, hipotiroidizmin yetişkin hipokampal progenitörlerin hayatta kalmalarını azalttığını, tiroid hormonun ise apoptozu engelleyerek hücre sağkalımını artırdığını göstermişlerdir (de Jong, 2006; Alzoubi ve ark., 2009; Cooke ve ark., 2014). Bunların yanı sıra distiroid sıçanlarda gözlenen hipokampal işlev bozukluklarına, sinaptik plastisitedeki değişikliklerin eşlik ettiği ve ayrıca bu öğrenme performansındaki etkilere benzer şekilde, tiroid hormonun azlığının sinaptik plastisiteyi bozduğu, PTU verilen sıçanlarda uzun dönemli güçlenme (UDG) aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (Artış ve ark., 2012).

Beyin toplam vücut ağırlığının %2'sini oluşturmaya rağmen, tüm glikoz arzının %50'sinden yararlanır. Beyin hücreleri tarafından enerji tüketimi çok yüksektir ve diğer periferik hücrelerden farklı olarak, nöronlar enerji kaynağı olarak sadece glikozu kullanırlar. Nöronlar, yeterli miktarda glikojen sentezleyip depolayamadığı için, sürekli bir glikoz kaynağı temin etmek zorundadırlar. Glikoz homeostaz dengesizliklerinin erişkin nörojenez ve sinaptik plastisitede yer alan sinyal yollarını değiştirebileceği ve nörodejeneratif bozukluk riskini artırabileceği bildirilmektedir (Kodl ve Seaquist, 2008). Dahası, enerji kısıtlamasının nöronal sağkalımı arttırdığı ve bilişsel işlevi geliştirdiği bilinmektedir (Fusco ve Pani, 2013). Tersine, besin maddelerinin fazla olması beyin sağlığına etki eder ve sinaptik transmisyonu ve plastisiteyi engeller, bilişsel azalmayı hızlandırır (Elias ve ark., 2012; Sellbom ve Gunstad, 2012). Epidemiyolojik / klinik gözlemler, diyabetik hastalarda bilişsel bozukluk gelişimi ve bunama hastalığına duyarlılığın önemli ölçüde arttığını göstermektedir. Önemli olarak, hiperglisemi ve hiperinsülinemi gibi bozulmuş metabolik parametreler, bilişsel azalma ile pozitif korelasyon göstermektedir (Cukierman-Yaffee, 2009). Yüksek kan şekeri seviyeleri hem diyabetik hem de diyabetik olmayan bireylerde demans riskini sırasıyla %40 ve %18 arttırmakta (Crane ve ark., 2013) ve ayrıca bilişsel bozulma ile hipokampal hacimde azalmaya neden olmaktadır (Kerti ve ark. 2013). Bu bulgular kan şekeri düzeyindeki dalgalanmaların, aşırı tip 2 diyabet veya bozulmuş glikoz toleransının olmaması durumunda bile beyin fonksiyonunu olumsuz etkilediğini göstermektedir (Mainardi ve ark., 2015). Hipokampüste, glikoz yoksunluğunun CA1 alanındaki

sinaptik alan potansiyellerinin inhibisyonuna yol açtığı düşük glikozlu ortamın, alan uyarıcı post-sinaptik potansiyelleri (fEPSP) önemli derecede azaltırken, yüksek glikozlu ortamın fEPSP üzerinde çok az etkisinin bulunduğu tespit edilmiştir (Kamal ve ark., 1999). Glikozun öğrenme ve hafıza görevlerini etkileme yeteneği, öğrenme ve hafıza mekanizmalarının metabolik kontrol altında olduğunun önemli bir göstergesidir (Potter ve ark., 2010).

Klinik öncesi araştırmalardan elde edilen bulgular da, glikoz metabolizmasını düzenleyebilme ve insülin sinyalizasyonuna katkıda bulunma potansiyeli nedeniyle tiroid hormonunun (TH) özellikle de hipokampüste bellek ile ilgili süreçlerin önemli bir modülatörü olabileceği hipotezini desteklemektedir (Gould ve ark., 1991; Smith ve ark., 2002; Samuels, 2008; Fernandez-Lamo ve ark., 2009). TH'nun erişkin beyinde bölgesel glikoz metabolizmasını ve psikiyatrik semptomları modüle ettiği bildirilmiştir (Bauer ve ark., 2009). Hipotiroidizm hipoglisemiye neden olan çeşitli hormonal, biyokimyasal ve sinir sistemi anormallikleri ile bağlantılıdır. Hipotiroidizm hem hipotalamus, hem de hipofize etki ederek bazal ve uyarılmış büyüme hormonu seviyelerini azaltır (Katz ve ark., 1969). Bunun yanı sıra hipotiroidili hastalarda, primer adrenal yetmezlikle ilişkili olmamalarına rağmen göreceli olarak adrenal yetmezlik vardır (Kamilaris ve ark., 1987). Bu durumda insüline yanıt olarak düşük büyüme hormonu ve kortizol düzeyleri hipoglisemiyi indükleyebilir. Hipotiroidizmde hem iskelet kasında hem de yağ dokusunda glikoneogenezin rolü azalır (McCulloch ve ark., 1983), ayrıca glikojenoliz de bozulmuştur (McDaniel ve ark., 1977). Bu biyokimyasal kusurlar, hipoglisemiden kurtulmayı geciktirir (Kalra ve ark., 2014). Hipotiroidizmdeki diğer anormallikler: glukagon salınımında bir azalma (Clausen ve ark., 1986), glukagonun hepatositler üzerindeki etkisinin azalması (Müller ve Seitz, 1987) ve insülin klirensinin yavaşlatılmasını içerir (Shah ve ark., 1975). Ayrıca gastrik boşalmayı yavaşlatır ve portal venöz akışın yanı sıra bağırsaklardan glikoz emilimini de azaltır (Holdsworth ve Besser, 1968). Hipokampüsün hipotiroidizme bağlı hipoglisemiden etkilenip etkilenmediği bilinmemektedir.

Glikoz veya insülin verilmesi, hafıza performansı artışı ile birlikte hipokampal glikoz metabolizmasında belirgin artışa neden olur, ancak bellek prosesleri sırasında TH'nun hipokampal metabolizma üzerindeki etkisine ilişkin herhangi bir veri yoktur. Bununla birlikte, glikolitik ATP'nin önemli bir tüketicisi olan $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPaz'ın aktivitesinin

hem hipo- hem de hipertiroidili sıçanların hipokampusünde %45 oranında azaldığı tespit edilmiş ve hipokampal glikoz kullanımının düzenlenmesinde TH'nun potansiyel bir rolü olduğu ileri sürülmüştür (dos Reis ve ark., 2002; Wyse ve ark., 2004; Carageorgiou ve ark., 2007). Nitekim hipotiroidili hastalarda, anterior (subgenual / perigenual) ve posterior singulat korteks, prefrontal korteks ve dorsal ve ventral striatum, putamen ve amigdalayı içeren subkortikal yapılarda kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azalmış glikoz metabolizması bulunduğu gösterilmiştir (Bauer ve ark., 2006).

Hipoglisemi (glikoz yoksunluğu) plazma glikoz konsantrasyonunda düşüş ile karakterize olup, tipik olarak glikoz homeostazında rol oynayan mekanizmalardaki anormalliklerden kaynaklanır. Semptomları; nörojenik (adrenerjik) veya nöroglikopenik olarak kategorize edilebilir. Sempatoadrenal aktivasyon belirtileri terleme, titreme, taşikardi, kaygı ve açlık hissi içerir. Nöroglikopenik belirtiler zayıflık, yorgunluk veya baş dönmesi, uygunsuz davranış (sarhoşluk benzeri), konsantrasyon zorluğu, karışıklık, bulanık görüş ve aşırı durumlarda, koma ve ölümle sonuçlanır. Sinir dokuları, normal metabolik aktiviteleri için glikoza tamamen bağımlıdır. Nöronların metabolizma hızı yüksektir ve önemli miktarda glikoz üretip depolayamayacağı için, plazma glikozundaki hızlı düşüş nöronal homeostazı birkaç dakika içinde tehlikeye atabilir. Hücrel hemostaz kaybına yol açan enerji yetersizliğinin, hipoglisemiye bağlı beyin hasarında kilit faktör olduğuna inanılmaktadır. Hipokampus hipoglisemiye duyarlı bir beyin bölümü olup, hipoglisemi insan ve kemirici infantlarında gelişim sırasında sık görülür ve nörogelişimsel defekt riski ile ilişkilidir (Rao ve ark., 2010). Hipogliseminin erişkin nörogenez ile sinaptik plastisitede yer alan sinyal yollarını değiştirebildiği ve otofajiyi indükleyebildiği ve böylece nörodejeneratif bozukluk riskini artırdığı bilinmektedir (Hall ve ark., 1989; Parsons ve Gold, 1992; Gold, 1995; Manning ve ark., 1998; Erickson ve ark., 2006; Hoyland ve ark., 2008; Krebs-Kraft ve Parent, 2008). Memelilerde glikoz eksikliğinin çeşitli doku ve organlarda otofajiyi indüklediği (Maruyama ve ark. 2008; Williams ve ark. 2009; Singh ve Cuervo, 2011; Kobayashi ve ark., 2012), otofaji ile karbonhidrat metabolizması arasında bir etkileşimin olduğu ve ayrıca otofaji ile hücrel enerji dengesi arasında dinamik bir geri bildirimin bulunduğu son yıllarda yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Singh ve Cuervo, 2011). Bununla birlikte glikoz eksikliğinin hipokampal otofajiyi etkileyip etkilemediği bilinmemektedir.

2.2.1.4.2. Glikoz eksikliği çeşitli doku ve organlarda otofajiyi AMPK sinyal yolağı aracılığıyla indükler:

Memelilerde glikoz eksikliğinin çeşitli doku ve organlarda otofajiyi indüklediği (Maruyama ve ark. 2008; Williams ve ark. 2009; Singh ve Cuervo, 2011; Kobayashi ve ark., 2012), otofaji ile karbonhidrat metabolizması arasında bir etkileşimin olduğu ve otofaji ile hücrel enerji dengesi arasında dinamik bir geri bildirimin bulunduğu son yıllarda yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Singh ve Cuervo, 2011). Sinir sistemi dışındaki dokularda glikoz eksikliği hücrede ATP konsantrasyonunun azalmasına ve AMP düzeyinin artmasına yani AMP/ATP oranında bir artışa neden olur. AMP düzeyindeki artış bir hücrel enerji sensörü olan adenosin monofosfat ile aktive olan protein kinaz (AMPK)'ın upstream kinazlar tarafından fosforile olarak aktifleşmesini sağlar (Stein ve ark., 2000; Hardie ve Hawley, 2001; Hardie, 2011). Aktifleşen AMPK, mTOR bağımlı protein translasyonu gibi enerji yoğun süreçleri kapatarak hücrel ATP üretimini arttırarak ve ATP tüketimini azaltarak enerji tasarrufu sağlayan bir program koordine eder (Towler ve Hardie, 2007) ve otofajiyi indükler (Gwinn ve ark., 2008).

Tüm ökaryotlarda bulunan AMPK bir katalitik (α) alt birim ve iki düzenleyici (β ve γ) alt birimden oluşan heterotrimerik bir serin/treonin protein kinaz kompleksidir (Kahn ve ark., 2005) ve besin maddeleri ile hücre içi enerji düzeylerindeki değişimlere tepki olarak glikoz ve lipid metabolizmasını yöneten merkezi bir metabolik anahtar olup hücre büyümesi ve otofajiyi kontrol eder (Mihalova ve Shaw, 2012). AMPK alt birim izoformları periferik dokularda yaygın şekilde ifade edilirken, beyin ağırlıklı olarak $\alpha 2$, $\beta 1$ ve $\gamma 1$ ve daha düşük oranda $\alpha 1$ ve $\beta 2$ içeren daha sınırlı bir model gösterir (Turnley ve ark., 1999). AMPK'nın aktifleşmesi için katalitik α -altbiriminin aktivasyon halkasında korunmuş bir treonin kalıntısının (T172) upstream kinazlar tarafından fosforilasyonu ilk koşuldur. Hücrel enerji seviyeleri tükendiğinde ve AMP/ATP oranı yükseldiğinde, AMPK, AMP'nin AMPK γ alt-ünitesine allosterik olarak bağlanmasıyla aktive edilir ve bu kompleksde bir konformasyonel değişiklik oluşturarak AMPK α -altbiriminin upstream kinazlar için bir substrat olma yeteneğini artırır. Şimdiye kadar birçok AMPK fosforile edici kinaz tanımlanmıştır. Her yerde eksprese edilmiş ve yapısal olarak aktif kinaz liver kinaz B1(LKB1)'e (Woods ve ark., 2003) ek olarak, Ca^{2+} ile aktive Ca^{2+} /kalmodulin-bağımlı kinaz kinaz β (CaMKK β) (Woods ve ark. 2005) ve transforme edici büyüme faktörü β -aktive kinaz-1 (TAK1) (Momcilovic ve ark., 2006),

AMPK'nın aktivatörleri olarak bilinirler.

Son yıllardaki araştırmalar, AMPK'nın ATF1'in bir memeli homologu olan ULK1'i doğrudan ve dolaylı olarak aktive ederek otofajiyi aktive ettiğini göstermiştir (Kim ve ark., 2011). İlk olarak AMPK, otofajiyi indüklemek için doğrudan ULK1'i fosforile ve aktive eder. İkincisi, AMPK ULK1'i fosforilleyerek ve ULK1-AMPK etkileşimini bozan mTORC1'i inhibe ederek ULK1'i dolaylı bir şekilde aktive eder. ULK1 ve mTORC1'in bu koordineli düzenlemesi, zarar görmüş mitokondriayı ortadan kaldırır ve besin açlığı sırasında mitokondriyal bütünlüğü korur (Kim ve ark., 2011). Aktifleşen AMPK; ULK1 ve TSC2 (Tuberous sclerosis complex 2 veya tuberin)'yi direkt olarak fosforile eder (Kim ve ark., 2011; Moruno ve ark., 2012). Fosforile olan ULK1; Atg13 ve FIP200 ile otofajinin indüksiyonuna neden olan bir kompleks oluşturur. Fosforile ve aktive olan TSC2 ise mTORC1'i inhibe eder (Inoki ve ark., 2003) AMPK, ayrıca mTORC1'in RAPTOR alt birimini doğrudan fosforile ederek mTORC1 aktivasyonunu inhibe eder ve otofajiyi indükler (Gwinn ve ark., 2008). Glikoz eksikliği sırasında AMPK ayrıca p53 ve p27'yi fosforile ederek de otofajiyi regüle eder. Normal koşullar altında sitosolik p53 otofajiyi inhibe eder. Ancak glikoz eksikliği sırasında AMPK tarafından fosforile edilir edilmez çekirdeğe taşınır ve SESTRİN2, DAPK1 ve AMPK genlerinin ekspresyonlarını indükler. SESTRİN2; AMPK ve TSC2'yi aktive ederken, DAPK1 Beclin 1'i fosforile ederek otofajinin indüksiyonuna neden olur. Son olarak p27 RHOA'yı inhibe ederek otofajiyi indükler. RHOA Beclin1'i parçalamakla görevli olan calpainleri aktive eder. Böylece RHOA'nın inhibisyonu sonucu calpainler aktive olmadığından ve Beclin 1 parçalanmadığından otofaji şekillenir (Moruno ve ark., 2012).

Otofaji indüklenir indüklenmez endoplazmik retikulum (ER), Golgi kompleksi, mitokondri veya plazma membranından kaynaklanan fagofor oluşmaya başlar (Hailey ve ark., 2010; Ravikumar ve ark., 2010). Bu süreci düzenleyen başlıca iki unsur var. Bunlardan birincisi, fagofor oluşumu bölgesinde Atg17 ve Atg13'ün alınması için gerekli olan fosfatidilinositol-3-fosfat üretebilen Vps34'tür (Blommaert ve ark., 1997). Bir sınıf III fosfatidilinositol 3-kinaz olan Vps34, aynı zamanda, otofagozom oluşumunda yer alan diğer bileşikler olan BECLIN1, P150, UV radyasyon direnci, ATG14 veya otofaji / Beclin-1 düzenleyici 1 ile ilişkilidir (Kihara ve ark., 2001). İkinci bileşen ise otofagozomların biyogeneğinde yer alan ULK1 olup, FIP200 ve ATG13 ile ilişkilidir. Bunların oluşturduğu kompleksin ULK1'in düzgün lokalizasyonuna yol açtığı

ve kinaz aktivitesini uyardığı bilinmektedir (Ganley ve ark., 2009). Şekillenen fagor uzamaya başlar. Fagoforların uzaması iki ubiquitin benzeri konjugasyon sistemine bağlıdır:

1. ATG12-ATG5-ATG16L sistemi: ATG12, ATG7 (E1 benzeri enzim) ve ATG10 (E2 benzeri enzim) yoluyla ATG5'e konjuge edilir ve daha sonra konjüge ATG12-ATG5 kompleksi ATG16L ile ilişkilendirilir. ATG12-ATG5-ATG16L kompleksi, uzayan otofagozomların dış zarına lokalize olur, ancak otofagozom oluşumu tamamlanmadan önce membrandan ayrılır. Yeni bir çalışma, belirli stres koşullarında makrotofaginın ATG5 / ATG7'den bağımsız olarak ortaya çıkabileceğini ve bunun da otofagosom oluşturmak için alternatif bir yol olduğunu öne sürmektedir.

2. Fosfatidiletanolamin (PE)-hafif zincir 3 (LC3) sistemi: Mikrotübüle bağlı protein 1 LC3 (veya sadece LC3) PE'ye konjuge edilir. LC3'ün membrana bağlanmayı geliştirdiği bilinmektedir (Nakatogawa ve ark., 2007). LC3'ün sitosolik formu olan LC3-I, pro-LC'nin ATG4B tarafından bölünmesiyle üretilir ve takiben ATG7 ve ATG3 ile işlenerek PE'ye konjuge edilir (LC3-II). LC3-II özellikle otofagozom zarlarıyla ilişkilidir ve bu nedenle düzeyi otofagozomların sayısı ile koreledir (Tanida ve ark., 2002).

Glikoz ve enerji metabolizmasının homeostazı için gerekli olan bir diğer yolak LKB1-AMPK yolağıdır. LKB1, AMPK α 'nın Thr-172'sini fosforile eden ve böylece kinaz etkinliğini aktive eden primer kinaz olup tüm fetal ve erişkin dokularda eksprese edilir. En yüksek ekspresyonu karaciğer, pankreas ve kas dokusudur. LKB1-AMPK yolu, apoptoz ve otofaji de dahil olmak üzere yaşam ve ölüm süreçlerinin düzenlenmesinde doku spesifik kritik bir rol oynar (Just ve ark. 2011). LKB1'in, hücre içi AMP'nin yükselmesine yanıt olarak hücreleri apoptozdan korumak için gerekli olduğu gösterilmiştir (Shaw ve ark., 2004).

2.2.1.4.3. AMPK aktivitesindeki değişiklikler nörolojik hastalıkların bir yansıması olabilir:

Tüm organizmanın metabolik düzenleyicisi olarak düşünülen AMPK, obezite, şeker hastalığı (diyabet), kaşeksi ile diğer metabolik bozuklukların araştırılmasında değerlendirilen önemli faktörlerden biridir. Son on yılda elde edilen veriler AMPK'nın merkezi sinir sistemi fizyopatolojisinde önemli rol oynadığını göstermektedir. AMPK, nöronal çoğalma ve farklılaşma, sinaptik bağlantı ve nöroproteksiyon gibi çeşitli nöronal özelliklerle ilişkilendirilir. Böylece, AMPK'daki değişiklikler farklı nörolojik ve

nörodejeneratif hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilir. Son birkaç yılda, birkaç araştırma grubu, nöronlarda enerji üretimi ve tüketiminin düzenlenmesinde AMPK'nın hayati bir rolü olduğunu vurgulamaktadır. Sinaptik aktivasyonu sodyum pompasının aktivitesi, nörotransmitter reseptör translokasyonu/geri dönüşümü, sinaptik taşıma, hücre iskeleti yenilenmesi ve metabolik süreçler gibi yüksek enerji tüketimi ile karakterize birkaç moleküler ve hücresele olay takip eder (Rosso ve ark., 2017). Glikoz metabolizmasına ek olarak, bazı çalışmalar AMPK'nın nöronlarda mitokondriyal fonksiyonun ve biyogenez ile mitokondriyal metabolizmanın anahtar düzenleyicisi olduğunu göstermektedir (Dasgupta ve Milbrandt, 2007; Onyango ve ark., 2009). Nöronlardaki metabolizmanın doğrudan düzenlenmesinin yanı sıra, AMPK'nın nörogelişimsel süreçlerde yer aldığı, AMPK işlevselliğindeki kusurlar anormal çoğalmayı ve nöronal kök hücresi öncüllerinin (NPC'ler) artmış apoptozisine neden olduğu belirtilmektedir (Dasgupta ve Milbrandt, 2009). Artan kanıtlar ayrıca, AMPK'nın enerji eksikliği koşulları altında hücre polarizasyonunun kontrolünde önemli bir rol oynadığını, örneğin, AMPK'nın hem aksogenezisi etkileyerek nöronal polaritenin oluşumunu modüle ettiğini (Amato ve ark., 2011) hem de nöronal gelişim sırasında dendrit büyümesi ve dallanmasını düzenlediğini (Ramamurthy ve ark. 2014) ve ayrıca moleküler düzeyde, nöronal mimari üzerindeki etkilerin hem mTOR hem de Akt sinyal yollarının AMPK'ya bağlı baskılanması ile indüklendiği ortaya koymaktadır. Tüm bunların yanı sıra yetişkin beyninde, AMPK'nın yaşlanma sürecinde yer alan hücresele olayları yönettiği, Alzheimer hastalığı (AD), Huntington hastalığı (HD) ve Parkinson hastalığı (PD) gibi çeşitli beyin hastalıklarının AMPK sinyalizasyonunun işlev bozukluğuyla ilişkili olduğu bildirilmektedir (Won ve ark., 2010; Ma ve ark., 2014). Tüm bu veriler AMPK aktivitesindeki değişiklikler ile felç, AD, HD, PD ve beyin tümörleri gibi nörolojik hastalıklar arasındaki ilişkiyi vurgularken, diğer taraftan beyindeki AMPK'nın patolojik rolü hakkında büyük bir bilgiye ulaşılmış olsa da, literatür verileri yeterli değildir. Nitekim AMPK, nörodejeneratif hastalıklarda tek bir davranış göstermez; hem zararlı hem de koruyucu roller üstlenebilir. AMPK aktivasyonu, HD'lı striatal nöronlarda mutant Huntingtin geni (mHtt)'nin neden olduğu toksisiteye aracılık ederken, PD'de nöronal hücre ölümünü önler ve bir hayatta kalma faktörü gibi davranır. Bazı raporlar, AMPK aktivasyonunun amiloidogenezideki bir azalma ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğuna işaret etmesine karşın, AMPK'nın rolü, AD patogenezinde belirsizdir; diğer çalışmalar, AMPK inhibisyonunun, ATP'nin neden

olduğu LTP'deki bozulmaları düzelttiğini göstermektedir (Won ve ark., 2010; Ma ve ark., 2014). Bu çelişik sonuçların varlığı, AMPK aktivitesini ve MSS hastalıklarının gelişimini birbirine bağlayan moleküler mekanizmaları daha iyi incelemek için ileri araştırmaların gerekli olduğuna işaret etmektedir. Hipotiroidizmde hipokampal AMPK aktivitesinin değişip değişmediği ve tiroid hormon yetersizliği ile AMPK aktivitesi arasında bir ilişkinin bulunup bulunmadığı bilinmemektedir.

2.2.1.4.4. Nöronlarda otofajik yolağın herhangi bir basamağında bozulma anormal nöronal homeostaz ile sonuçlanır:

Otofajinin, nöronları da beslenme açlığından koruduğu dolayısıyla nöroprotektif bir rol oynadığı bilinmektedir (Kaushik ve ark., 2011). Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalar i) otofajinin nöronlarda da normal koşullar altında yapısal olarak meydana geldiğini, ii) yapısal otofajinin nöronal sağkalımdan sorumlu olduğunu (Poels ve ark., 2012), iii) yapısal otofajinin bozulmasının nörodejenerasyona yol açtığını ve iv) ayrıca bozulmuş otofajinin birçok nörogelişimsel ve nörodejeneratif bozuklukların patogeneğinde rol oynadığını göstermiştir (Hara ve ark., 2006; Komatsu ve ark., 2006; Vijayan ve Verstreken, 2017). Nöronlarda otofajik yolağın herhangi bir adımında bozulma genellikle, aksonal bozukluklarla kendini gösteren ve nöronal dejenerasyonda doruğa çıkan anormal nöronal homeostaz ile sonuçlanır (Nixon ve Yang, 2012). Bununla birlikte, beyindeki farklı nöron tiplerinin otofajik yolağına bağımlılık dereceleri farklıdır ve otofajik sürecin bozulmalarına farklı şekilde savunmasızdırlar (Nikolopoulou ve ark., 2015). Buna ek olarak, birkaç raporda, otofajinin presinaptik ve postsinaptik terminallerde sinaptik fonksiyonu düzenleyebildiği, anormal otofajik vezikül şekillenmesinin, presinaptik terminalleri bozduğu ve aksonal distrofiye neden olduğu bildirilmektedir (Sanchez-Varo ve ark., 2012; Shen ve ark., 2015). Otofajinin ayrıca sinaptik plastisitede yer aldığı rapor edilmiştir (Shehata ve ark. 2012). Otofajinin normal beyin fizyolojisi bağlamındaki bir diğer ilginç rolü gıda alımı ve enerji dengesinin düzenlenmesidir (Kaushik ve ark., 2011). Son çalışmalar, memeli beyinlerinde enerji metabolizmasının nöronal plastisite ile direkt olarak ilişkili olduğunu ve AMPK'nın uzun dönemli güçlenme (long term potentiation, LTP)'nin düzenleyicisi olduğunu göstermektedir (Potter ve ark. 2010). Ayrıca Alzheimer hastalığı gibi nöronal enerji metabolizması ile ilişkili hastalıklarda AMPK'nın inhibisyonunun LTP'deki bozulmaları düzelttiğine ilişkin bilgiler de mevcuttur (Ma ve ark., 2014). Bunların

yanısıra beyinde otofajinin aşırı aktivasyonunun nöronal ölümden sıradışı bir ölüm yolu olduğu, ancak otofajinin yetersizliğinin, çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda nöronların kaybına neden olan lizozoma bağlı hücre ölümü formuyla bağlantılı olduğu bildirilmektedir (Nixon ve Yang, 2012).

2.2.1.4.5. Çeşitli doku ve organlarda Tiroid hormonu ve otofaji benzer işlevleri paylaşır:

Tiroid hormonu ve otofajinin iskelet kası büyümesinin, rejenerasyonunun ve farklılaşmasının düzenlenmesinde benzer işlevleri paylaştığı, TH ile indüklenen otofajinin, mitokondriyal reaktif oksijen türleri (ROS) ile AMPK ve ULK1'in aktivasyonunu ve mTOR yolağının inhibisyonunu içerdiği, ayrıca TH kaynaklı otofajinin, iskelet kasında mitokondriyal aktiviteyi ve biyogenezi korumak için gerekli olduğu (Lesmana ve ark., 2016) ve TH'nun karaciğerde otofajiyi arttırdığı gösterilmiştir (Sinha ve ark., 2012). Tiroid hormonu T3'ün iskelet kaslarında Atg1/ULK1, Atg5, Atg6/Beclin 1 ve LC3 gibi otofaji için önemli olan otofaji ile ilişkili genlerin mRNA ve protein ekspresyonlarını artırdığı, ayrıca sıçanda soleus kasında ve L6 hücrelerinde AMPK'nın fosforilasyonunu artırdığı, fosforillenen ve aynı zamanda aktifleşen AMPK'nın ULK1'i Ser317 ve Ser777'de fosforile ederek aktifleştirdiği ve böylece otofajinin indüklendiği gösterilmiştir (Lesmana ve ark., 2016). Karaciğerde de T3 ile uyarılan otofajinin AMPK tarafından ULK1 fosforilasyonunu gerektirdiği, aktif mTOR'un da ULK1'i Ser757'de fosforillediği ancak bu fosforilasyonun ters bir etkiye sahip olduğu ve ULK1 ve AMPK arasındaki etkileşimi bozarak otofajiyi engellediği bildirilmektedir (Sinha ve ark., 2012). Bununla birlikte yapılan literatür taramalarında hipotiroidizmin hipokampüste otofagozom oluşumunu indükleyip indüklenmediği ve otofajiyi inhibe ya da modüle edip etmediği bilinmemektedir. Burada özetlenen çeşitli çalışma sonuçları ve elde edilen sorular, TH yetersizliğinin AMPK sinyal yolağını modüle veya inhibe ederek ve mTOR'u baskılayarak veya aktive ederek hipokampüste otofajiyi indükleyebileceği veya inhibe edebileceği düşüncesinin test edilmesini gerekli kılmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney hayvanları ve deney gruplarının oluşturulması

Bu tez çalışması için ERÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan onay (Etik Kurul Tarih-Karar No: 28.08.2019-19/148) alındı ve çalışma etik kurul yönergesine uygun bir şekilde yapıldı. Çalışmada Erciyes Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (ERÜ DEKAM)'nden alınan 39 günlük 48 adet Wistar albino sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar kontrol grubu, deneysel hipotiroidizm oluşturulmuş grup ve deneysel hipotiroidizm oluşturulduktan sonra levotiroksin ile tedavi edilmiş grup olmak üzere rastgele 3 gruba ayrıldı. Her grupta 16 adet sıçan bulunduruldu. Her bir kafeste 4 adet olacak şekilde yerleştirilen sıçanlar ısısı $22\pm2^{\circ}\text{C}$ olan ve 12 saat aydınlık/12 saat karanlık (07:00-19:00) ışık periyodunun bulunduğu bir ortamda barındırıldı. Deneyler süresince tüm gruplardaki sıçanlar musluk suyu ve standart sıçan yemi ile kısıtlama yapılmaksızın beslendi. Sıçanlar deneylerin ilk gününden bitimine kadar 3'er gün aralıklarla tartıldı ve ağırlıkları kaydedildi.

Kontrol grubu hayvanlara 100 ml'sinde 1 ml 0.1 N NaOH içeren serum fizyolojik solüsyonu her bir hayvana 500 µl olacak şekilde 28 gün süreyle intraperitoneal enjeksiyonla uygulandı. Deneysel hipotiroidizm grubundaki 16 sıçana 28 gün boyunca tiroksinin (T4) triiyodotironine (T3) dönüşümünü engelleyen tiollenmiş urasil kaynaklı bir antihipertiroid ilaç olan 6-n-propil tiourasil (PTU, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 0.1 N NaOH'de çözündürülüp hazırlandıktan sonra 10 mg/kg canlı ağırlık/gün hesabıyla intraperitoneal olarak enjekte edildi. Levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidili grupta önce hayvanlarda hipotiroidizm oluşturuldu. Takiben bu hayvanlara 15 gün süreyle her bir hayvan için 5 µg Levotiroksin 1 ml NaCl içinde sulandırılarak intraperitoneal olarak enjekte edildi (Tahmez ve ark., 2000).

3.2. Kan glikoz düzeylerinin ölçümü

Tiroid hormon yetersizliğinin kan glikoz düzeyi üzerinde etkisinin bulunup bulunmadığını belirlemek için tüm gruptaki sıçanların deneme başlangıcında ve bitiminde olmak üzere kuyruklarından alınan kan örneklerinde glikometre cihazı kullanılarak glikoz düzeylerinin ölçümü yapıldı.

3.3. Plazma T3 ve T4 düzeylerinin ölçümü

Deney hayvanlarında hipotiroidizmin şekillenip şekillenmediği ya da levotiroksine cevap verip vermediği, kan T3 e T4 düzeylerinin ölçümü ile belirlendi. Bu işlem için öncelikle xylazine/ketamin kombinasyonunun (87 mg/kg - 13mg/kg) intraperitoneal uygulanmasıyla hayvanlar anestezi edildi (Van Pelt, 1977) Takiben kalpten kan örnekleri alındı. Kalpten alınan kan örnekleri 1600 G'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra -20°C'de saklanmak üzere ependorf tüplere aktarıldı. Daha sonra alınan kan örneklerinde TSH, serbest T3 ve serbest T4 hormonu düzeyleri Rat TSH kiti (Elabscience, katalog no: E-EL-R0976), fT3(Free Triiodothyronine) kiti (Elabscience, katalog no: E-EL-0079), fT4(Free Thyroxine) kiti (Elabscience, katalog no: E-EL-0122) kullanılarak ELISA cihazında (BioTek, uQuant) ölçüldü.

3.4. Doku örneklerinin alınması

Tüm denemeler sonrası kontrol, hipotiroidili ve Levotiroksin ile tedavi edilen Hipotiroidili gruba ait hayvanlar anestezi protokolüne uygun biçimde anestezi edildi (Van Pelt, 1977). Daha sonra çalışma materyalini oluşturacak olan hipokampus doku örnekleri iki farklı metodla alınıp işlendi:

- a. Birinci teknikte Bouin tespit sıvısının kardiyak perfüzyonla beyin dahil tüm dokulara ulaştırılarak bu dokuların tespit edilmesi sağlandı.
- b. İkinci teknikte ise doku örneklerin herhangi bir kimyasala maruz kalmadan dondurulması sağlandı ki bu teknik doku total protein içeriğinin saptanması için önemlidir. Bilindiği üzere hipokampus sağ ve sol olmak üzere bir çift organ halinde bulunur. Çalışmada western blot analizi için de yeterli protein ekstrakte edebilmek için her iki hipokampus birlikte alındı.

3.4.1. Histoloji, İmmünohistokimya ve İmmünfloresan teknikleri için doku örneklerinin alınması

Çalışmada histoloji, immünohistokimya ve immünfloresan analizleri için her bir gruba ait anestezi altındaki 8'er hayvana Bouin tespit solüsyonu kullanılarak kardiyak perfüzyon uygulandı. Perfüzyon bitiminde hayvanların beyinleri ve tiroid bezleri çıkarılarak Bouin solüsyonunda 6 saat süreyle postfiksasyona maruz bırakıldı. Tespitten sonra tüm dokular sırasıyla %50, 70, 80, 96 ve absol alkoller ile metil benzoat ve benzol serilerinden geçirilerek parafinde bloklandı.

3.4.1.1. Tiroid bezi doku örneklerinin histolojik incelemeler için hazırlanması

Hayvanlarda hipotiroidinin oluşup oluşmadığını mikroskopik olarak belirlemek için Bouin solüsyonu içinde tespit edilen ve rutin histolojik işlemlerden geçirilerek hazırlanan doku bloklarından alınan 4 mikron (μ) kalınlığındaki kesitler modifiye edilmiş Mallory'nin modifiye üçlü boyaması (Crossmon, 1937) ve periodik asit Schiff (PAS) (John ve Harry, 1994) boyaması ile boyandı. Hazırlanan tiroid preparatları Olympus BX51 marka mikroskopta incelenerek Olympus DP72 kamera ile fotoğraflandı.

3.4.1.2. Hipokampus doku örneklerinin histolojik, immünohistokimyasal ve İmmünofloresans boyama teknikleri için hazırlanması

Kontrol ve deney gruplarındaki her bir hayvanın beynine ait doku bloklarından 4 mikron kalınlığında seri kesitler alındı ve 36 seri preparat hazırlandı. Her bir lama belirli aralıklarla en az 3 kesit alındı. Genel yapıyı incelemek için preparatların ilk 12 serisi krezil viyole boyası ile, otofaji ile ilişkili proteinlerin hipokampusdeki lokalizasyonlarını belirlemek için preparatların diğer 12 serisi immünohistokimya boyama tekniği ile bir diğer 12 serisi ise immünfloresan boyama tekniği ile boyandı.

3.4.1.2.1. Krezil viyole boyama yöntemi

Hazırlanan preparatlar deparafinizasyon ve rehidrasyon işleminden sonra 5 dk. %0.1'lik Krezil violet asetat içerisinde bekletildi. Üç kez distile suda yıkandıktan sonra kesitler, sırasıyla %96'luk ve absol alkolde 3'er dk. bekletildi. Takiben ksilen'de 2 kez 5'er dk. bekletilip entellan ile kapatıldı.

3.4.1.2.2. İmmünohistokimyasal analiz (Strep-avidin Biotin Kompleks (Strept-ABC) immünoperoksidaz tekniği)

İmmünohistokimyasal incelemeler için hazırlanan preparatlar 2'şer kez 5'er dakika ksilen içerisinde bekletildi. Ardından dehidratasyon işlemi için sırasıyla absol alkol I, absol alkol II, % 96 alkol, % 80 alkol ve % 70 alkol olmak üzere dereceli alkol serilerinden 3'er dakika süreyle geçirildi ve distile suda 5 dakika bekletildi. Takiben fosfat buffer salin (PBS)'de 5 dakika (dk) yıkanan preparatlar doku antijeninin yeniden kazanımını sağlamak amacıyla önce oda ısısındaki 10 mM sodyum sitrat bufferda (pH: 6.0) 5 dk. bekletildi. Daha sonra preparatlar mikrodalga fırında ısıtılmış sodyum sitrat buffer içinde 600W'da 4 kez 5'er dk. süreyle kaynatıldı ve takiben aynı solüsyon içinde 20 dk. soğutuldu. Tekrar PBS ile 2 kez 5'er dk. süreyle yıkamayı takiben preparatlar dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için metanolde hazırlanmış % 3' lük hidrojen peroksit (H_2O_2) ile 15 dk. muamele edildi ve tekrar PBS ile 4 kez 5'er dk. süreyle yıkandı. Nonspesifik bağlanmaları önlemek için kesitler 5 dk.bloklama solüsyonu (Scytek, Super Block, AAA125) ile bir nem odası içinde inkübe edildi. Uygun dilüsyonlarda hazırlanmış primer antikörler (Tablo 3.1) kesitler üzerine eklendi ve 4°C'de bir gece inkübe edildi. Negatif kontroller olarak alınan hipokampus örnekleri ise primer antikorsuz PBS ile muamele edildi. İnkübasyonu takiben PBS'te 4 kez 5'er dk. süreyle yıkanan kesitler, biyotinlenmiş sekonder antikör (anti-rabbit, Santa Cruz, katalog numarası: sc-2004; anti-mouse, Santa Cruz katalog numarası: sc-516102) ile 15 dk. oda ısısında inkübe edilip, tekrar 4 kez 5'er dk. süreyle PBS ile yıkandıktan sonra da enzim konjugatlı strepavidinde (Thermo, Streptavidin Perooxidase, katalog numarası: TS-125-HR) 15 dk. muamele edildi. Tekrar 4 kez 5'er dk. süreyle PBS ile yıkandıktan sonra 5-10 dk. 3,3' Diaminobenzidin (Thermo Scientific, Lab Vision DAB Plus Substrate Staining System, TA-125-HDX) kromojen solüsyonunda bekletildi. Takiben kesitler çekirdek boyası olan Gill'in Hematoksilen'inde 5 dk. boyandıktan sonra çeşme suyunda mavileşinceye kadar yıkandı ve takiben dereceli alkollerden ve ksilenlerden geçirilip (Entellan® new, Merck, 1079610500) entellan ile kapatıldı. Kahverengi presipitasyonun görülmesi sonucunda reaksiyon pozitif olarak değerlendirildi ve ışık mikroskopunda(Olympus, BX51) incelenerek fotoğraflandı.

3.4.1.3. İmmüno Floresans tekniği

İmmünohistokimya tekniğinde olduğu gibi deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerini takiben kesitler distile suda 3 dakika bekletildi. Antijenin yeniden kazanımı işlemi de immünohistokimya tekniğinde olduğu gibi sodyum sitrat buffer ile gerçekleştirildi. Ardından distile su ve PBS içerisinde yıkananan kesitler 200 ml 0.01M PBS ve 500 µl Triton X100 ile hazırlanan solüsyon içerisinde 20 dk. permeabilize edildi. Süre bitiminde preparatlar PBS içerisinde yıkandı. Protein bloklama işlemi için, bloklama solüsyonu (Scytek, Super Block, katalog numarası: AAA125) preparatlar üzerine damlatıldı ve 5 dk. bekletildi. Takiben PBS içerisinde yıkama gerçekleştirildi. Primer antikorlar (Tablo 3.1), antikor sulandırma solüsyonu içerisinde uygun oranlarda sulandırıldı ve dokular üzerine uygulandı. Kurumayı önlemek amacıyla preparatlar nem kamarası içerisinde +4°C’de bir gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün preparatlar PBS içinde 3’er kez 5 dk. süreyle yıkandı ve antikor sulandırma solüsyonu içerisinde uygun oranlarda sulandırılmış ve kullandığımız primer antikora karşı hazırlanmış sekonder antikorlar (anti-rabbit, Santa Cruz, sc-2359; anti-mouse, Abcam, ab-6785) ile 3 saat süreyle oda ısısında muamele edildi. Bu işlem ve devamındaki işlemler karanlıkta gerçekleştirildi. Süre bitimini takiben 3 kez 5’er dk. süreyle PBS ile yıkama yapıldı ve preparatlar çekirdek boyaması için DAPI ilaveli 5x fluoroshield mounting medium ile kapatılarak floresan ataçmanlı ışık mikroskobunda incelenerek fotoğraflandı.

3.4.2. Western blot analizi için doku örneklerinin alınması

Western blot analizi için her bir gruptaki diğer 8 hayvanın anesteziyi takiben beyinleri direkt olarak çıkarıldı ve sağ ve sol hemisferler birbirinden ayrıldı. Daha sonra anatomik yerleşimleri bilinen hipokampusler hemisferlerden ayrılarak sıvı azotta (-196°C) donduruldu. Daha sonra bu dokular analizleri yapılınca kadar -80°C’de dondurucuda saklandı.

3.4.2.1. Western blot analizi için protein konsantrasyonunun belirlenmesi

- Her grup için 8’er adet 1000 ul’lik ependorf tüpler üzerine grupların isimleri ve sıçanların numaraları kodlandı. Ependorf tüplerin darası alındı. Sıvı azotta dondurulduktan sonra -80°C’de saklanmış olan dokular buz üzerinde iğne ucu ile mekanik olarak parçalandı ve hazırlanan ependorf tüplere aktarıldı. Ependorf tüpler, içerisindeki dokular ile tekrar tartıldıktan sonra dokuların net ağırlıkları kaydedildi. Her

100 mg doku ağırlığı için proteaz ve fosfataz inhibitörlerini içeren 300 ul RIPA buffer dokular üzerine eklendi ve ependorflar vortekslendi. Daha sonra ultrasonikatör ile homojenize edilen doku örnekleri 15.000G'de, +4°C'de, 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar başka ependorf tüplere aktarıldı. Ardından bu örnekler tekrar 20.000G'de 5 dk. +4°C'de santrifüj edildi. Süpernatantlar yine adları ve grupları kodlanarak başka tüplere -80°C'de tutulmak üzere aktarıldı.

2. Protein miktarları modifiye edilmiş Lowry yöntemiyle (Lowry, 1951) belirlendi. Standart olarak Bovine Serum Albumin (BSA) kullanıldı. 10 ml distile su içerisinde 10 mg BSA çözülürülerek 1ml/mg BSA içeren stok BSA standart solüsyonu hazırlandı. Stok solüsyondan PBS ile sulandırılarak 4 adet farklı dilüsyonlardaki standart BSA solüsyonları elde edildi. Bu solüsyonların oranları aşağıda verildi:

1 nolu standart: Stok BSA solüsyonu

2 nolu standart: 1 birim PBS ve 1 birim stok BSA solüsyonu

3 nolu standart: 2 birim PBS ve 1 birim stok BSA solüsyonu

4 nolu standart: 3 birim PBS ve 1 birim stok BSA solüsyonu

5 nolu standart: 5 birim PBS ve 1 birim stok BSA solüsyonu

Standartlar için 5 çift olmak üzere toplam 10 adet 1500ul'lik ependorf tüp A ve B olarak adlandırıldı. Bunlardan 1A ve 1B yazılı tüplerin her birine 30 ul 1 nolu standarttan, 2A ve 2B yazılı tüplerin her birine 30 ul 2 nolu standarttan, 3A ve 3B yazılı tüplerin her birine 30 ul 3 nolu standarttan, 4A ve 4B yazılı tüplerin her birine 30 ul 4 nolu standarttan ve 5A ve 5B yazılı tüplerin her birine 30 ul 5 nolu standarttan konuldu. Ayrıca bir çift ependorf tüp kör olarak adlandırıldı. Körlere sadece 30 ul PBS konuldu.

Öncelikle her bir doku lizatından 10ul ve PBS'den de 90 ul alınarak doku örnekleri 1/10 oranında dilüe edildi. Daha sonra her bir doku örneği için yine A ve B olmak üzere örnek numarasıyla birlikte adlandırılan ependorf tüpler içine dilüe edilmiş örneklerden 30'ar ul konuldu.

Daha sonra körler ile standartların ve bütün örnekler üzerine 600 ul Lowry solüsyonu eklenen tüpler oda ısısında 10 dk. bekletildi. Son olarak 1:1 oranındaki folin ve distile su karışımı bütün örnek, kör ve standart çiftlerine 60 ul eklendi ve takiben 50°C'de 10

dk. inkübe edildi. Örneklerin absorbans değerleri ELISA cihazında (BioTek, uQuant) 570 nm dalga boyunda ölçülerek protein miktarları belirlendi.

3.4.2.2. Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) yöntemi

Ayrıştırıcı jeller tespit edilecek proteinlerin ağırlığına göre yüzdesi ayarlanarak hazırlandı. Ayrıştırıcı jel 1 mm kalınlığındaki camlara 5'er ml döküldü ve takiben üzeri distile su ile tamamlanarak donması beklendi. Ayrıştırıcı jel donduktan sonra jellerin üzerindeki distile su boşaltıldı ve dikkatlice kurulandı. Sonrasında üzerine hazırlanan toplayıcı jel dökülüp, 15 kuyucuklu tarak ile kapatıldı. Toplayıcı jelin donması beklendi.

Protein miktarının belirlenmesi ile hesaplanan miktarda örnek, Laemmli buffer ve distile su karıştırılarak yüklemeye hazır hale getirildi. Sonra 95°C'de 5 dk. inkübe edildi. Daha sonra buz üzerine alındı. Jeller elektroforez tankına yerleştirildi ve running buffer içerisinde marker, pozitif kontrol olarak karaciğer ve geri kalan 24 adet örnek jelle yüklendi. Güç kaynağı 100V'a sabitlendi ve 90 dk. boyunca running işlemi elektroforez tankı buz içerisinde iken sürdürüldü.

Running işlemi tamamlandıktan sonra jeller camlardan ayrıldı ve dikkatlice transfer buffer içerisine alındı. Transfer buffer içerisinde 15 dk. beklerken bu sırada membranlar hazırlandı. PVDF (Immobilion-PSQ PVDF) membranlar 7 cm X 9.5 cm olarak dikdörtgen şeklinde kesildi. Metanol içerisinde 30 saniye bekletilip aktifleştirildi. Daha sonra distile suda yıkandı ve transfer buffer içerisine alındı. Takiben jelerden membranlara proteinlerin aktarımı için transfer kasetleri içine sandviç şeklinde jel ve membranlar yerleştirildi. İlk önce süngerler ve filtre kağıtları transfer buffer ile ıslatıldı. Sonra transfer kaseti siyah kısmı en altta olacak şekilde yerleştirildi ve bunun üzerine sırasıyla sünger, filtre kağıdı, jel, membran, filtre kağıdı ve sünger şeklinde dizildi. Kasetler blot tankına yerleştirildi ve blot tankı transfer buffer ile dolduruldu. İçerisine buz aküsü konuldu. Akım 90 mA sabitlenerek bir gece boyunca buzdolabı içerisinde transfer işlemi gerçekleştirildi.

Ertesi gün transferden çıkan membranlar distile su ile yıkandı. Yıkamadan sonra membranlar ekspresyonu incelenecek fosforile proteinler için %5'lik BSA ile, diğer proteinler için ise %5'lik süt tozu ile hazırlanan bloklama solüsyonunda 1 saat bloklandılar. Daha sonra membranlar fosforile olan proteinler için %2,5 BSA ile, diğerleri %5'lik süt tozu ile hazırlanan antikorlarla bir gece boyunca buzdolabında

inkübe edildiler.

Ertesi gün membranlar Tris-Buffered Saline - Tween 20 (TBS-T) ile 30 dk., 5'er dk. da bir yıkama solüsyonları değiştirilerek yıkandılar. Daha sonra %5'lik süt tozunda hazırlanan sekonder antikor ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildiler. İnkübasyondan sonra TBS-T ile 4 kez 5'er dk. ve takiben 2 kez 5'er dk. TBS ile yıkanan membranlar enhanced chemiluminescence (ECL) (Bio Rad Clarity - Western ECL Substrate, 1705060) solüsyon ile 5 dk. karanlıkta inkübe edildi ve BioRad (ChemiDoc XRS+ System) görüntüleme cihazı kullanılarak görüntülendi.

Her bir membranda otofaji ile ilişkili proteinlerin önce fosforile şekilleri tespit edildi. Daha sonra bu membranlar TBS-T ile 5 dk. ve TBS ile 5 dk. süreyle yıkandıktan sonra. 15 dk. boyunca oda sıcaklığında strip solüsyonuyla (Thermo Scientific, Restore - Western Blot Stripping Buffer, katalog numarası: 21059) inkübe edildi. Daha sonra 6 kez 5'er dk. süreyle yıkanan membranlar bloklama solüsyonuyla oda ısısında bir saat süreyle blokladı ve takiben aynı proteinin total formu olan primer antikor ile 4°C'de gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün membranlar yukarıda belirtildiği üzere sekonder antikorla inkübasyonu ve yıkamaları takiben ECL ile 5 dk. karanlıkta inkübe edildikten sonra görüntülendi.

Membranlarda görüntülenen bantların normalizasyonu için görüntülemeyen sonra tekrar yukarıda anlatıldığı gibi strip etme işlemi uygulandı. Takiben membranlar Beta-aktin antikoruna ile inkübe edilip akabinde diğer işlemler de yapıldıktan sonra görüntülendi.

3.5. İmmünohistokimyasal ve İmmünofloresan boyamaların semikantitatif değerlendirilmesi

Gerek immünohistokimyasal ve gerekse immünofloresan tekniklerle hazırlanan preparatlarda immün boyanmalar semikantitatif olarak değerlendirildi. Hipokampusun CA1-CA3 bölgeleri ile dentat girus nöronlarında immün boyanmalar yoğunluklarına göre negatif (-) (boyanma yüksek büyütmede -40X- bile görülemez), zayıf (+) (boyanma sadece yüksek büyütmede -40X- görülebilir), orta şiddette (++) (boyanma düşük büyütmede -10X- kolayca görülebilir) ve kuvvetli (+++) (boyanma düşük büyütmede -10X- çarpıcı şekilde görülebilir) olarak derecelendirildi. Çalışmada kullanılan otofaji ile ilişkili proteinlerin ekspresyonlarının varlık ya da yoklukları ile hücresel lokalizasyonları belirlendiğinden herhangi bir istatistiksel değerlendirme yapılmadı.

3.6. Kantitatif değerlendirmeler ve istatistiksel analiz

Çalışmada her bir gruptaki sıçanlara ait canlı ağırlık, kan glikoz ve tiroid hormon düzeyleri ile Western blot analizleri ile elde edilen kantitatif verilerin istatistik analizleri SPSS versiyon 20.0 paket programı işlem komutları kullanılarak yapıldı. Öncelikle iki bağımlı örnek t testi kullanılarak her bir grubun kendi içinde canlı ağırlık, kan glikoz ve tiroid hormon düzeyleri için deneylerin başlangıcı ve bitişi sürecinde herhangi bir değişim geçirip geçirmediği ve eğer bir değişim olmuş ise bunun istatistiksel açıdan önemli olup olmadığı test edildi. Daha sonra hem denemenin başlangıcındaki canlı ağırlık, kan glikoz ve tiroid hormon düzeylerinin gruplar arasında farklılık gösterip göstermediği, hem de denemelerin bitimindeki canlı ağırlık, kan glikoz ve tiroid hormon düzeylerinin gruplar arasında farklılık gösterip göstermediği tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA) ile analiz edildi. Takiben gruplar arasında farklılığın istatistiksel açıdan önemli olup olmadığı ise Post hoc çoklu karşılaştırma testlerinden Tukey testi kullanılarak belirlendi. Western blot analizi sonucu elde edilen tüm gruplara ait değerler arasında otofaji ile ilişkili proteinlerin ekspresyonlarının farklılık gösterip göstermediğini belirlemek için parametrik testlerden tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA), farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını bulmak için ise Post hoc çoklu karşılaştırma testlerinden Tukey testi kullanıldı. P değeri 0.05'den büyük olduğunda sonuç istatistiksel açıdan önemli olarak yorumlandı.

Tablo 3.1. Antikor listesi

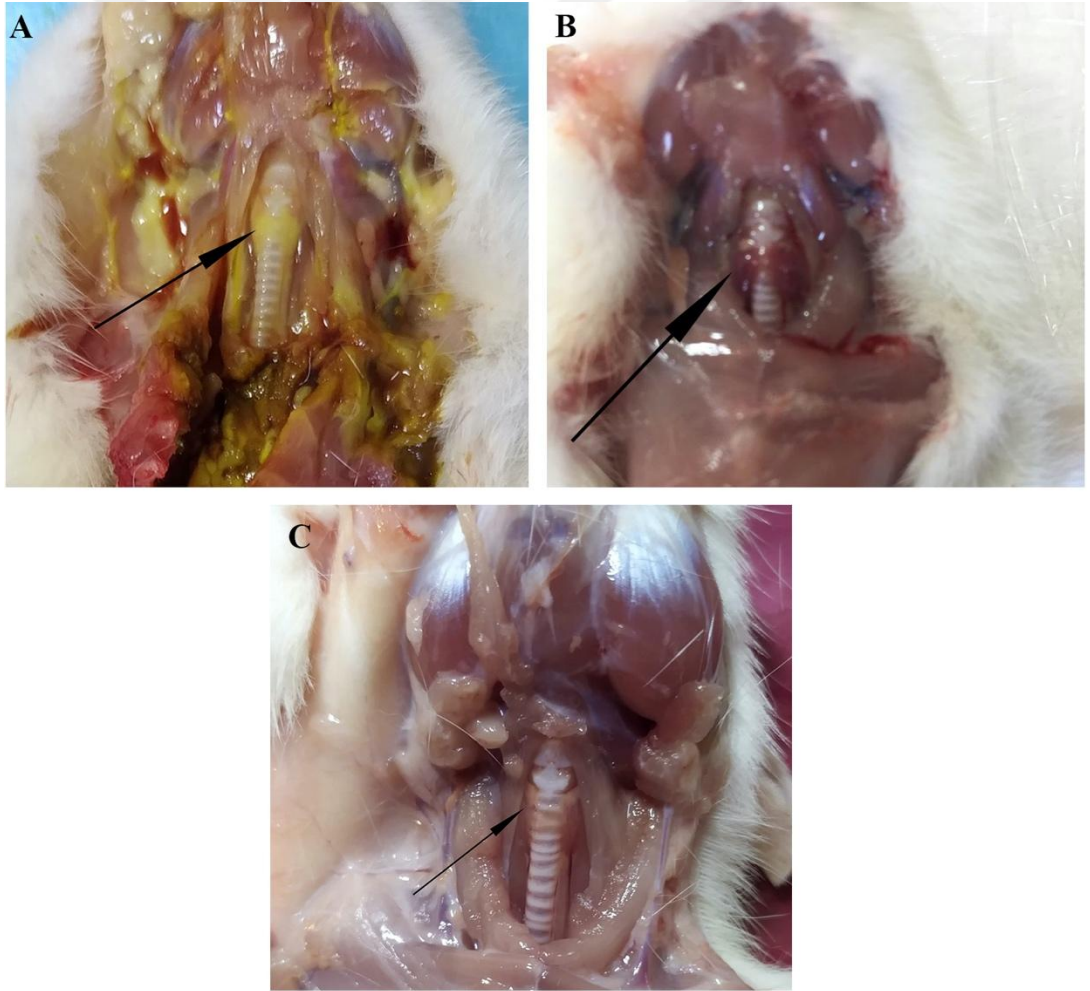
Antikor	Host	İmmunojen	Katalog No	Uygulama	Dilüsyon	Tür Reaktivitesi
AMPK	Mouse	İnsan kökenli AMPK α 1'in C-terminal bölgesindeki 251-550 amino asitleri.	sc-74461	IHC, IF, WB	IHC: 1/100 IF: 1/50 WB: 1/500	İnsan, fare ve sıçan
p-AMPK	Rabbit	fare AMPK α 2'nin Thr172 fosforilasyon alanından üretilen sentetik fosfopeptid	bs-4002R	IHC, IF, WB	IHC: 1/200 IF: 1/50 WB : 1/500	İnsan, fare, sıçan ve koyun
mTor	Rabbit	İnsan mTOR'unun C bölgesi içindeki diziyi kapsayan rekombinant protein	GTX-101557	IHC, IF	IF:1/50	İnsan, fare ve sıçan
p-mTor	Mouse	İnsan kökenli Ser 2448 fosforile mTOR içeren Amino asit dizilimi.	sc-293133	IHC, IF	IHC: 1/100 IF: 1/100	İnsan, fare ve sıçan
TSC2	Rabbit	SVSVLP...GSQE Amino asidine karşı sentezlenmiş peptid	NBP1-82849	IHC, WB	IHC: 1/200 WB: 1/200	İnsan, fare ve sıçan
p-TSC2	Rabbit	Thr1462'in fosforile alanının etrafındaki insan Tuberin/TSC2	bs-3444R	IHC, WB	IHC: 1/200 WB: 1/500	Sıçan
ULK1	Rabbit	İnsan ATG/ULK1'den türetilmiş KLH konjige sentetik peptid	bs-3602R	IHC, WB	IHC: 1/200 WB: 1/500	İnsan, fare ve sıçan
p-ULK1	Rabbit	İnsan ATG1/ULK1	bs-3464R	IHC, WB	IHC: 1/200 WB: 1/500	İnsan, fare ve sıçan
MAPLC3 α/β	Mouse	İnsan kökenli MAPLC3 β 'nin iç alanında bulunan 33-56 Amino asit arasındaki epitop alanı.	sc-398822	IHC, IF, WB	IHC: 1/100 IF: 1/50 WB: 1/5000	İnsan, fare ve sıçan
Beclin1	Mouse	İnsan kökenli Beclin1'in 1-300 Amino asiti	sc-48341	IF, WB, IHC	IHC:1/100 IF: 1/40 WB: 1/500	İnsan, fare ve sıçan
MAPLC3A	Rabbit	İnsan MAP1LCA'nın Amino asit 100'ün C terminalini içeren sentetik peptid	ab-52768	IHC, WB	IHC:1/100	İnsan ve sıçan
P62/SQSTM1	Mouse	İnsan kaynaklı SQSTM1'in 151-240 amino asitlerine karşı hazırlanmış antikor	sc-48302	IHC, WB	IHC:1/100 WB:1/500	İnsan, fare ve sıçan

IF: İmmunofloresan, IHC: İmmunohistokimya, WB: Western Blot, dilüsyon oranları

4. BULGULAR

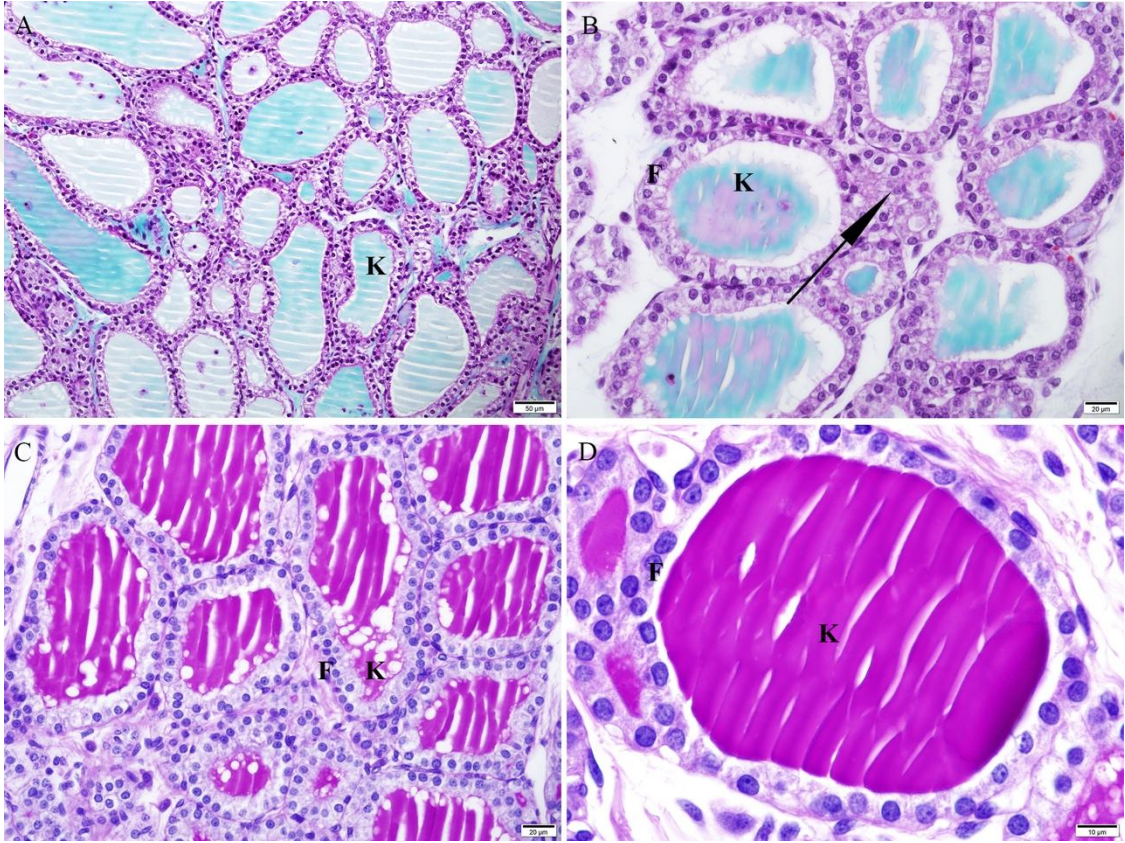
4.1. Tiroid bezindeki morfolojik değişiklikler

Kontrol, hipotiroidili ve levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidili sıçanların tiroid bezleri makroskopik olarak incelendiğinde hipotiroidili sıçanların tiroid bezlerinin oldukça büyük olduğu belirlendi (Şekil 4.1.1).



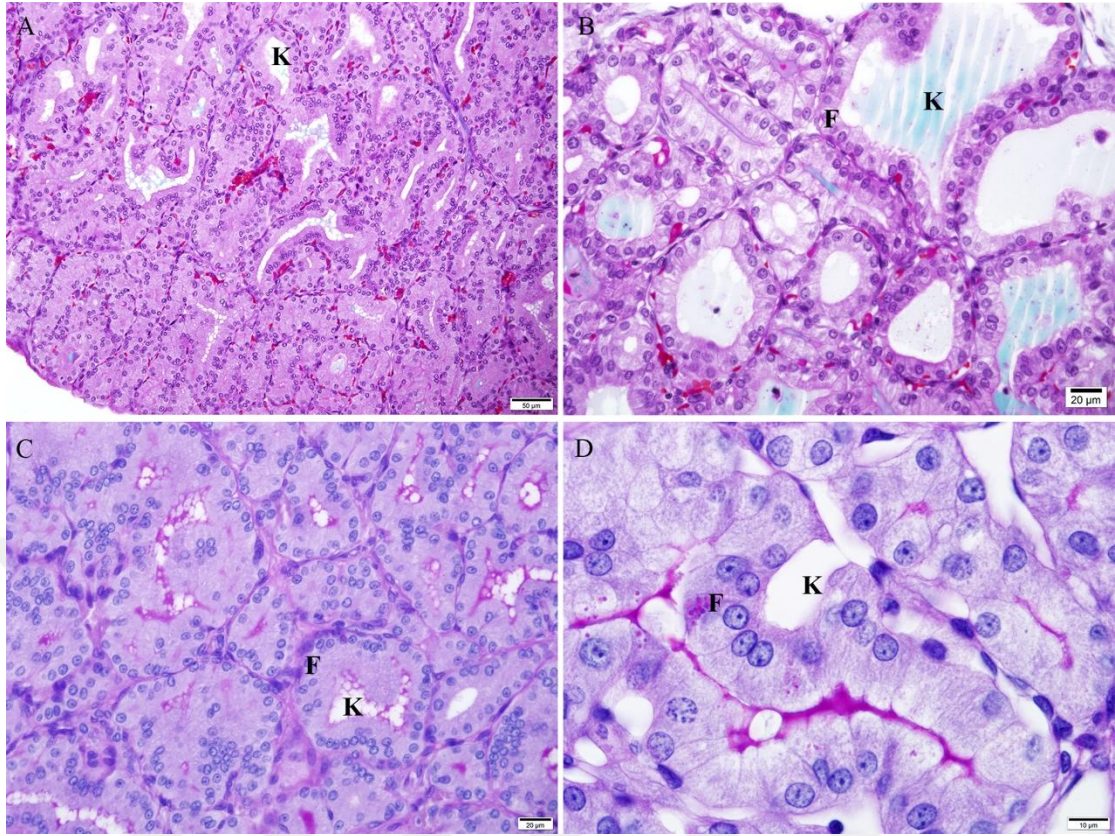
Şekil 4.1.1. Kontrol (A), hipotiroidili (B) ve Levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidili (C) sıçanların tiroid bezlerinin (ok) makroskopik görüntüsü.

Her üç gruba ait sıçanlardan alınan tiroid bezlerinin kesitleri üçlü boyama ve PAS boyaması ile boyanıp incelendi. Kontrol grubu sıçanların tiroid bezinin kolloid içeren farklı büyüklüklerdeki folliküllerden oluştuğu görüldü. Aktif folliküller tiroid bezinde büyük bir alanı kaplamaktaydı. Tiroid foliküllerinin kübik veya basık prizmatik, yuvarlak çekirdekli epitel hücreleri ile çevrili olduğu gözlemlendi. Foliküller arasında gruplar halinde C hücrelerine rastlandı (Şekil 4.1.2 4.1.2).



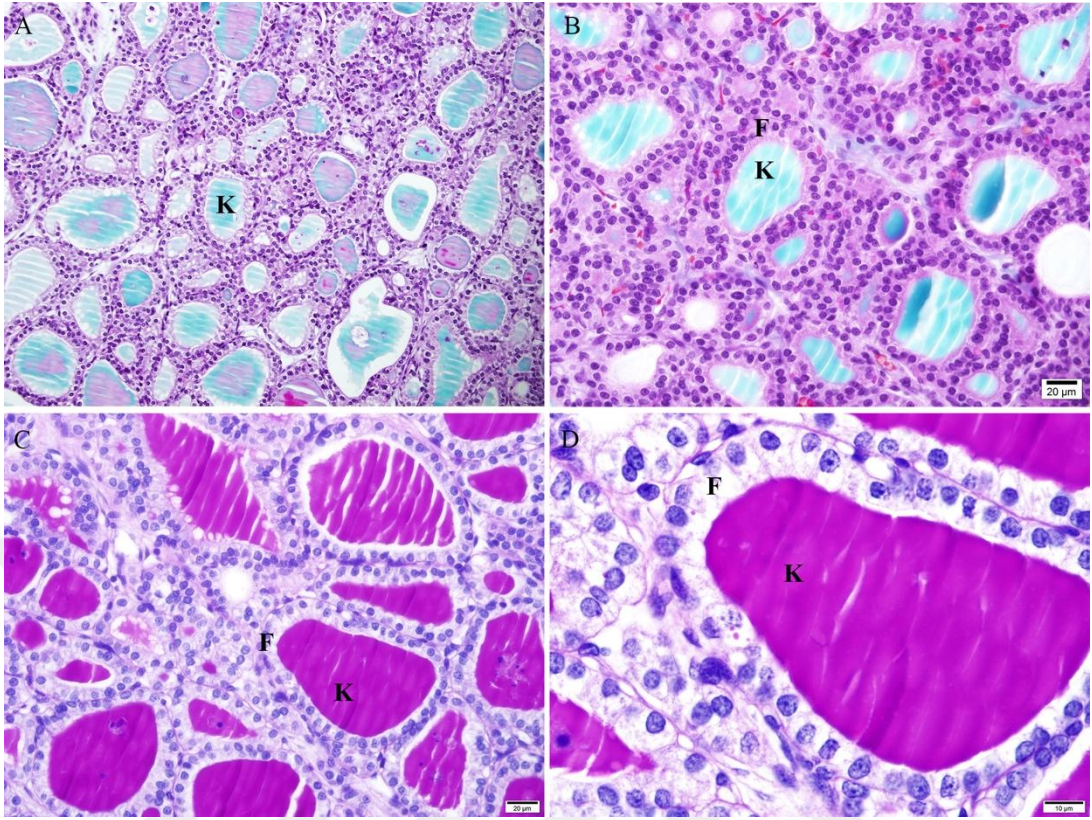
Şekil 4.1.2. Kontrol grubu sıçanlardan alınan tiroid bezinin histolojik görünümü. K: Kolloid, F: Follikül epitel hücreleri, Ok: C hücreleri. Mallory'nin modofiyeye üçlü boyaması (A ve B) ve PAS boyaması (C ve D). Objektif büyütmesi, A, 40X; B, 100X C, 20X, D: 40X.

Hipotiroidili sıçanlardan alınan tiroid bezi örneklerinde follikül lümeninin çok dar olduğu ve folliküllerde kolloidin bulunmadığı belirlendi. Follikül epitel hücrelerinin sayıca arttığı, bu hücrelerin yüksek prizmatik şekilli ve yuvarlak çekirdekli olduğu gözlemlendi. Tiroid bezinde foliküller arası bağ dokusunun azalmış olduğu tespit edildi (Şekil 4.1.3).



Şekil 4.1.3. Hipotiroidili sıçanlardan alınan tiroid bezinin histolojik görünümü. K: Kolloid, F: Follikül epitel hücreleri. Mallory'nin modofiyeye üçlü boyaması (A ve B) ve PAS boyaması (C ve D). A: 40X objektif büyütmesi, B: 100X, C: 20X, D: 40X objektif büyütmesi.

Levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidili sıçanlardan alınan tiroid bezlerin histolojik yapısı incelendiğinde, folikül yapısının kontrol grubundakine benzer olduğu, farklı büyüklüklerdeki foliküller içerisinde kolloidin bulunduğu gözlemlendi. Folikül epitel hücrelerinin yuvarlak çekirdekli, basık prizmatik hücrelerden oluştuğu tespit edildi (Şekil 4.1.4).

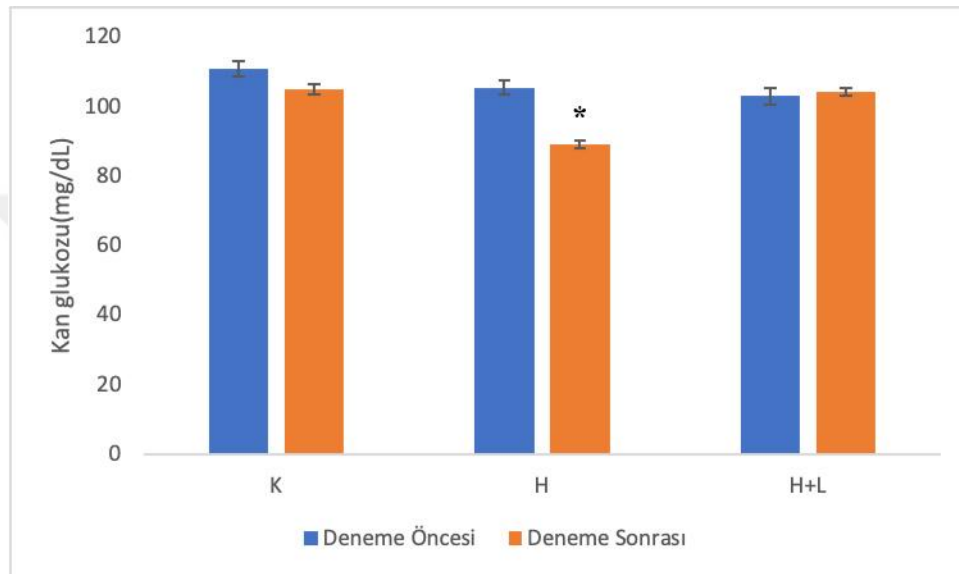


Şekil 4.1.4. Levotiroksin ile tedavi edilen sıçanlardan alınan tiroid bezinin histolojik görünümü. K: Kolloid, F: Follikül epitel hücreleri. Mallory'nin modifiye üçlü boyaması (A ve B) ve PAS boyaması (C ve D). A: 40X objektif büyütmesi, B: 100X, C: 20X, D: 40X objektif büyütmesi.

4.2. Kan glikoz değerleri

Kontrol, hipotiroidili ve Levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotroidili gruplardaki sıçanlardan alınan kan örneklerinde saptanan ortalama glikoz düzeyleri şekil 4.2.1'de gösterildi. Sıçanlar 39 günlük iken rastgele çalışmaya dahil edilerek kontrol ve hipotiroidi gruplarında deneylerin başlangıcında ve bitiminde olmak üzere iki kez kan örneği alındı. Levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi grubunda ise denemelerin başlangıcında, hipotiroidi oluşturulduktan sonra ve Levotiroksin ile tedavi edildikten sonra deneme bitiminde olmak üzere üç kez kan örneği alındı. Tüm gruplarda kan glikoz düzeylerinin deneme sürecinde sıçanların büyümesine paralel olarak değişip değişmediği, gruplara göre farklı olup olmadığı ve farklılığın istatistiksel açıdan önem taşıyıp taşımadığı incelendi. Deneme başlangıcında tüm gruplara ait sıçanlardan alınan kan örneklerinde glikoz düzeylerinin anlamlı farklılık taşımadığı belirlendi ($P>0.05$). Denemelerin bitiminde kontrol grubunda glikoz düzeylerinin değişmediği ($P=0.052$), oysa hipotroidili grupta kan glikoz düzeyinde anlamlı düşüş olduğu tespit edildi

($P=0.000$). Levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi grubunda hipotiroidi oluşturulduktan sonra hipotiroidili gruba benzer olarak kan glikoz düzeyinde anlamlı düşüş olduğu gözlenirken ($P=0.000$), Levotiroksin ile tedavi edildikten sonra denemelerin bitiminde alınan kan örneklerinde glikoz düzeylerinin yükselerek deneme başlangıcındaki değerlere ulaşmış olduğu saptandı ($P=0.062$).

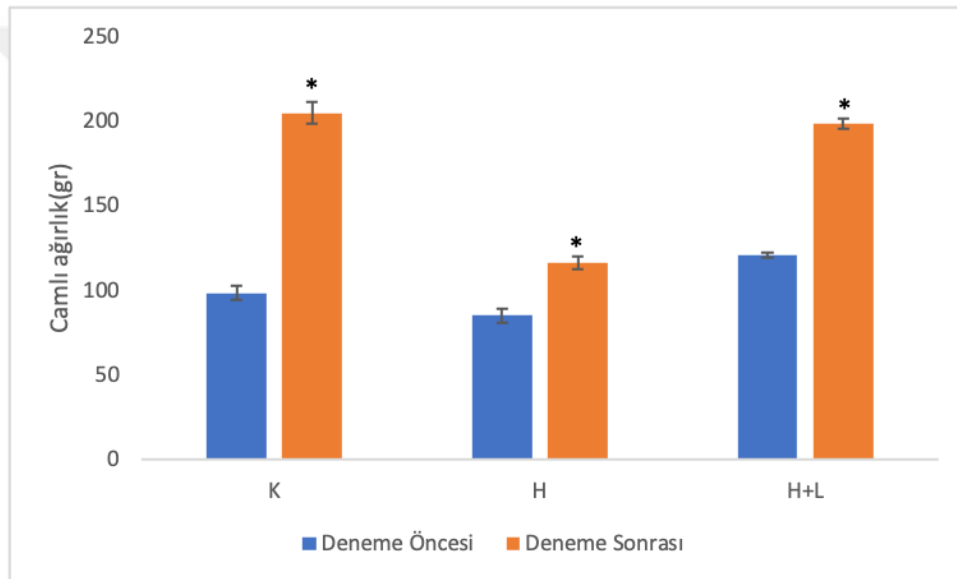


Şekil 4.2.1. Kan glikoz değerleri. K: Kontrol grubu, H: Hipotiroidili grup, H+L: Levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidili grup. *: Gruplar arası farklılıkların %95 oranında ($P<0.05$) önemli olduğunu göstermektedir.

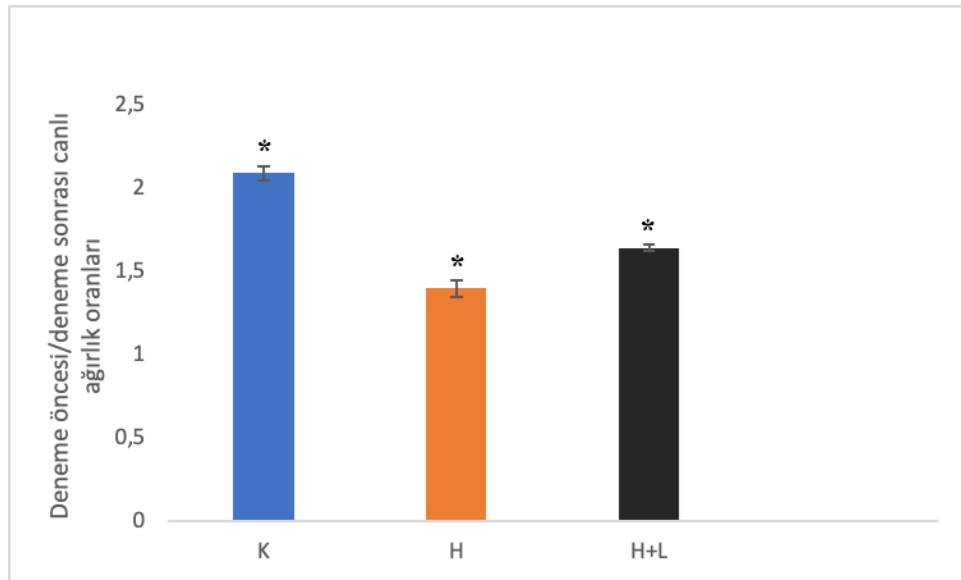
4.3. Canlı ağırlık düzeyleri

Kontrol, hipotiroidili ve Levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotroidili gruplardaki sıçanların deney başlangıcı ve bitiminde saptanan canlı ağırlık ortalamaları şekil 4.3.1’de, canlı ağırlık artış oranları ise şekil 4.3.2’de gösterildi. Tüm gruplardaki sıçanların canlı ağırlıklarının ölçümleri kan glikoz düzeylerinin ölçümünde olduğu gibi yapıldı. Kontrol ve hipotiroidi gruplarındaki sıçanlar deneylerin başlangıcında ve bitiminde olmak üzere iki kez tartıldı. Levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi grubundaki sıçanlar ise denemelerin başlangıcında, hipotiroidi oluşturulduktan sonra ve Levotiroksinle tedavi edildikten sonra deneme bitiminde olmak üzere üç kez tartıldı. Tüm gruplarda canlı ağırlık düzeylerinin deneme sürecinde sıçanların büyümesine paralel olarak değişip değişmediği, canlı ağırlık artış ya da azalış oranının gruplara göre farklı olup olmadığı ve farklılığın istatistiksel açıdan önem taşıyıp taşımadığı incelendi. Deneme başlangıcında tüm gruplara ait sıçanların canlı ağırlıklarında anlamlı farklılık

bulunmadı ($P>0.05$). Ancak denemelerin bitiminde tüm gruplardaki hayvanların canlı ağırlıklarının deneme sürecinde hayvanların büyümesine paralel olarak arttığı ve canlı ağırlıktaki bu artışın istatistiksel açıdan önemli olduğu gözlemlendi ($P<0.05$). Bununla birlikte canlı ağırlık artış oranının gruplara göre farklı olduğu ve bu farklılığın istatistiksel önem taşıdığı saptandı ($P<0.05$). Kontrol grubunda canlı ağırlık artış oranının diğer gruplara göre daha yüksek olduğu, ikinci sırada Levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi grubunun bulunduğu, hipotiroidi grubunun ise en düşük canlı ağırlık artış oranına sahip olduğu tespit edildi (Şekil 4.3.2).



Şekil 4.3.1. Sıçanların deneme öncesi ve deneme sonrası canlı ağırlıkları. K: Kontrol grubu, H: Hipotiroidili grup, H+L: Levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidili grup. *: Gruplar arası farklılıkların %95 oranında ($P<0.05$) önemli olduğunu göstermektedir.

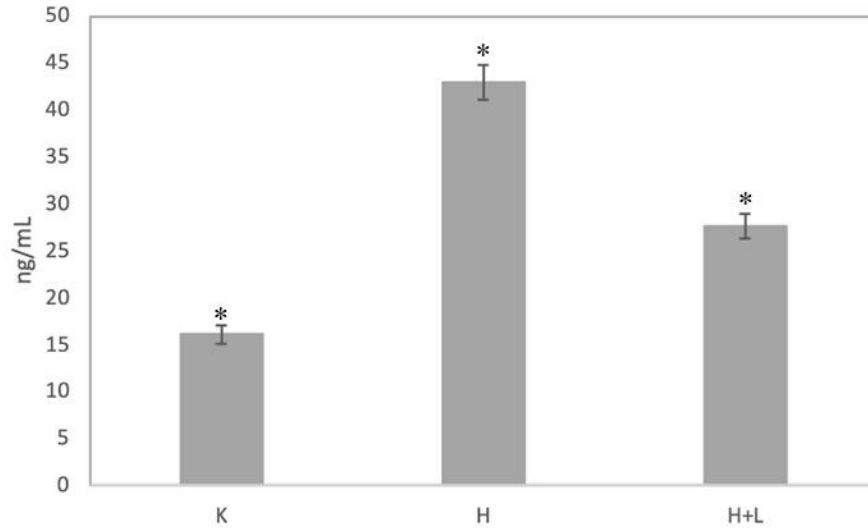


Şekil 4.3.2. Sıçanların deneme öncesi ve deneme sonrası canlı ağırlık artış oranları. K: Kontrol grubu, H: Hipotiroidili grup, H+L: Levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidili grup. *: Gruplar arası farklılıkların %95 oranında ($P < 0.05$) önemli olduğunu göstermektedir.

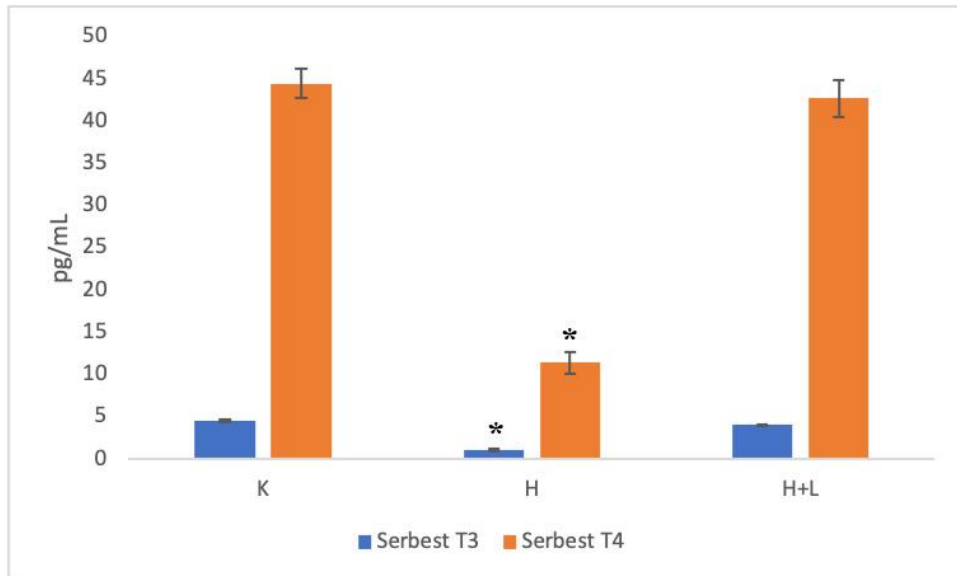
4.4. Tiroid stimule edici hormon (TSH), serbest T3 (sT3) ve serbest T4 (sT4) hormon düzeyleri

Kontrol, hipotiroidili ve Levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili gruplardaki sıçanlardan alınan kan örneklerine ait serum TSH şekil 4.4.1’de, sT3 ve sT4 hormon düzeyleri şekil 4.4.2 ’de gösterildi. Hipotiroidili grupta ve Levotiroksin ile tedavi edilmiş grubun tedavi öncesinde serbest T3 ($1,0279 \pm 0,151$ pg/mL) ve T4 ($11,315 \pm 1,319$ pg/mL) hormon düzeylerinin kontrol grubuna (T3: $4,48 \pm 0,183$ pg/mL; T4: $44,3783 \pm 1,74$ pg/mL) göre önemli ölçüde düşük olduğu, buna karşın hipotiroidili grupta TSH düzeylerinin ise yüksek olduğu (H: $42,9257 \pm 1,822$ ng/mL; K: $16,0917 \pm 0,972$ ng/mL) belirlendi. Levotiroksin ile tedavi edilmiş grupta ise 15 günlük tedavi sonrası özellikle T3 ($3,9869 \pm 0,09$ pg/mL) ve T4 (42.6369 ± 2.218 pg/mL) düzeylerinin kontrol grubu düzeylerine ulaştığı, TSH ($27,6685 \pm 1,342$ ng/mL) düzeylerinin de oldukça düştüğü ancak yine de kontrol grubundakinden yüksek olduğu saptandı. Hormon düzeylerinin gruplara göre farklı olup olmadığı ve farklılığın istatistiksel açıdan önemli olup olmadığı test edildiğinde TSH düzeylerinin tüm gruplarda birbirinden farklı olduğu ve bu farklılıkların da önemli olduğu, ($P < 0.05$) hipotiroidili gruba ait sT3 ve sT4 düzeylerinin ise kontrol grubu ve Levotiroksin ile tedavi edilmiş

gruba ait sT3 ve sT4 düzeylerinden farklı olduğu ve bu farklılıkların istatistiksel açıdan anlamlı olduğu tespit edildi ($P<0.05$).



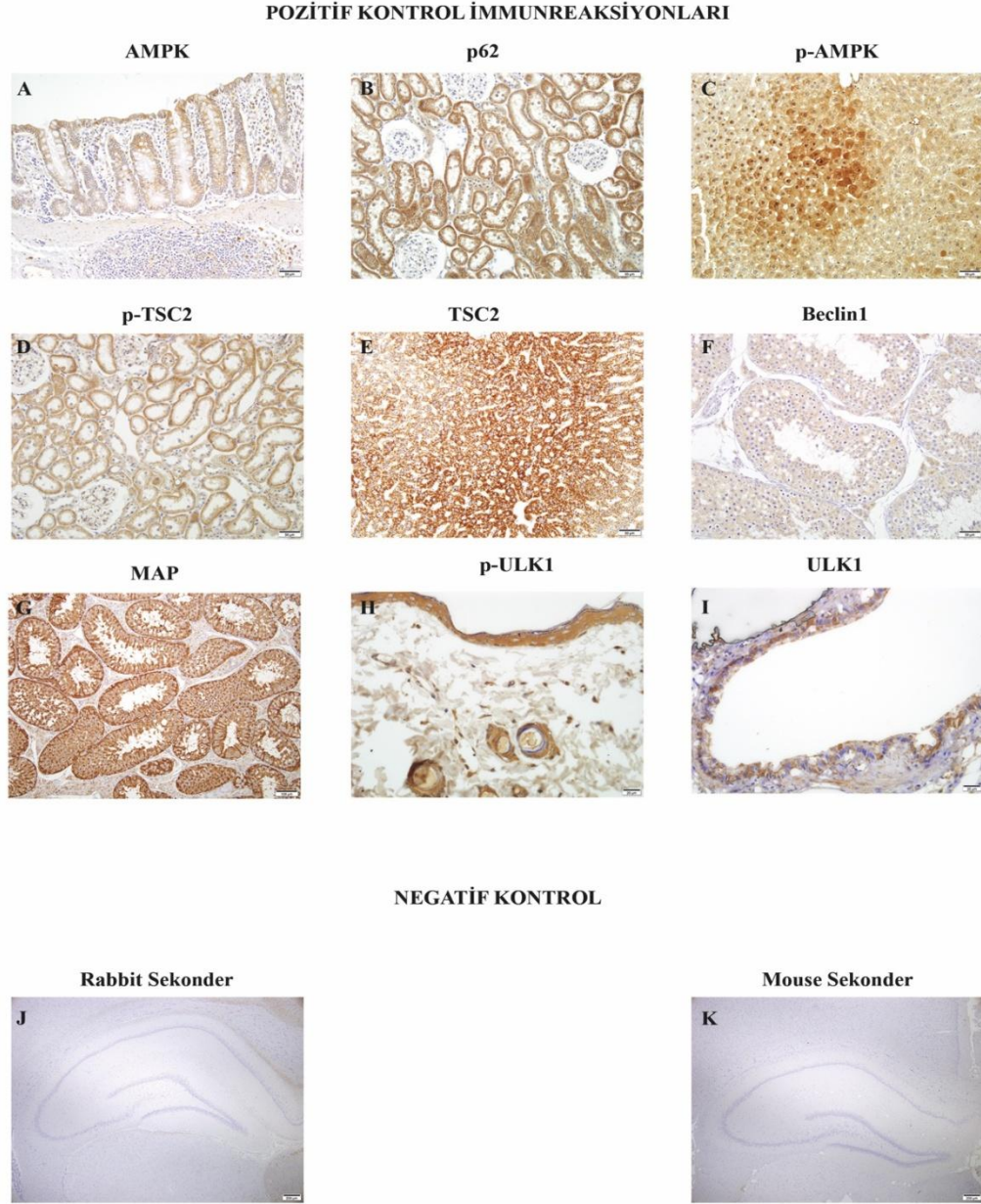
Şekil 4.4.1. Sıçanların TSH hormon düzeyi. K: Kontrol grubu, H: Hipotiroidili grup, H+L: Levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidili grup. *: Gruplar arası farklılıkların %95 oranında ($P<0.05$) önemli olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.4.2. Sıçanların serbest T3 ve serbest T4 hormon düzeyleri. K: Kontrol grubu, H: Hipotiroidili grup, H+L: Levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidili grup. *: Gruplar arası farklılıkların %95 oranında ($P<0.05$) önemli olduğunu göstermektedir.

4.5. Otofaji ile ilişkili proteinlerin ekspresyonları ve immünlokalizasyonları

İmmünohistokimyasal boyamaların ve antikorların sıçan dokuları için spesifik olup olmadığını belirlemek amacıyla kullanılan negatif ve pozitif kontrol dokularındaki boyanmalar şekil 4.5.2’de gösterildi.



Şekil 4.5.1. Sıçan dokularında pozitif (A-I) ve negatif kontrollerde (J-K) immünboyanmalar. İmmünohistokimya tekniği. A: sıçan kolon, B: böbrek, C: karaciğer, D: böbrek, E: karaciğer, F: testis, G: testis, H: deri, I: akciğer, J: hipokampus, K: hipokampus. Objektif büyütmesi: A-F, 20X; G, 10X; H-I, 40X; J-K, 4X.

Tablo 4.1. Kontrol, hipotiroidili ve levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili sıçanların hipokampusünde, otofajiyle ilişkili proteinlerin lokalizasyonları ve boyanma yoğunlukları

		Dentat Girus		Kornu Ammonis			
GRUP		Supra Piramidal	İnfra Piramidal	CA1	CA2	CA3, CA3b	CA3c
Kontrol	AMPK	n:+	n:+	n:+	n:+	n:+	n:+
		c:-	c:-	c:-	c:-	c:-	c:-
		np:++	np:++	np:++	np:++	np:++	np:++
	p-AMPK	n:+	n:+	n:+	n:+	n:+	n:+
		c:++	c:++	c:++	c:++	c:++	c:++
		np:-	np:-	np:-	np:-	np:-	np:-
	mTor	n:-	n:-	n:-	n:-	n:-	n:-
		c:+	c:+	c:++	c:++	c:++	c:++
		np:-	np:-	np:-	np:-	np:-	np:-
	p-mTor	n:++	n:++	n:++	n:++	n:++	n:++
		c:-	c:-	c:-	c:-	c:-	c:-
		np:-	np:-	np:-	np:-	np:-	np:-
	TSC2	n:-	n:-	n:-	n:-	n:-	n:-
		c:+	c:+	c:+	c:+	c:++	c:++
		np:-	np:-	np:-	np:-	np:-	np:-
	p-TSC2	n:+	n:+	n:+	n:+	n:+	n:+
		c:++	c:++	c:++	c:++	c:++	c:++
		np:-	np:-	np:-	np:-	np:-	np:-
	ULK1	n:+	n:+	n:+	n:+	n:+	n:+
		c:++	c:++	c:++	c:++	c:++	c:++
		np:-	np:-	np:-	np:-	np:-	np:-
	MAPLC3 α/β	n:+	n:+	n:+	n:+	n:+	n:+
		c:+++	c:+++	c:+++	c:+++	c:+++	c:+++
		np:-	np:-	np:-	np:-	np:-	np:-
	MAPLC3 A	n:+	n:+	n:+	n:+	n:+	n:+
		c:++	c:++	c:++	c:++	c:++	c:+
		np:-	np:-	np:-	np:-	np:-	np:-
	p62	n:-	n:-	n:-	n:-	n:-	n:-
		c:++	c:++	c:++	c:++	c:++	c:++
		np:-	np:-	np:-	np:-	np:-	np:-

	Beclin1	n:- c:++ np:-	n:- c:++ np:-	n:- c:++ np:-	n:- c:++ np:-	n:- c:++ np:-	n:- c:++ np:-
Hipotiroid							
	AMPK	n:+ c:- np:++	n:+ c:- np:++	n:+ c:- np:++	n:+ c:- np:++	n:+ c:- np:++	n:+ c:- np:++
	p-AMPK	n:+ c:++ np:-	n:+ c:++ np:-	n:+ c:++ np:-	n:+ c:++ np:-	n:+ c:++ np:-	n:+ c:++ np:-
	mTor	n:- c:+ np:-	n:- c:+ np:-	n:- c:++ np:-	n:- c:++ np:-	n:- c:++ np:-	n:- c:++ np:-
	p-mTor	n:++ c:- np:-	n:++ c:- np:-	n:++ c:- np:-	n:++ c:- np:-	n:++ c:- np:-	n:++ c:- np:-
	TSC2	n:- c:+ np:-	n:- c:+ np:-	n:- c:++ np:-	n:- c:++ np:-	n:- c:++ np:-	n:- c:++ np:-
	p-TSC2	n:+ c:++ np:-	n:+ c:++ np:-	n:+ c:++ np:-	n:+ c:++ np:-	n:+ c:++ np:-	n:+ c:++ np:-
	ULK1	n:+ c:++ np:-	n:+ c:++ np:-	n:+ c:++ np:-	n:+ c:++ np:-	n:+ c:++ np:-	n:+ c:++ np:-
	MAPLC3α /β	n:+ c:+++ np:-	n:+ c:+++ np:-	n:+ c:+++ np:-	n:+ c:+++ np:-	n:+ c:+++ np:-	n:+ c:+++ np:-
	MAPLC3A	n:+ c:++ np:-	n:+ c:++ np:-	n:+ c:++ np:-	n:+ c:++ np:-	n:+ c:++ np:-	n:+ c:++ np:-
	p62	n:- c:+ np:-	n:- c:+ np:-	n:- c:+ np:-	n:- c:+ np:-	n:- c:+ np:-	n:- c:+ np:-
	Beclin1	n:- c:+ np:-	n:- c:+ np:-	n:- c:+ np:-	n:- c: np:-	n:- c:+ np:-	n:- c:+ np:-

**Levotiroksin
ile Tedavi
Edilen**

AMPK	n:+	n:+	n:+	n:+	n:+	n:+
	c:-	c:-	c:-	c:-	c:-	c:-
	np:++	np:++	np:++	np:++	np:++	np:++
p-AMPK	n:+	n:+	n:+	n:+	n:+	n:+
	c:++	c:++	c:++	c:++	c:++	c:++
	np:-	np:-	np:-	np:-	np:-	np:-
mTor	n:-	n:-	n:-	n:-	n:-	n:-
	c:+	c:+	c:++	c:++	c:++	c:++
	np:-	np:-	np:-	np:-	np:-	np:-
p-mTor	n:++	n:++	n:++	n:++	n:++	n:++
	c:-	c:-	c:-	c:-	c:-	c:-
	np:-	np:-	np:-	np:-	np:-	np:-
TSC2	n:-	n:-	n:-	n:-	n:-	n:-
	c:+	c:+	c:++	c:++	c:++	c:++
	np:-	np:-	np:-	np:-	np:-	np:-
p-TSC2	n:+	n:+	n:+	n:+	n:+	n:+
	c:++	c:++	c:++	c:++	c:++	c:++
	np:-	np:-	np:-	np:-	np:-	np:-
ULK1	n:+	n:+	n:+	n:+	n:+	n:+
	c:++	c:++	c:++	c:++	c:++	c:++
	np:-	np:-	np:-	np:-	np:-	np:-
MAPLC3α /β	n:+	n:+	n:+	n:+	n:+	n:+
	c:+++	c:+++	c:+++	c:+++	c:+++	c:+++
	np:-	np:-	np:-	np:-	np:-	np:-
MAPLC3 A	n:+	n:+	n:+	n:+	n:+	n:+
	c:++	c:++	c:++	c:++	c:++	c:+
	np:-	np:-	np:-	np:-	np:-	np:-
p62	n:-	n:-	n:-	n:-	n:-	n:-
	c:+	c:+	c:+	c:+	c:+	c:+
	np:-	np:-	np:-	np:-	np:-	np:-
Beclin1	n:-	n:-	n:-	n:-	n:-	n:-
	c:+	c:	c:+	c:+	c:+	c:+
	np:-	np:-	np:-	np:-	np:-	np:-

np: nöropil, c: sitoplazma, n: çekirdek, -: negatif boyanma, +:

zayıf. boyanma, ++: orta, +++: güçlü boyanma.

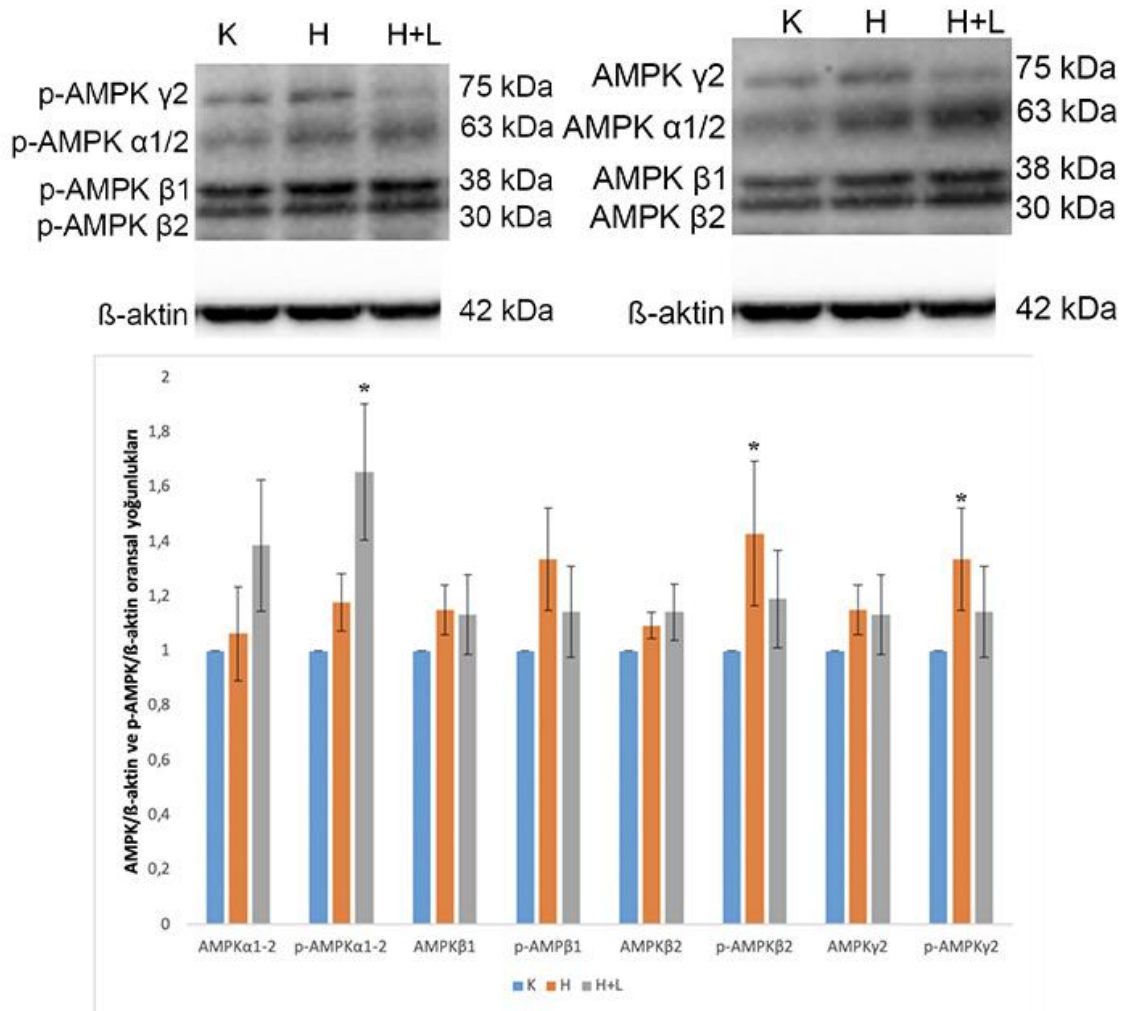
4.5.1.1. AMPK ve p-AMPK ekspresyonu ve immünlökizasyonu

Kontrol, hipotiroidili ve Levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili gruplardaki sıçanlardan alınan hipokampus dokusunda endojen kinaz AMPK α 1/2 ve bunun fosforile edilmiş p-AMPK-Thr183/Thr172 formundaki potansiyel değışiklikler western blot, immünohistokimya ve immünofloresan analiz yöntemleriyle incelendi. Western blot analizinde total AMPK ve p-AMPK α 1/2-Thr183/Thr172 membranlar üzerinde farklı moleküler ağırlığa sahip bantlar halinde gözlemlendi.

Çalışmada total AMPK'nın alfa 1 (α 1) ve alfa 2 (α 2) alt tiplerinin ekspresyonunu belirlemek için kullanılan antikoru AMPK α 1 ve 2'nin yanı sıra beta 1 (β 1) ve 2 (β 2) ile gama 2 (γ 2) için pozitif reaksiyon verdiği tespit edildi. Aynı şekilde western blot örneklerinde p-AMPK α 1/2-Thr183/Thr172 antikoru p-AMPK'nın farklı alt tiplerinin (α 1, α 2, β 1, β 2 ve γ 2) varlığını gösterdi. AMPK ve p-AMPK'nın alt tiplerinin moleküler ağırlıkları şekil 4.5.3'de verildi.

Western blot analiz sonuçları hipotiroidili sıçanlarda total AMPK β 1 ve p-AMPK β 1'in ekspresyon düzeylerinin kontrol ve Levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili gruptaki hayvanlara göre daha yüksek olduğunu, ancak gruplararası farklılıkların önemli olmadığını gösterdi ($P>0.05$). p-AMPK β 2 ekspresyon düzeyi ise hipotiroidili gruptaki sıçan hipokampuslerinde diğer gruplardakinden anlamlı olarak daha yüksek iken ($P<0.05$), AMPK β 2 düzeyi Levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili grupta diğer gruptakilere göre daha yüksek bulundu, ancak gruplararası farklılık önemsizdi ($P>0.05$).

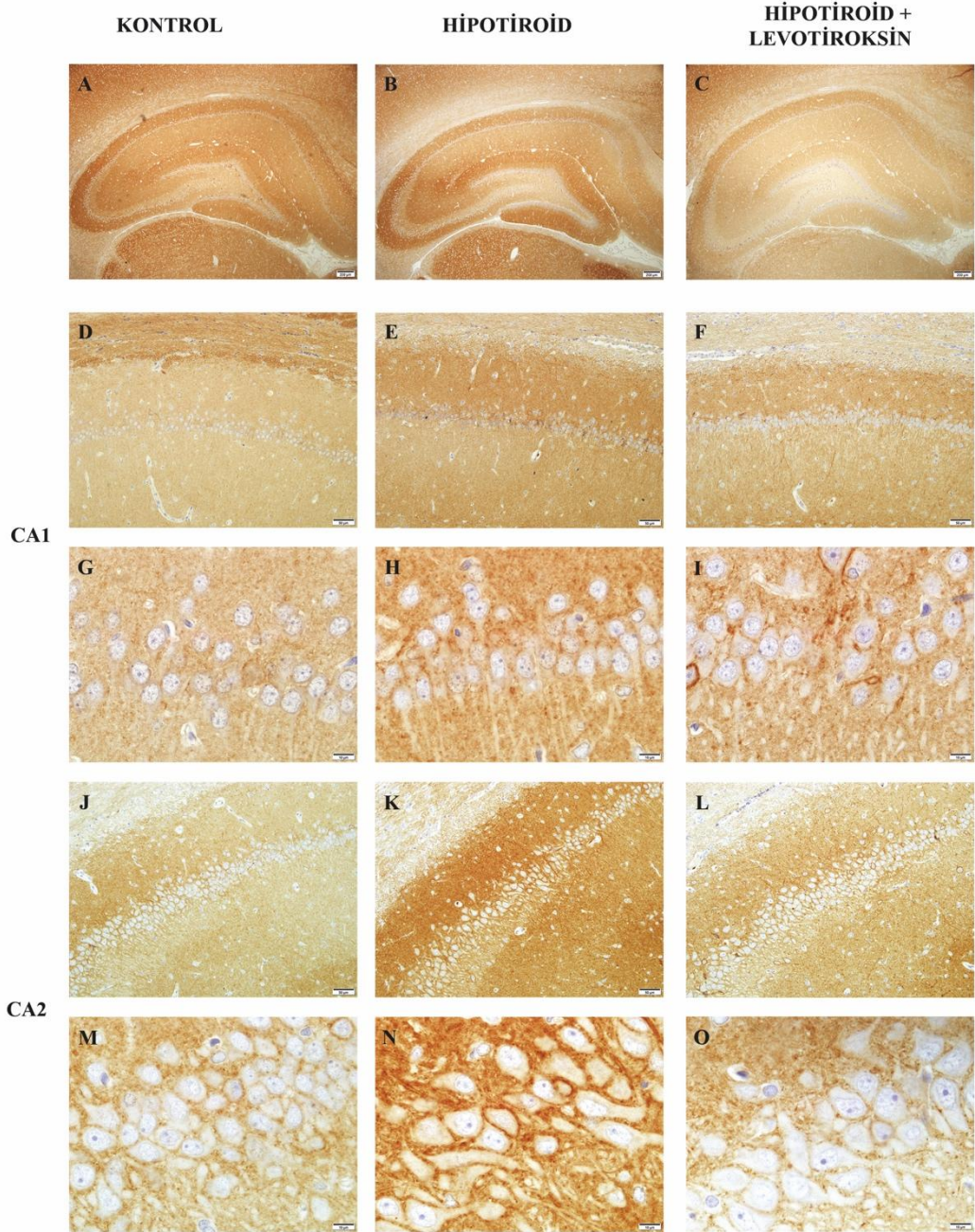
Total AMPK α 1/2 ekspresyonu Levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili grupta diğer gruptakilere göre önemsiz derecede yüksek ($P>0.05$) iken, p-AMPK α 1/2 ekspresyonu ise yine bu grupta kontrol grubundakinden anlamlı olarak yüksek ($P<0.05$) bulundu. Total AMPK γ 2 ve p-AMPK γ 2 ekspresyonlarının hipotiroidili gruptaki sıçanların hipokampuslerinde diğer gruplardakine kıyasla daha yüksek olduğu görüldü. Total AMPK γ 2 için gruplararası farklılık önemli bulunmazken ($P>0.05$), hipotiroidili gruptaki p-AMPK γ 2 ekspresyonunun kontrol ve Levotiroksin ile tedavi edilmiş grupların her ikisindeki ekspresyon düzeylerinden anlamlı düzeyde farklı bulundu ($P<0.05$).



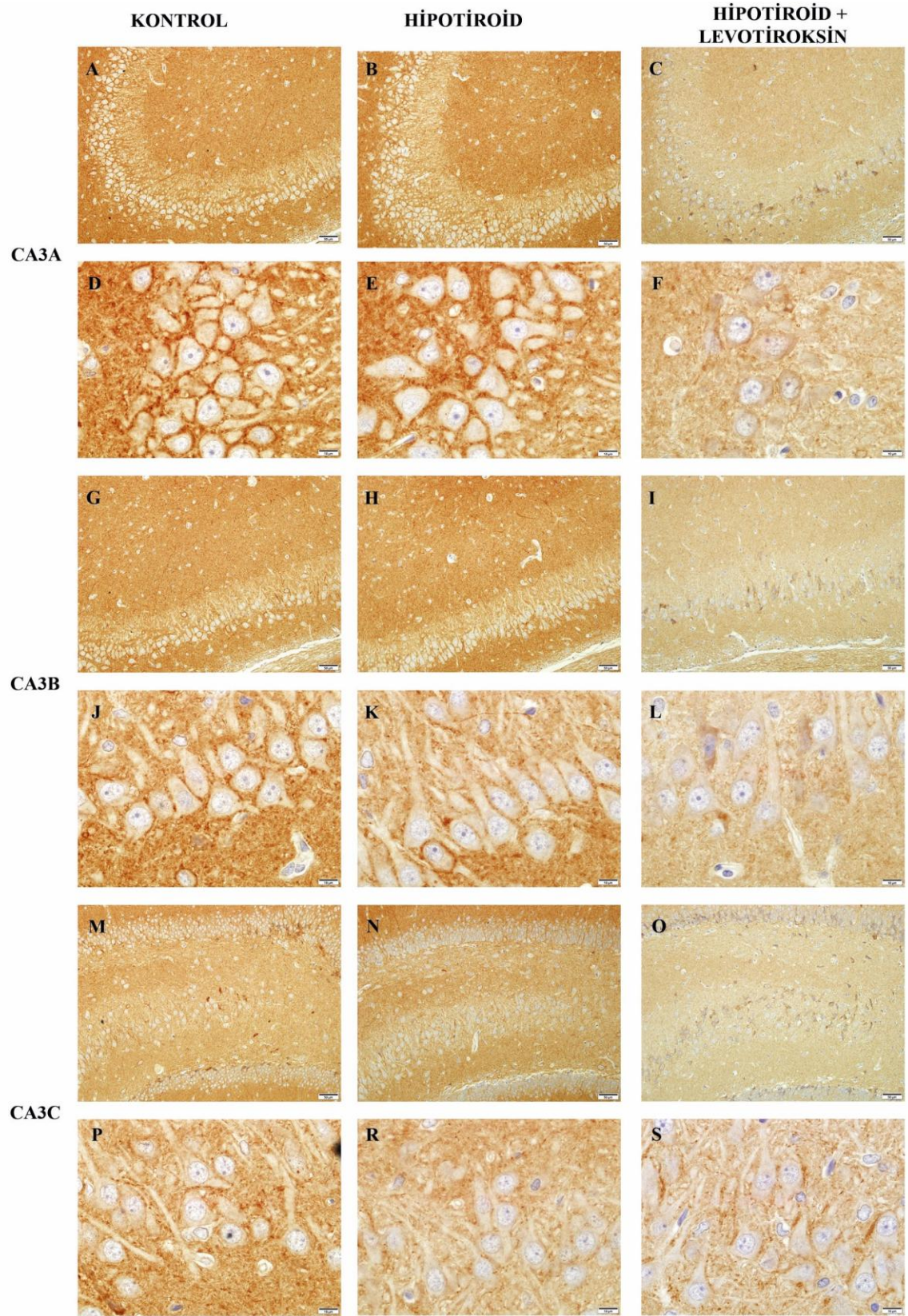
Şekil 4.5.2. Kontrol, hipotiroidili ve Levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili sıçanların hipokampusünde AMPK ve p-AMPK ekspresyonları. Western blot analiz yöntemi. *: Gruplar arası farklılıkların %95 oranında ($P < 0.05$) önemli olduğunu göstermektedir.

İmmünohistokimyasal analizde AMPK'nın hipokampusde yoğun olarak nöropilde ve hücre çekirdeklerinde lokalize olduğu, p-AMPK'nın ise sitoplazmik ve bazı nöronlarda çekirdek yerleşimi gösterdiği belirlendi. Hipokampus bölgelerindeki AMPK immünreaksiyonunun kontrol grubuna göre hipotiroidili ve Levotiroksin ile tedavi edilmiş gruplarda artış gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.5.3 - 4.5.5). p-AMPK'nın nöropilde ekspresyonuna rastlanmadı. Hipotiroidili ve Levotiroksin ile tedavi edilen gruptaki sıçanların hipokampusünde p-AMPK immünreaksiyonunun kontrol grubuna göre CA3a bölgesindeki nöronların çekirdek ve sitoplazmalarında ve dentat girusun granüler katmandaki nöronların çekirdeklerinde arttığı görüldü.

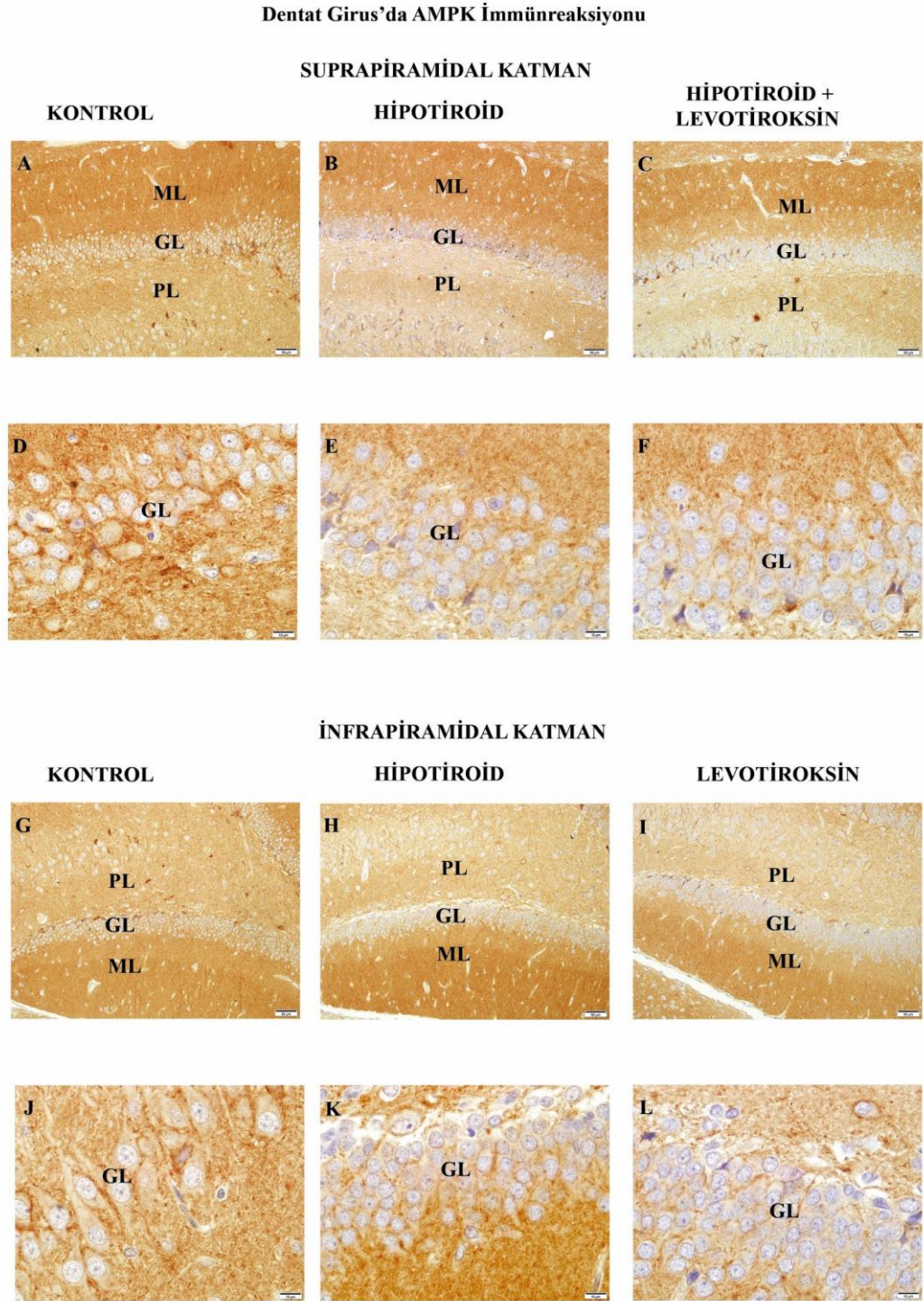
HİPOKAMPÜS'DE AMPK İMMÜNREAKSİYONU



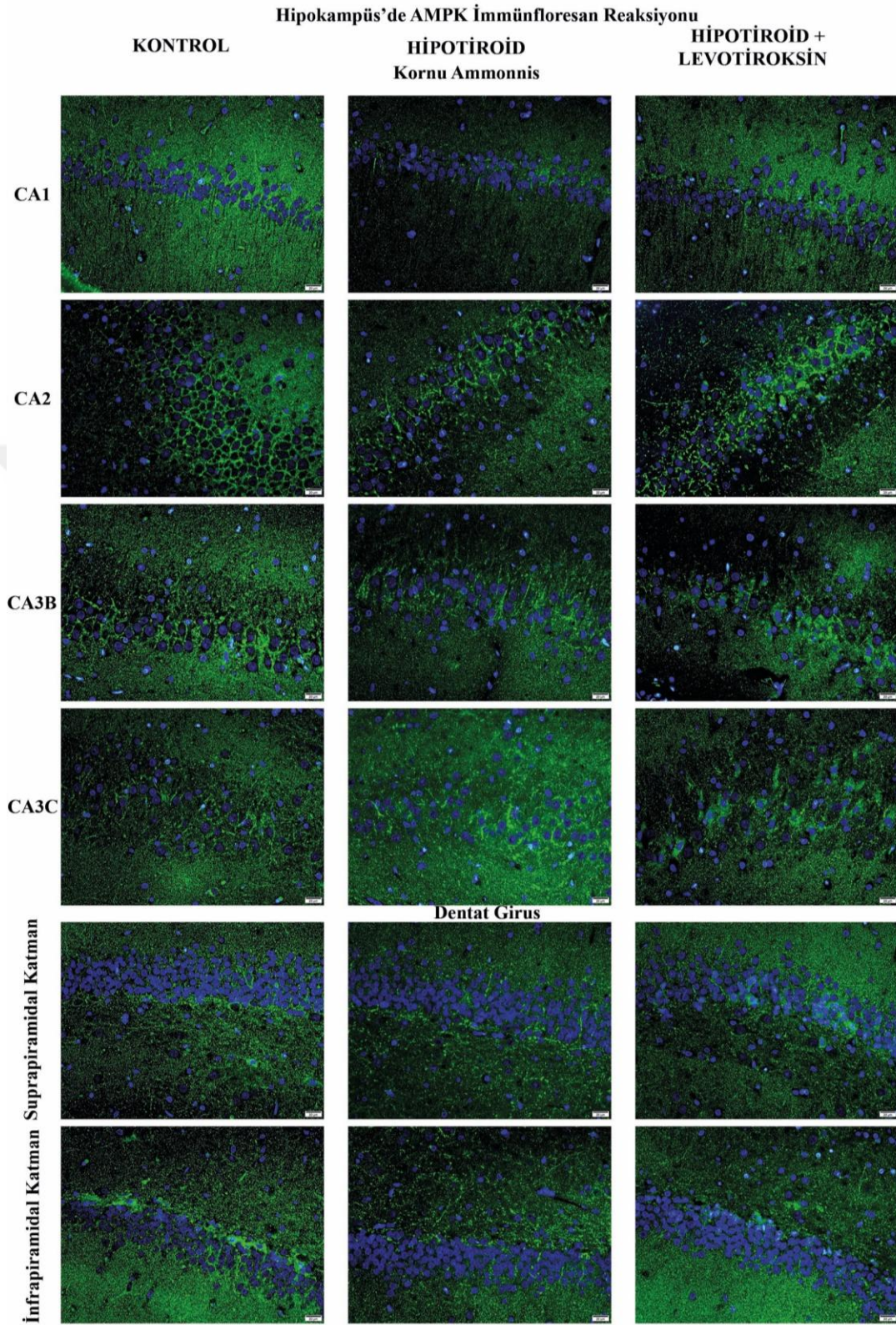
Şekil 4.5.3. Kornu ammonisdeki CA1 ve CA2 bölgesinde stratum piramidaledeki AMPK immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Strepavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 4X; D-F, 20X; G-I, 100X; J-L, 20X; M-O, 100X.



Şekil 4.5.4. Kornu ammonis'deki CA3 bölgesinde AMPK immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X; M-O, 20X; P-S, 100X.

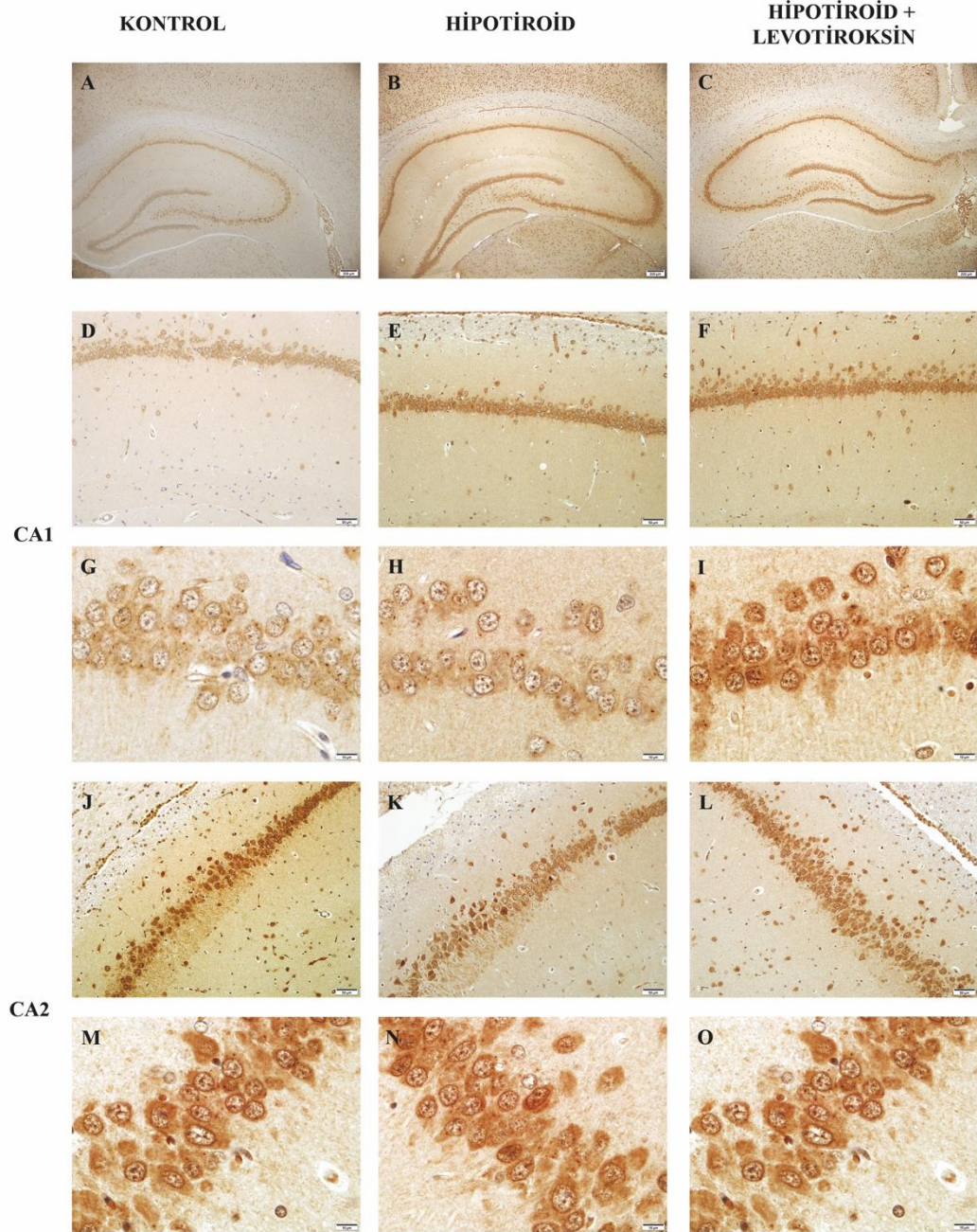


Şekil 4.5.5. Hipokampusun dentat girus bölgesinde AMPK immünlokalizasyonu. PL: Pleomorfik katman, GL: Granüler katman, ML: Moleküler katman. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X.

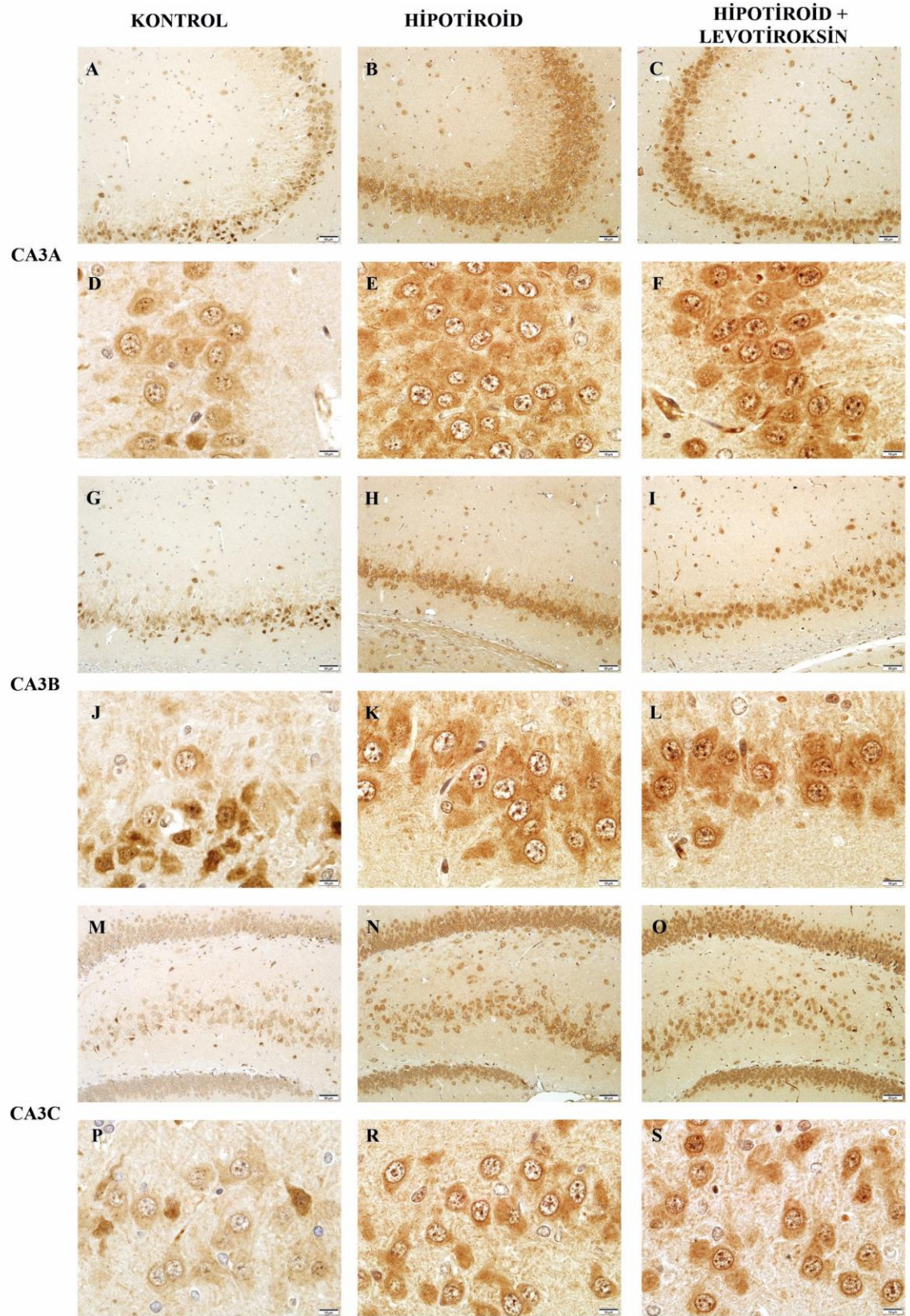


Şekil 4.5.6. Hipokampusün kornu ammonis ve dentat girusunda AMPK immünreaksiyon. İmmü floresan yöntemi. Objektif büyütmesi 40X.

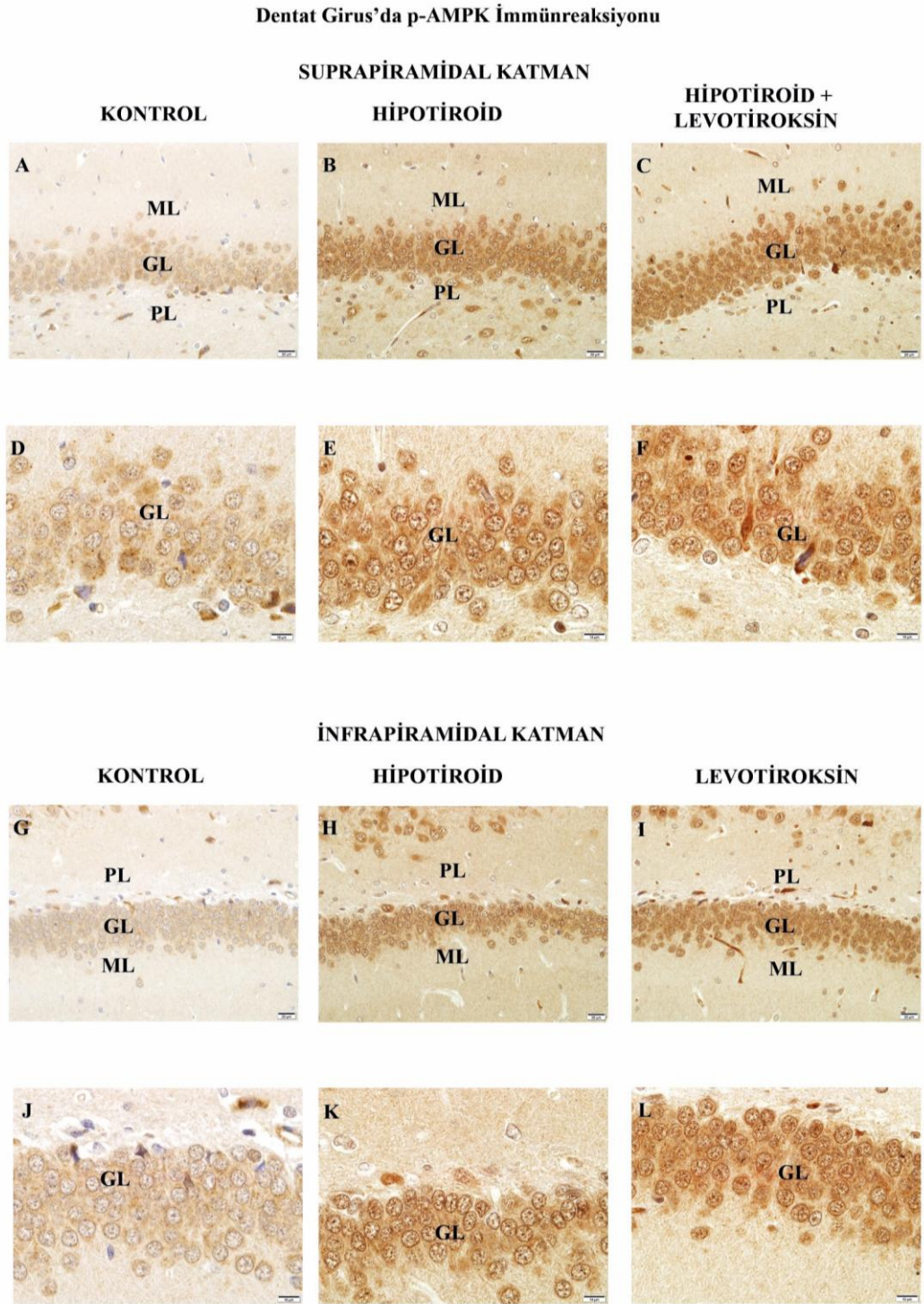
HİPOKAMPÜS'DE p-AMPK İMMÜNREAKSİYONU



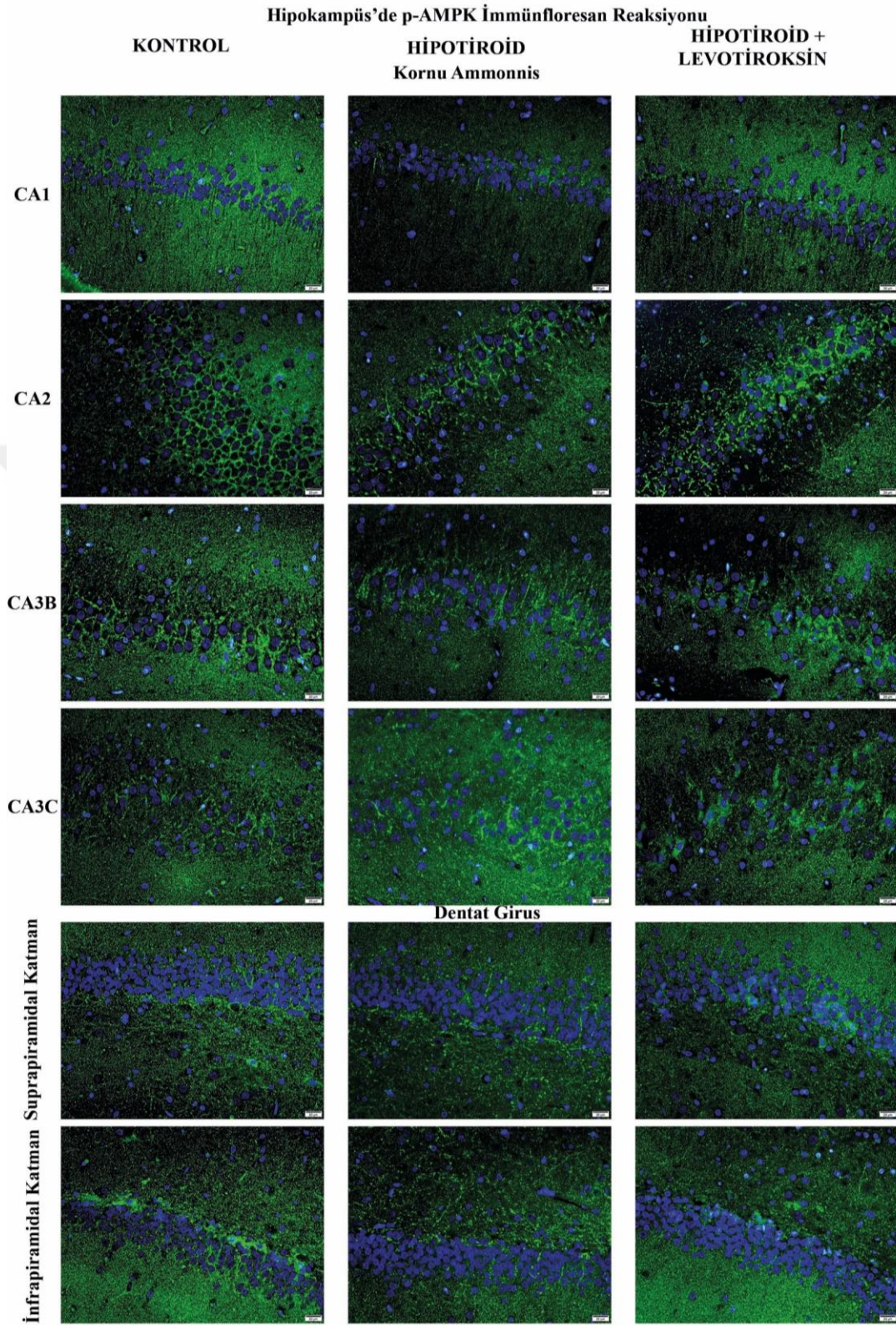
Şekil 4.5.7. Kornu ammonis'deki CA1 ve CA2 bölgesinde p-AMPK immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 4X; D-F, 20X; G-I, 100X; J-L, 20X; M-O, 100X.



Şekil 4.5.8. Kornu ammonis'deki CA3 bölgesinin p-AMPK immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X; M-O, 20X; P-S, 100X.



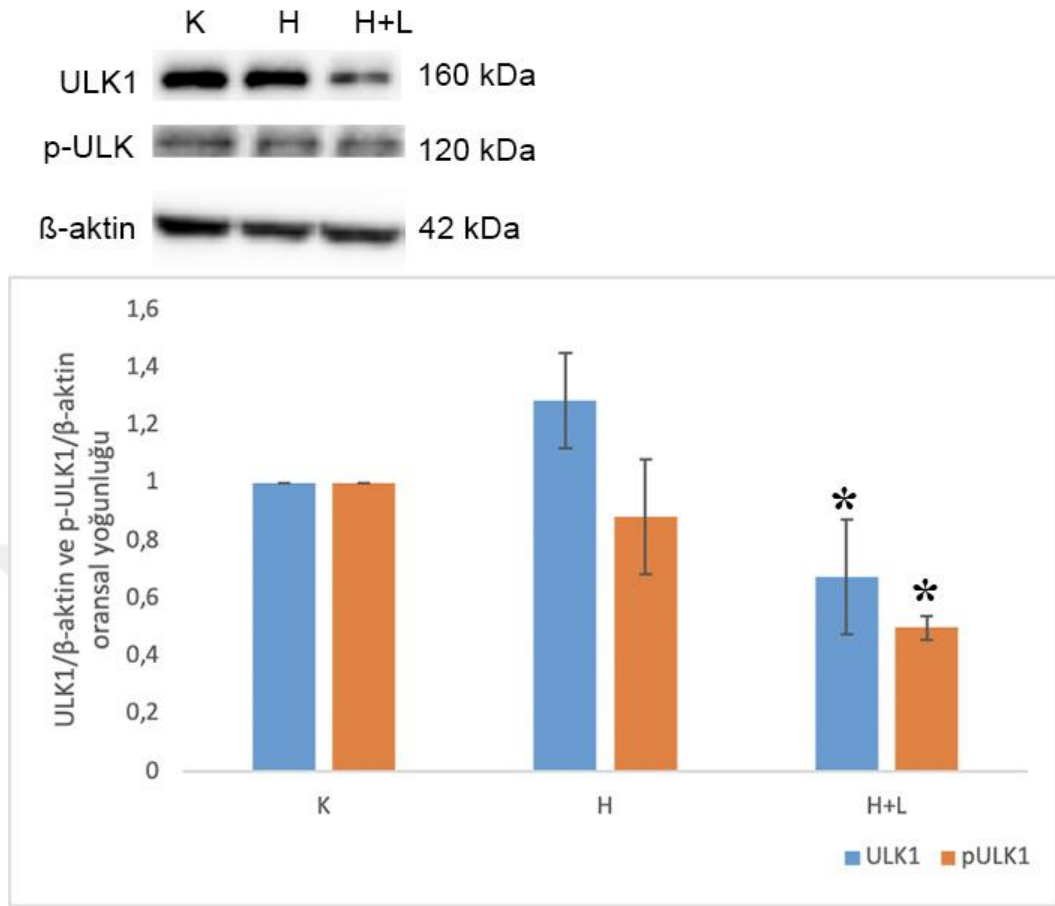
Şekil 4.5.9. Hipokampusun dentat girus bölgesinin p-AMPK immünlokalizasyonu. PL: Pleomorfik katman, GL: Granüler katman, ML: Moleküler katman. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X.



Şekil 4.5.10. Hipokampusün kornu ammonis ve dentat girusunda p-AMPK immünreaksiyoun. İmmünfloresan yöntemi. Objektif büyütmesi 40X.

4.5.2. ULK1 ve p-ULK1 ekspresyonu ve immünlökalizasyonu

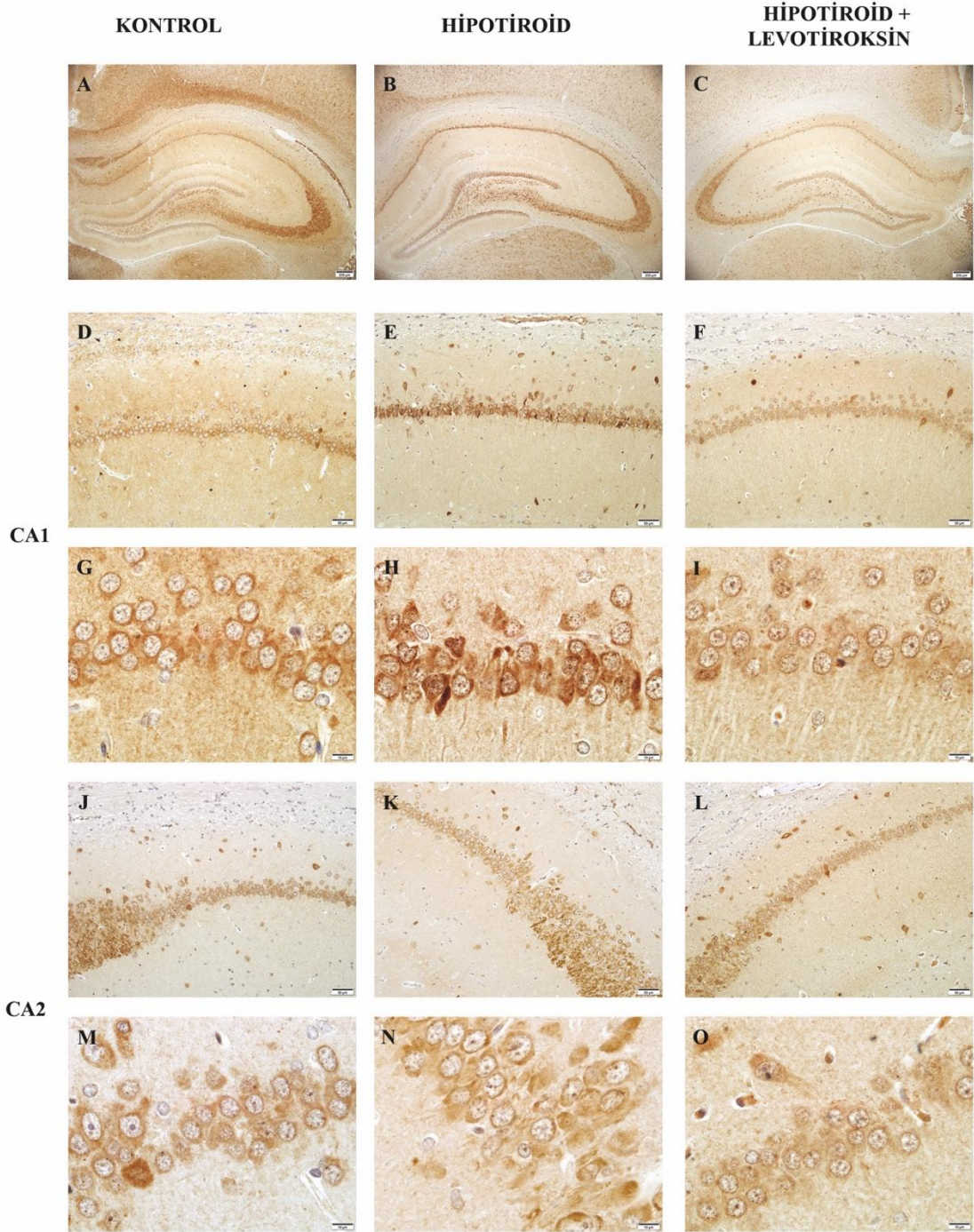
Kontrol, hipotiroidili ve Levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili gruptaki sıçanlardan alınan hipokampus doku örneklerinde ULK1 ve bunun fosforile edilmiş p-ULK1-S556 formunun ekspresyon düzeyindeki potansiyel değişiklikler western blot, immünohistokimya ve immünofloresan analiz yöntemleriyle incelendi. Western blot analiz sonuçlarına göre ULK1 ekspresyon düzeyinin hipotiroidili gruptaki sıçanların hipokampusünde en yüksek, Levotiroksin ile tedavi edilmiş gruptaki hayvanlarda ise en düşük olduğu belirlendi. ULK1 ekspresyonu gruplar arasında karşılaştırıldığında kontrol grubu ile hipotiroidi grubu ve kontrol grubu ile Levotiroksin ile tedavi edilmiş grup arasında önemli farklılık gözlenmezken, Levotiroksin ile tedavi edilmiş gruptaki sıçanların hipokampusünde ULK1 düzeyinin hipotiroidili gruptakinden önemli ölçüde daha düşük olduğu ($P<0.05$) tespit edildi. p-ULK1 düzeyinin ise Levotiroksin ile tedavi edilmiş grupta en düşük olduğu ve bu grup ile kontrol grubu arasındaki farklılığın önemli olduğu ($P<0.05$) belirlendi. Ortalama p-ULK1-S556 miktarının toplam ULK1 miktarına oranı gruplara göre kıyaslandığında, istatistiksel bir fark olmasa da ($P>0.05$) Levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili sıçanların hipokampuslerinde diğer gruptakinden daha düşük bir p-ULK1-S556/toplam ULK1 oranının bulunduğu tespit edildi.



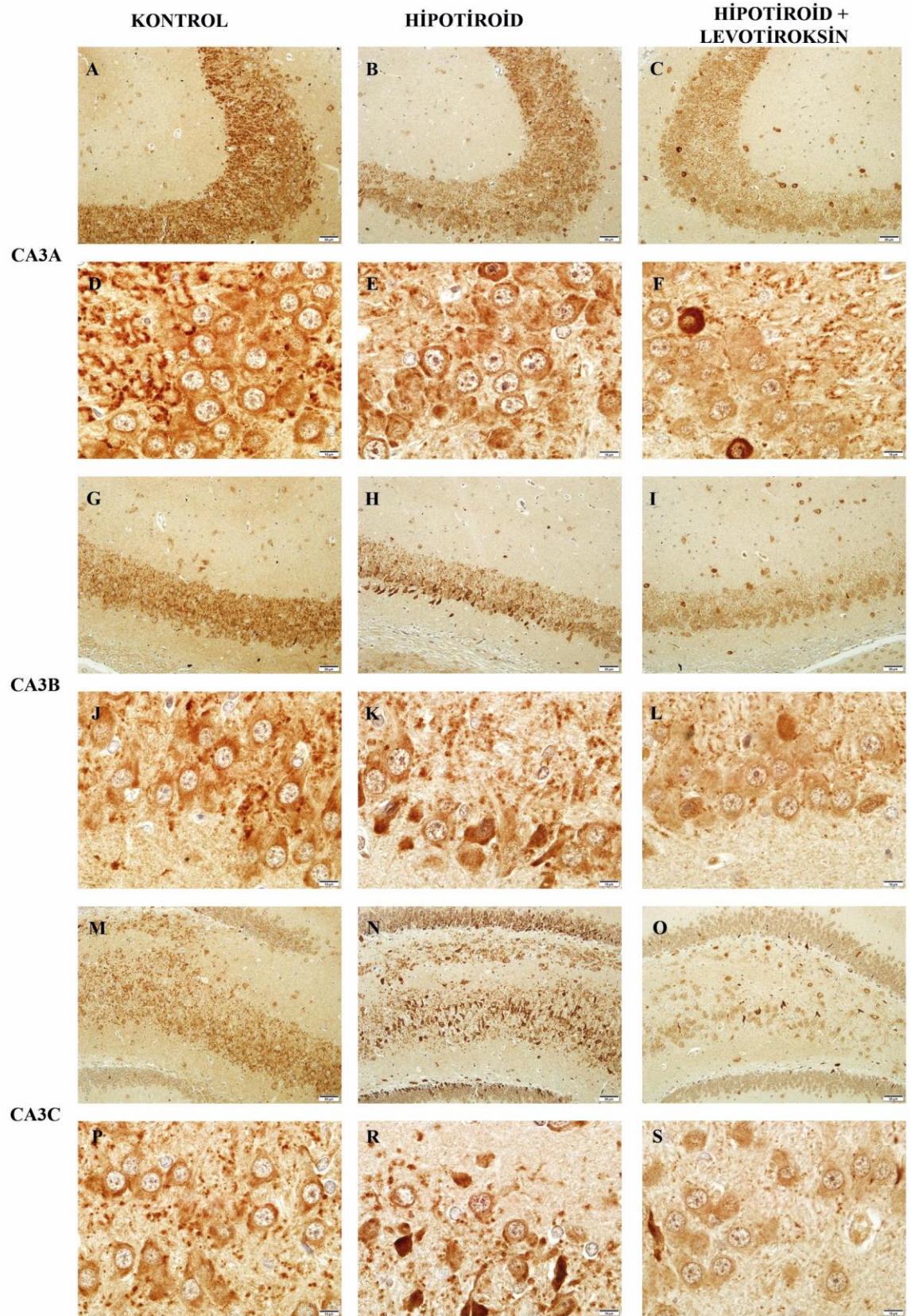
Şekil 4.5.11. Kontrol, hipotiroidili ve levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili sıçanların ULK1 ve p-ULK1 ekspresyonları. Western blot analiz yöntemi. *: Gruplar arası farklılıkların %95 oranında ($P < 0.05$) önemli olduğunu göstermektedir.

İmmunohistokimyasal incelemede hipokampüsün kornu ammonis ve dentat girus bölgesinde ULK1'in ve p-ULK1-S556'nın tüm hücrelerde sitoplazmik ekspresyonu görüldü. Bazı nöronlarda ULK1'in intranükleer ekspresyonu görülürken, her iki protein için nöropilde ekspresyona rastlanmadı. Hipokampüsün kornu ammonis ve dentat girus bölgelerindeki ULK1 immünreaksiyonunun genel olarak hipotiroidili sıçanlarda daha yoğun olduğu, Levotiroksin ile tedavi edilmiş sıçanlarda ise diğer gruplara göre daha zayıf bir boyanmanın olduğu gözlemlendi (Şekil 4.5.12 - 4.5.14). Hipotiroidili ve Levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidili gruptaki sıçanların hipokampüsünde p-ULK1-S556 immünreaksiyonunun genel olarak hipokampüs bölgelerinde kontrol grubuna göre daha zayıf olduğu tespit edildi (Şekil 4.5.15 - 4.5.17).

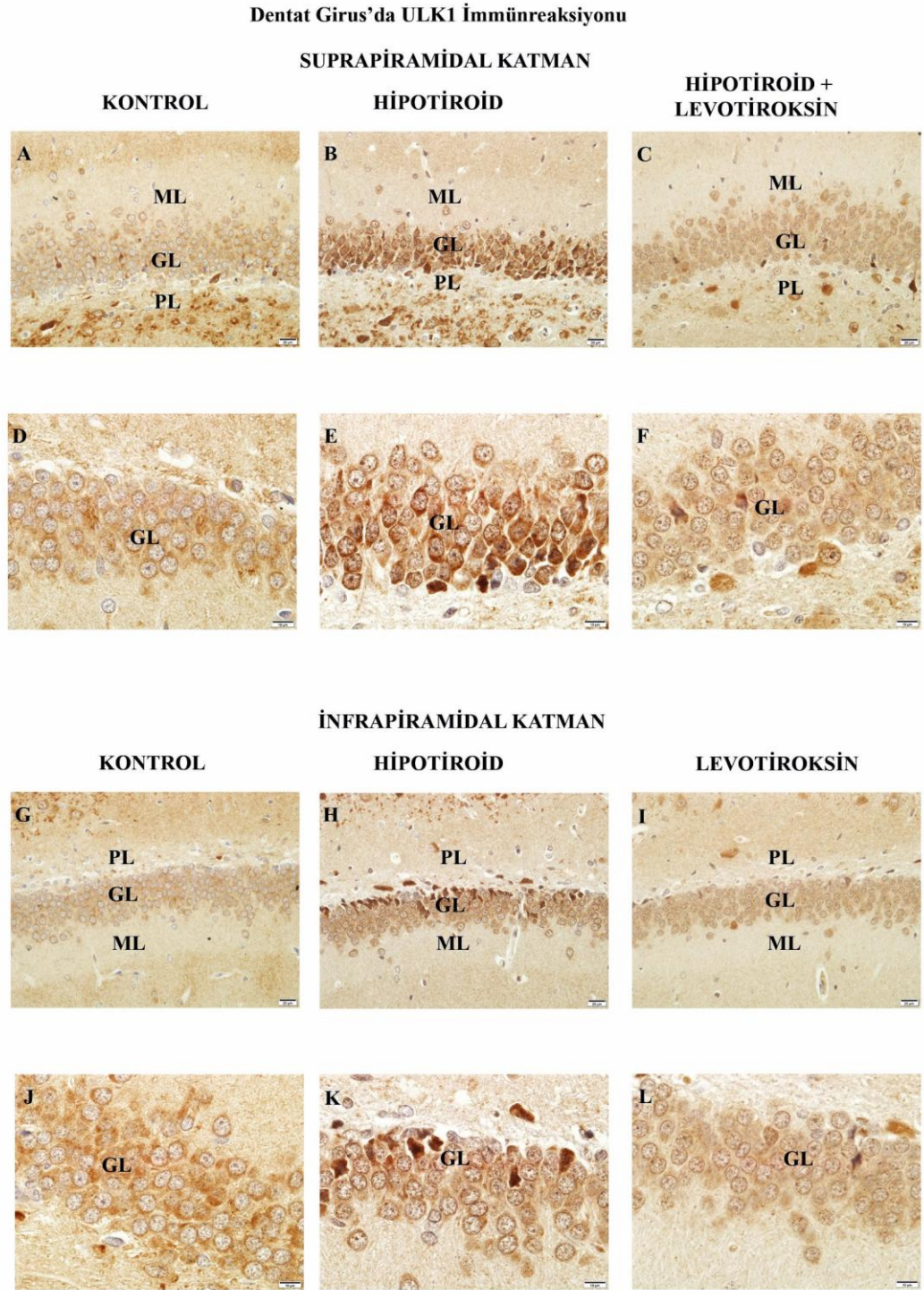
HİPOKAMPÜS'DE ULK1 İMMÜNREAKSİYONU



Şekil 4.5.12. Kornu ammonis'deki CA1 ve CA2 bölgesinin ULK1 immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 4X; D-F, 20X; G-I, 100X; J-L, 20X; M-O, 100X.

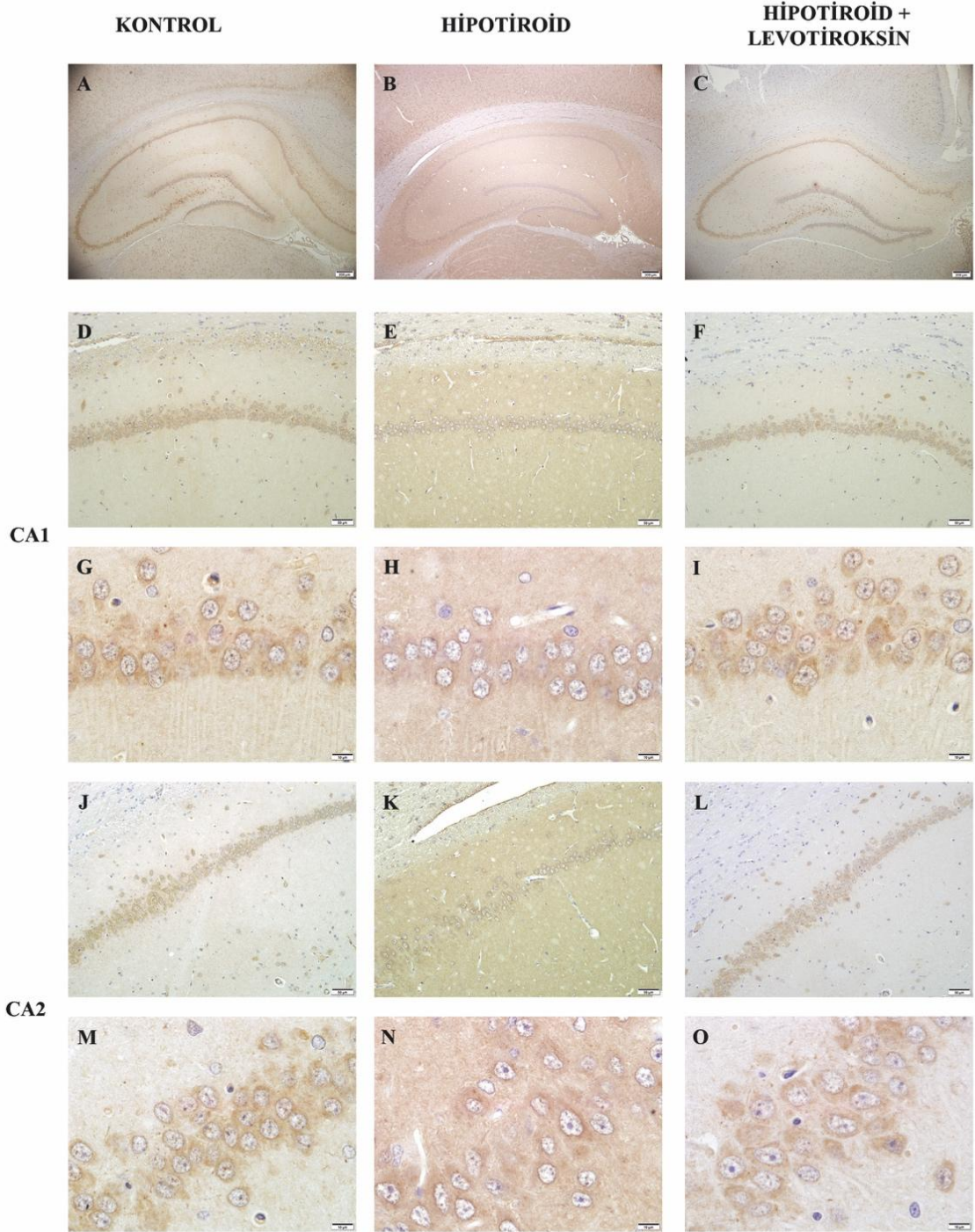


Şekil 4.5.13. Kornu ammonis'deki CA3 bölgesinin ULK1 immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X; M-O, 20X; P-S, 100X.

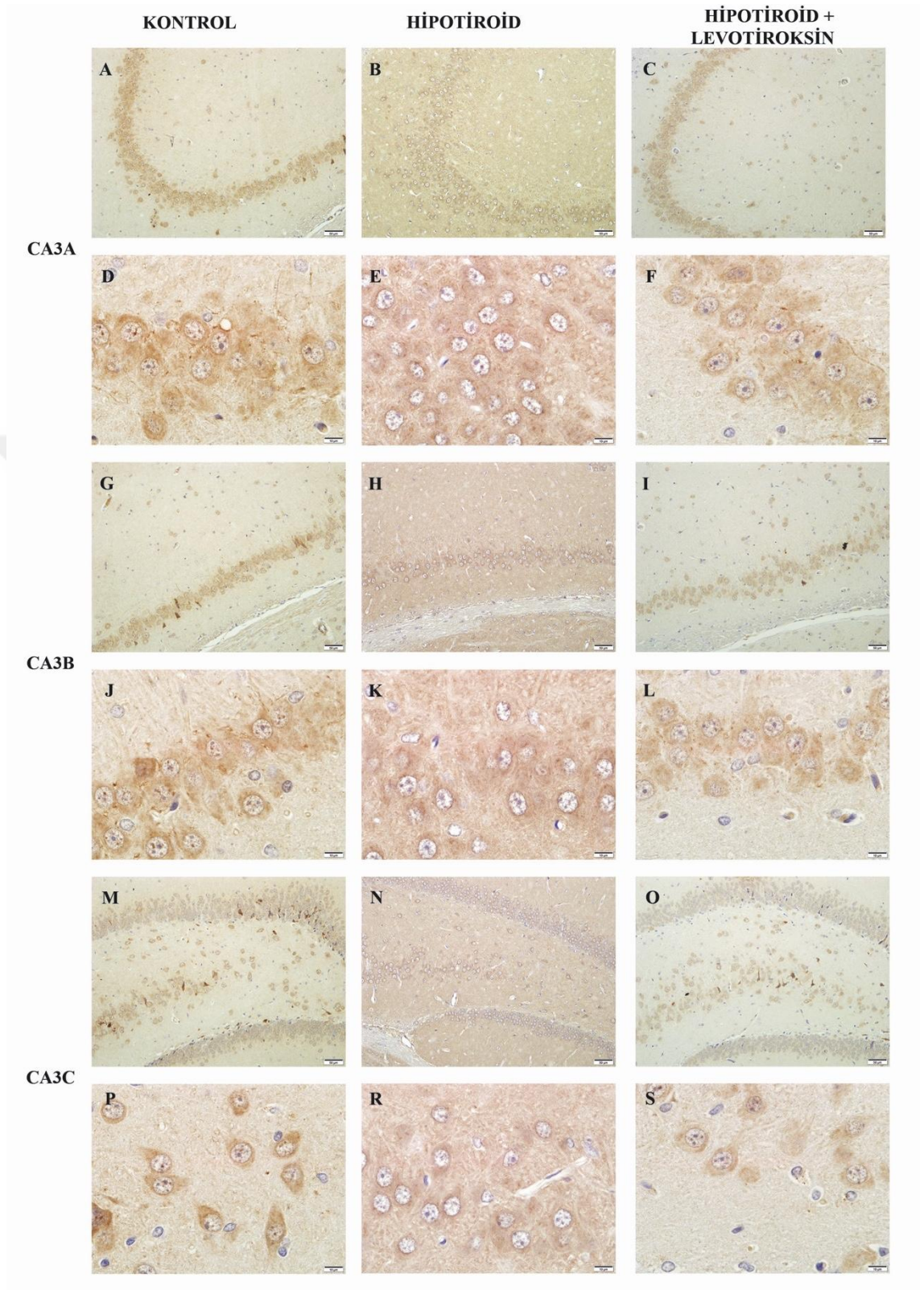


Şekil 4.5.14. Hipokampusun dentat girus bölgesinin ULK1 immünlokalizasyonu. PL: Pleomorfik katman, GL: Granüler katman, ML: Moleküler katman. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X.

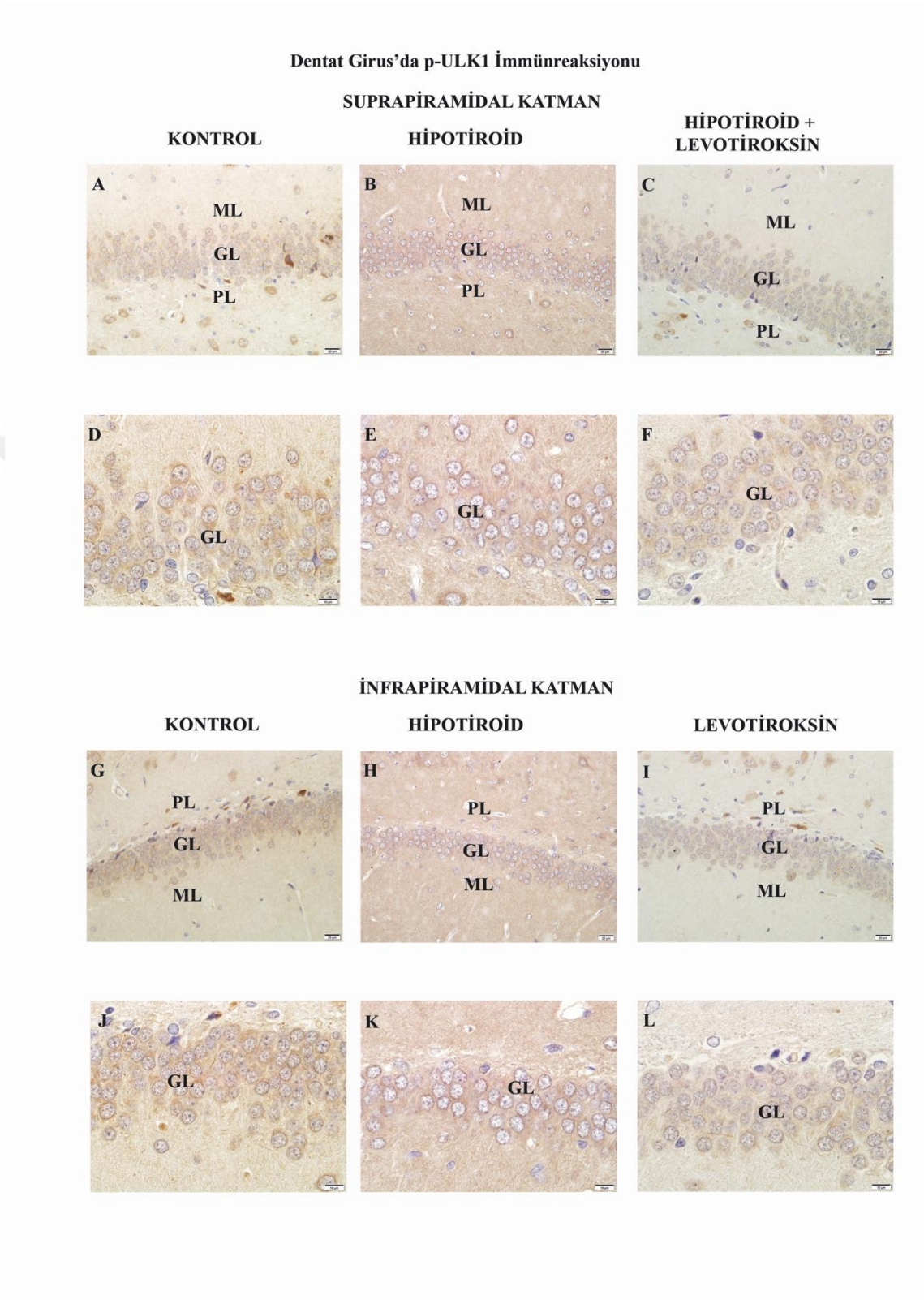
HİPOKAMPÜS'DE p-ULK1 İMMÜNREAKSİYONU



Şekil 4.5.15. Kornu ammonis'deki CA3 bölgesinin p-ULK1 immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Strepavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 4X; D-F, 20X; G-I, 100X; J-L, 20X; M-O, 100X.



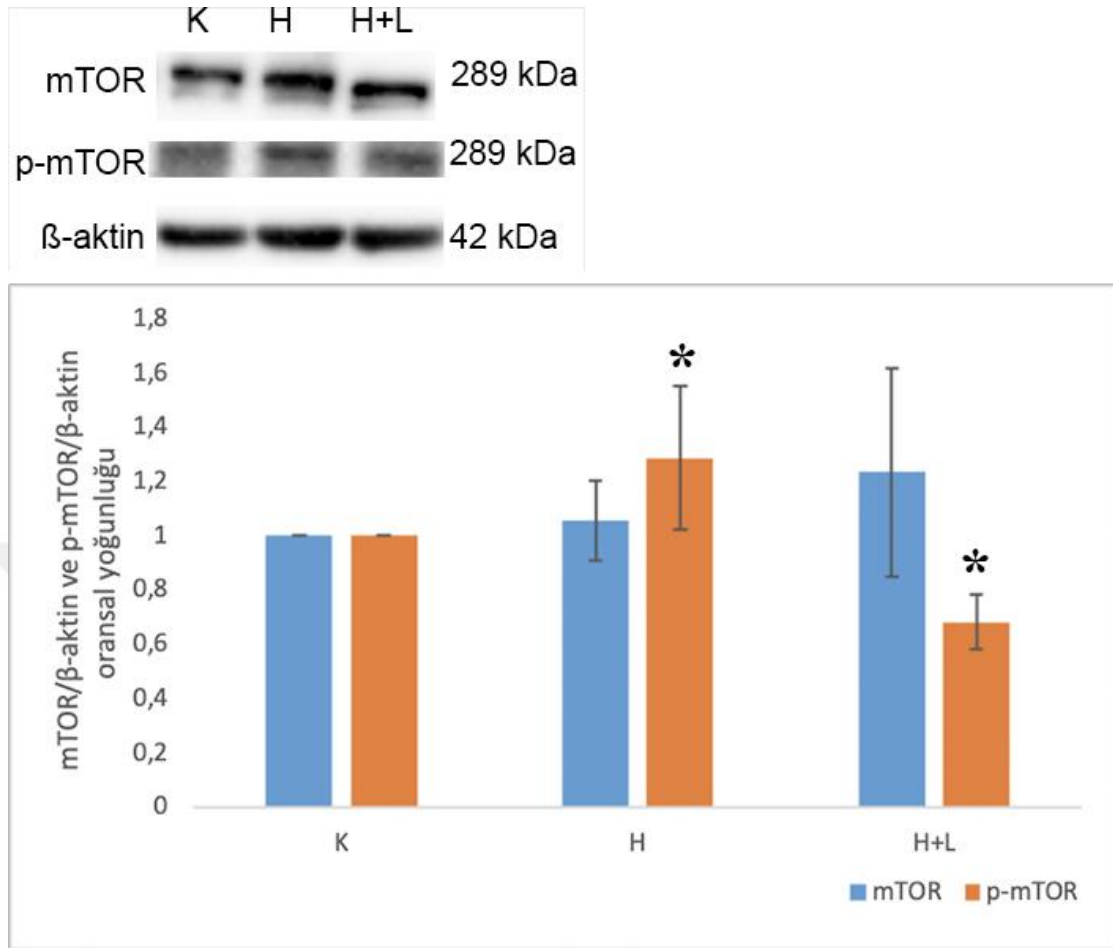
Şekil 4.5.16. Kornu ammonis'deki CA3 bölgesinin p-ULK1 immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Strepavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X; M-O, 20X; P-S, 100X.



Şekil 4.5.17. Hipokampusun dentat girus bölgesinin p-ULK1 immünlokalizasyonu. PL: Pleomorfik katman, GL: Granüler katman, ML: Moleküler katman. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X.

4.5.3. mTOR ve p-mTOR ekspresyonu ve immünlökalizasyonu

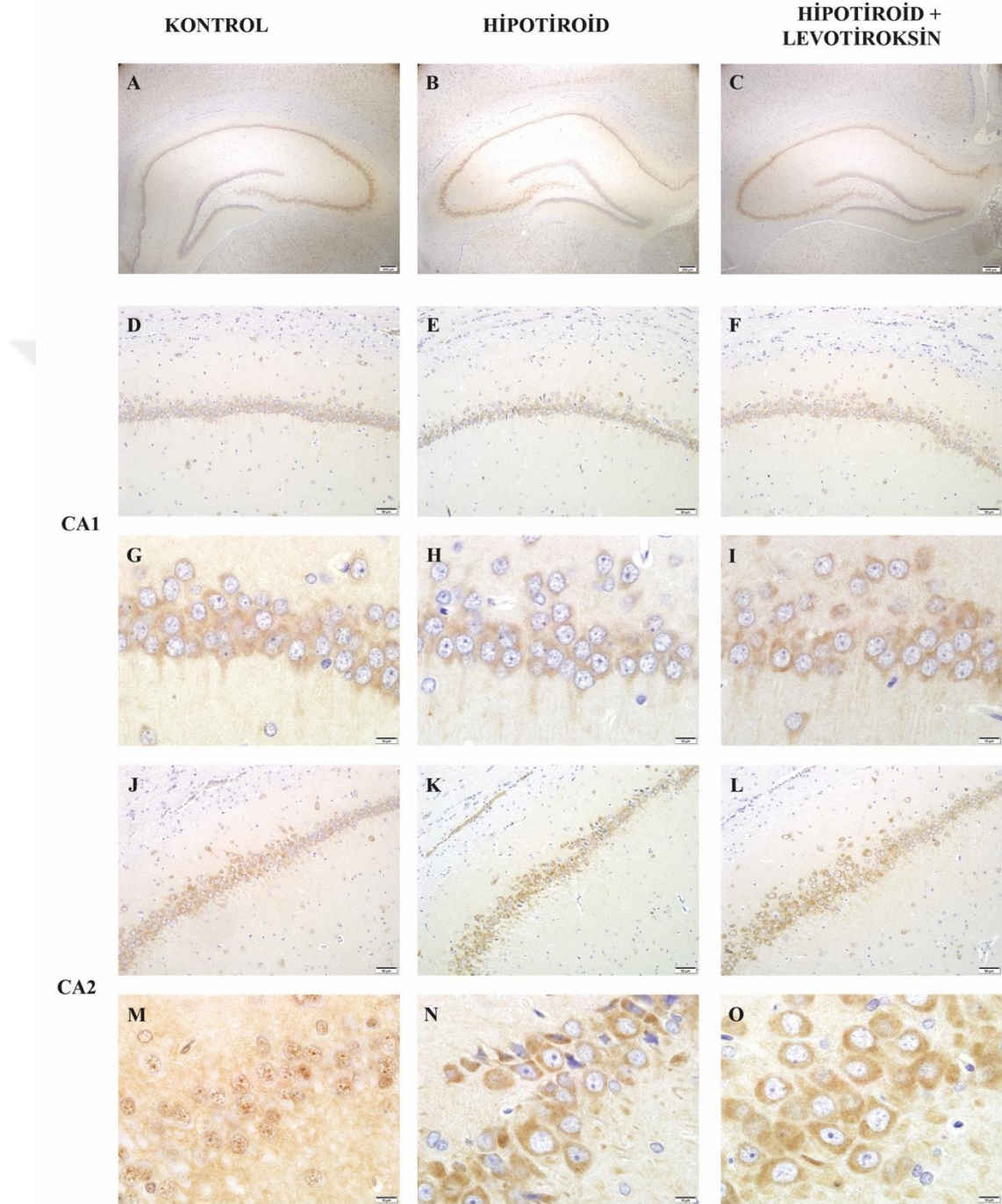
Her üç gruptaki sıçanların hipokampuslerinde mTOR ve p-mTOR-Se2448'in ekspresyon düzeyleri ve immünlökalizasyonlarındaki olası değişikliklerin varlığı western blot, immünohistokimya ve immünofloresan analiz yöntemleriyle incelendi. Hipotiroidili grupta p-mTOR-Se2448'un ekspresyon düzeyi diğer gruplara göre daha yüksek iken mTOR düzeyi kontrol grubu sıçanlarınkine yakın bulundu. Levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili sıçanların hipokampus örneklerinde mTOR ekspresyon düzeyleri en yüksek, p-mTOR-Se2448 düzeyleri ise en düşük olarak tespit edildi. mTOR ve p-mTOR-Se2448'in ekspresyon düzeyleri açısından gruplar arası farklılıklar değerlendirildiğinde ise mTOR ekspresyonu açısından gruplar arasındaki farklılık önemsiz iken, p-mTOR-Se2448 ekspresyonunun hipotiroidili ve Levotiroksin ile tedavi edilmiş gruplar arasında anlamlı farklılık bulunduğu belirlendi ($P < 0.05$). Ortalama p-mTOR-Se2448 miktarının toplam mTOR miktarına oranı gruplara göre kıyaslandığında, hipotiroidili sıçanların hipokampuslerinde diğer gruplardakinden yüksek fakat önemsiz bir ($P > 0.05$) farklılığın bulunduğu gözlemlendi.



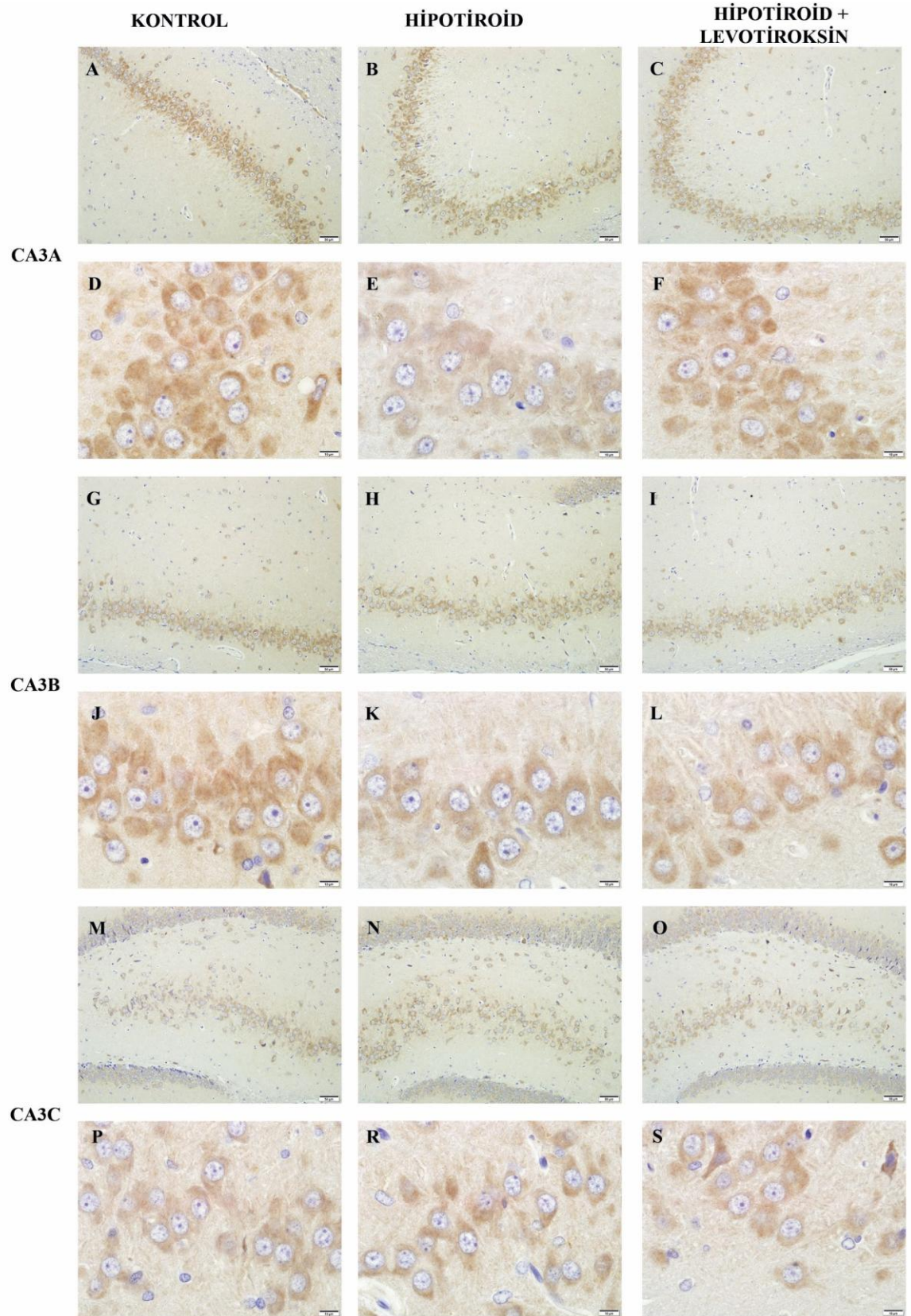
Şekil 4.5.18. Kontrol, hipotiroidili ve levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili sıçanların mTOR ve p-mTOR-Se2448 ekspresyonları. Western blot analiz yöntemi. *: Gruplar arası farklılıkların %95 oranında ($P<0.05$) önemli olduğunu göstermektedir.

İmmünohistokimyasal analizde mTOR'un hipokampusün kornu ammonis bölgesindeki piramidal hücrelerin sitoplazmalarında orta yoğunlukta eksprese olduğu, dentat girustaki hücrelerde ise daha zayıf ekspresyon sergilediği gözlemlendi (Şekil 4.5.19 – 4.5.22). mTOR'da intranükleer ve nöropilde immünreaksiyon görülmezken p-mTOR-Se2448'in ise nükleer immünreaksiyon gösterdiği belirlendi (Şekil 4.5.23 – 4.5.25). Bu reaksiyonun Levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili sıçanların özellikle CA3 bölgesinde diğer gruplardakine göre daha zayıf olduğu belirlendi.

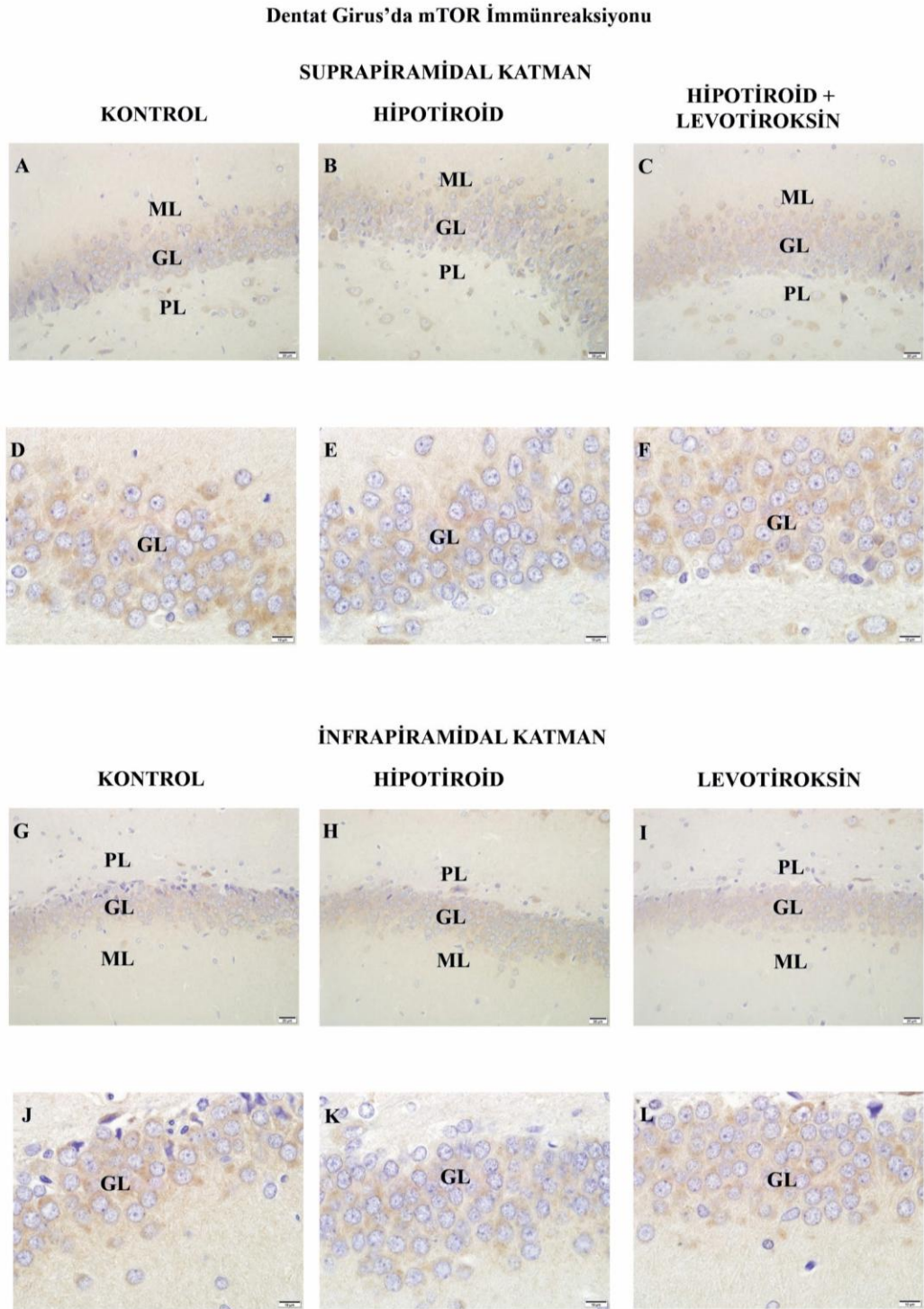
HİPOKAMPÜS'DE mTOR İMMÜNREAKSİYONU



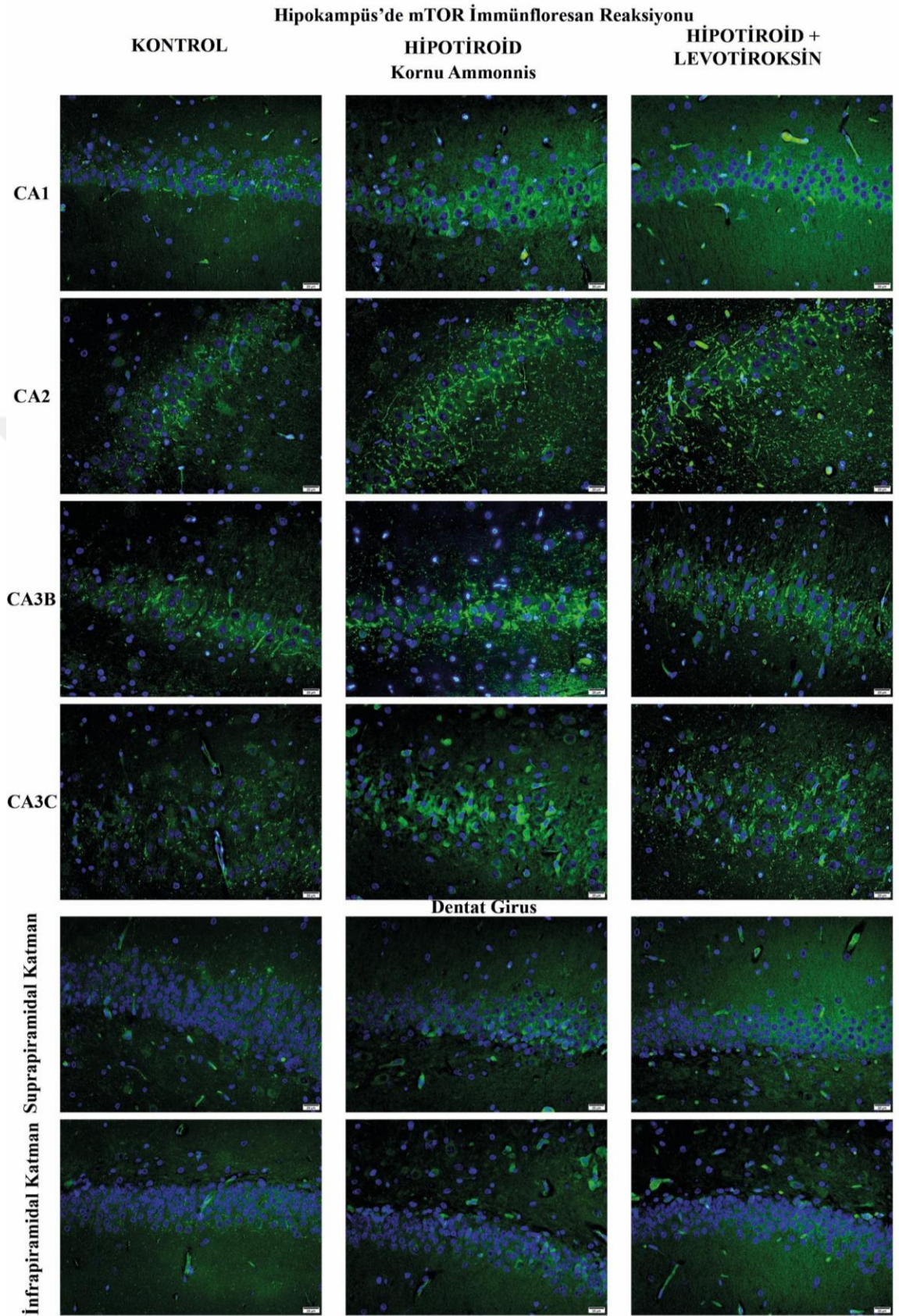
Şekil 4.5.19. Kornu ammonis'deki CA1 ve CA2 bölgesinde mTOR immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 4X; D-F, 20X; G-I, 100X; J-L, 20X; M-O, 100X.



Şekil 4.5.20. Kornu ammonis'deki CA3 bölgesinde mTOR immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X; M-O, 20X; P-S, 100X.

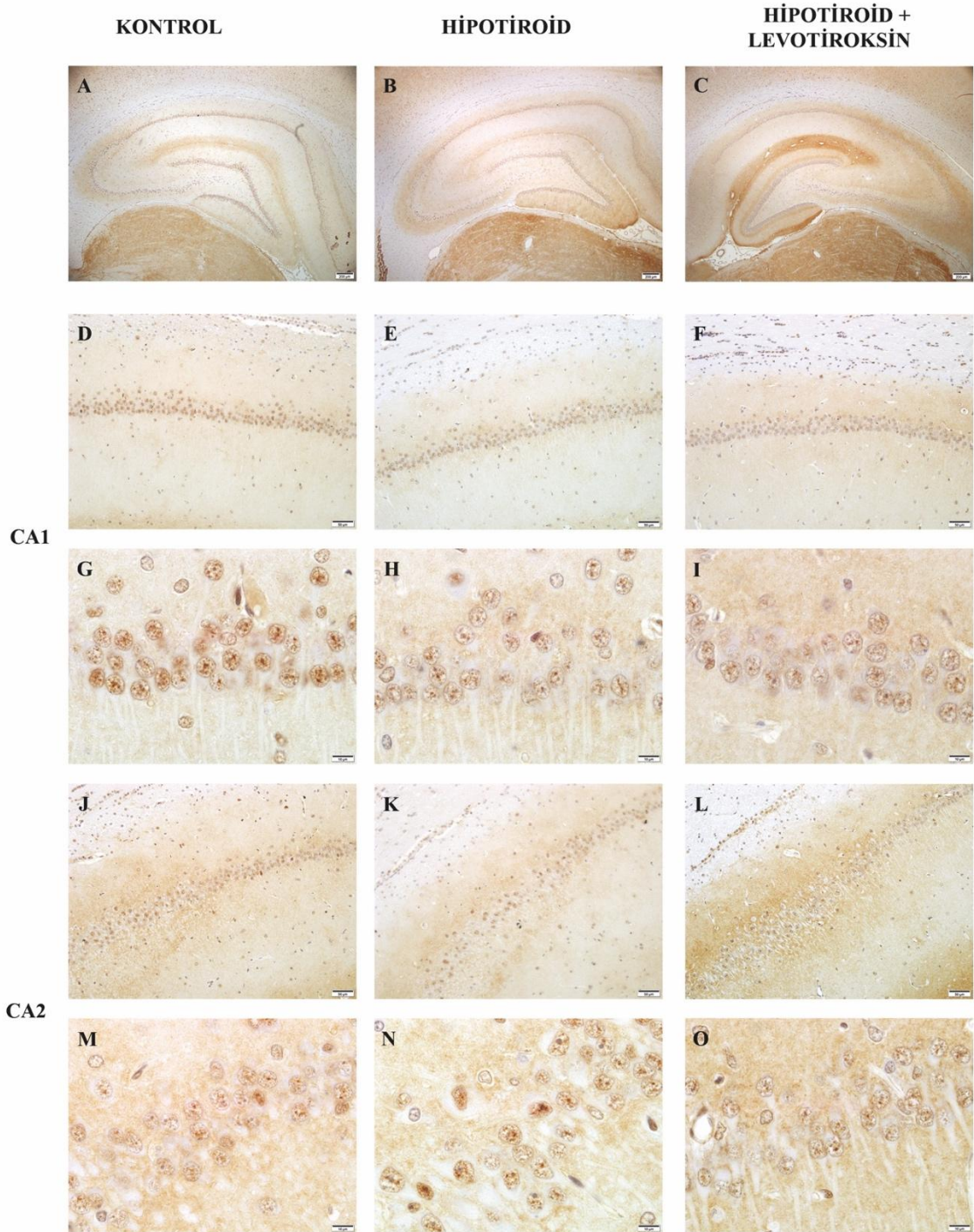


Şekil 4.5.21. Hipokampusun dentat girus bölgesinin mTOR immünlokalizasyonu. PL: Pleomorfik katman, GL: Granüler katman, ML: Moleküler katman. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X.

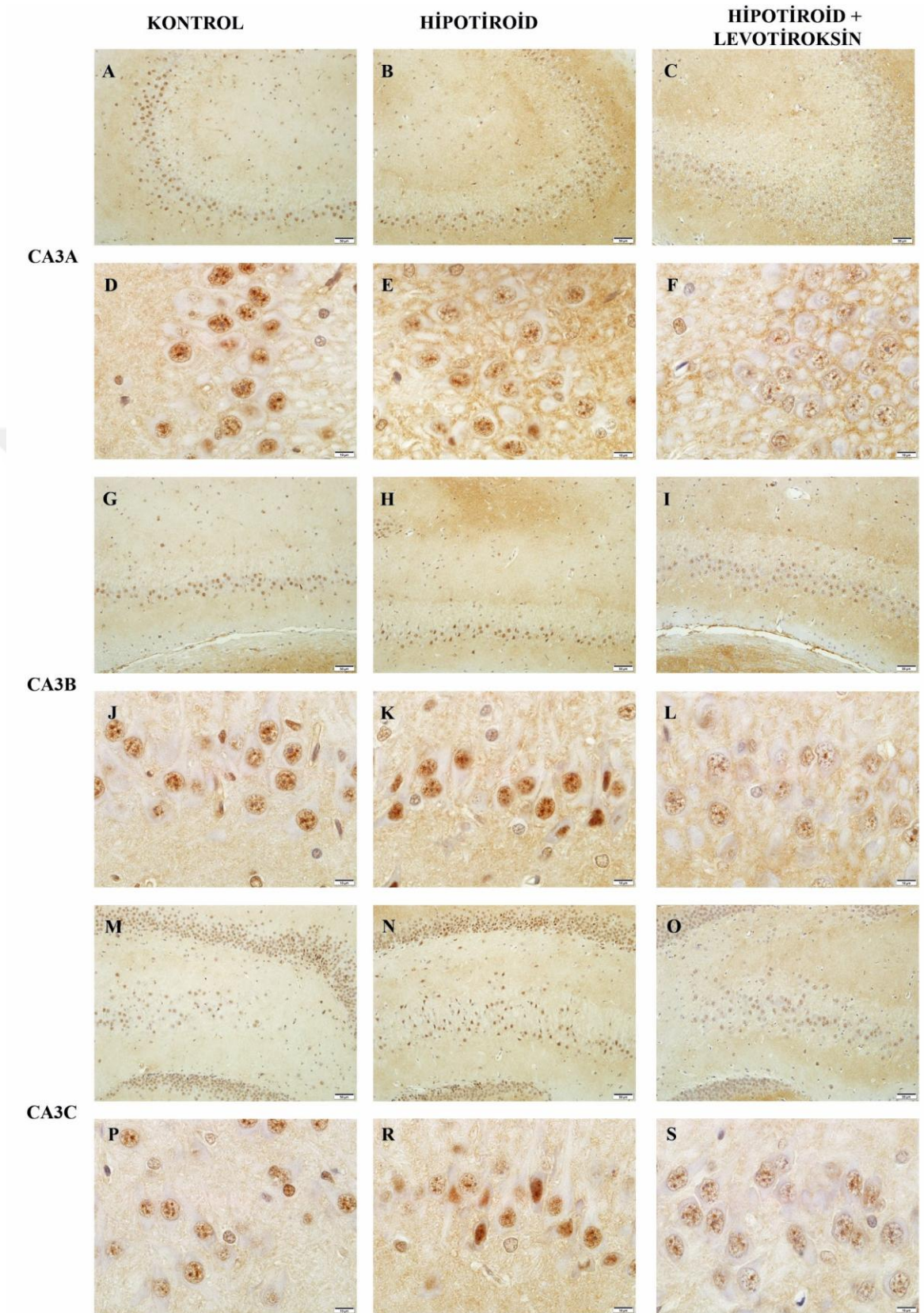


Şekil 4.5.22. Hipokampusün kornu ammonis ve dentat girusunda mTOR immünreaksiyoun. İmmü floresan yöntemi. Objektif büyütmesi 40X

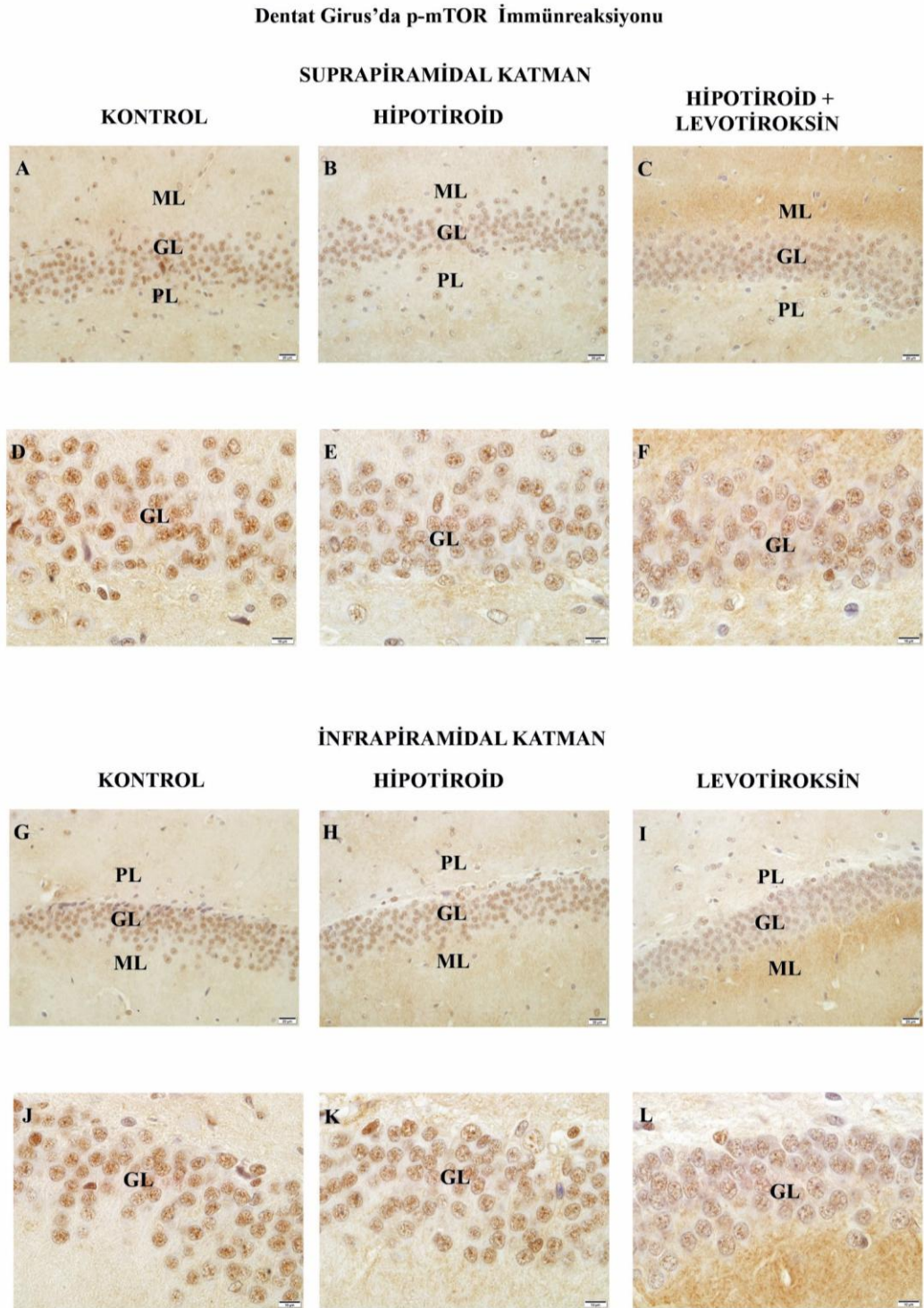
HİPOKAMPÜS'DE p-mTOR İMMÜNREAKSİYONU



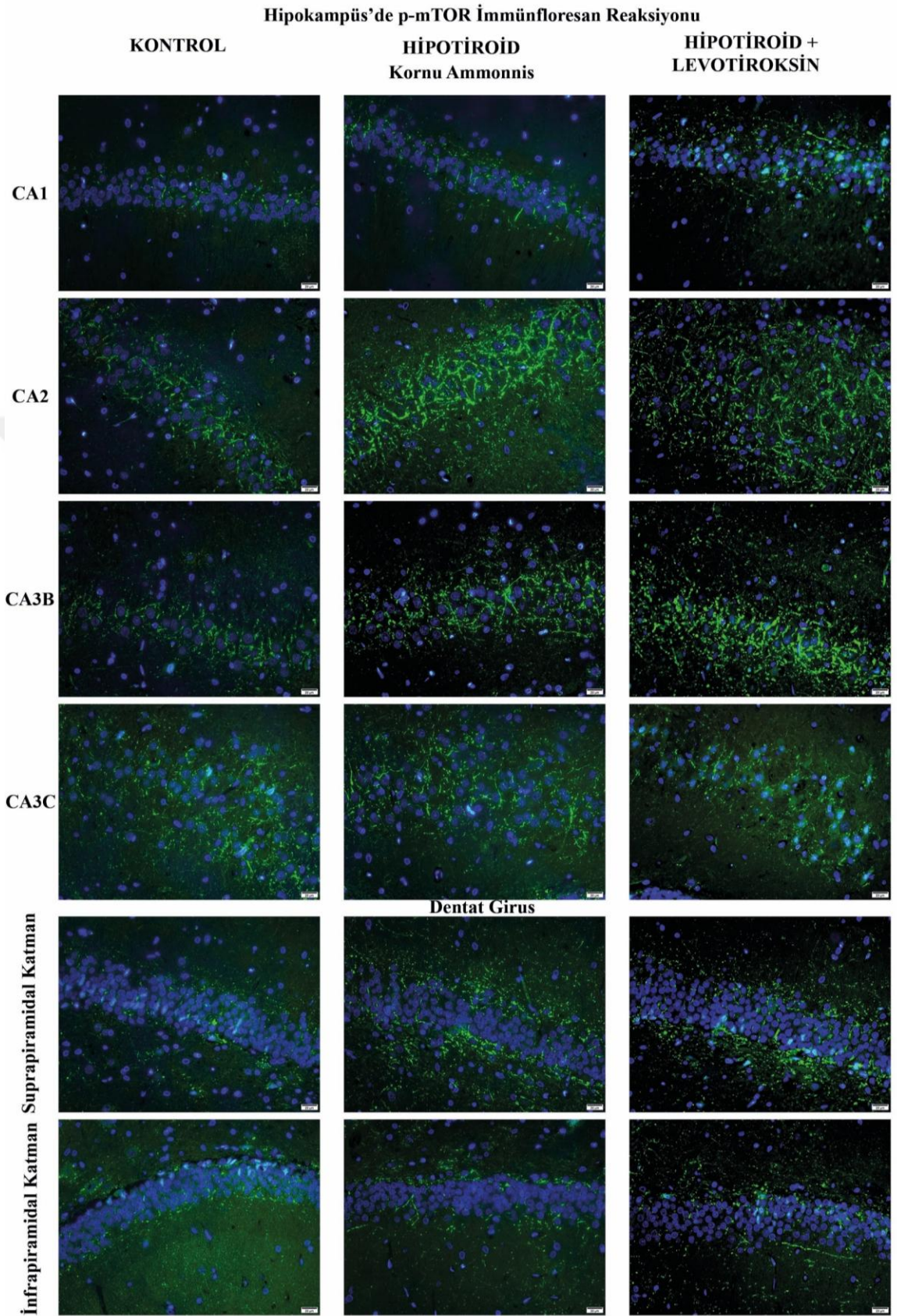
Şekil 4.5.23. Kornu ammonis'deki CA1 ve CA2 bölgesinin p-mTOR immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 4X; D-F, 20X; G-I, 100X; J-L, 20X; M-O, 100X.



Şekil 4.5.24. Kornu ammonis'deki CA3 bölgesinin p-mTOR immünlökalisasyonu. CA: Kornu ammonis. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X; M-O, 20X; P-S, 100X.



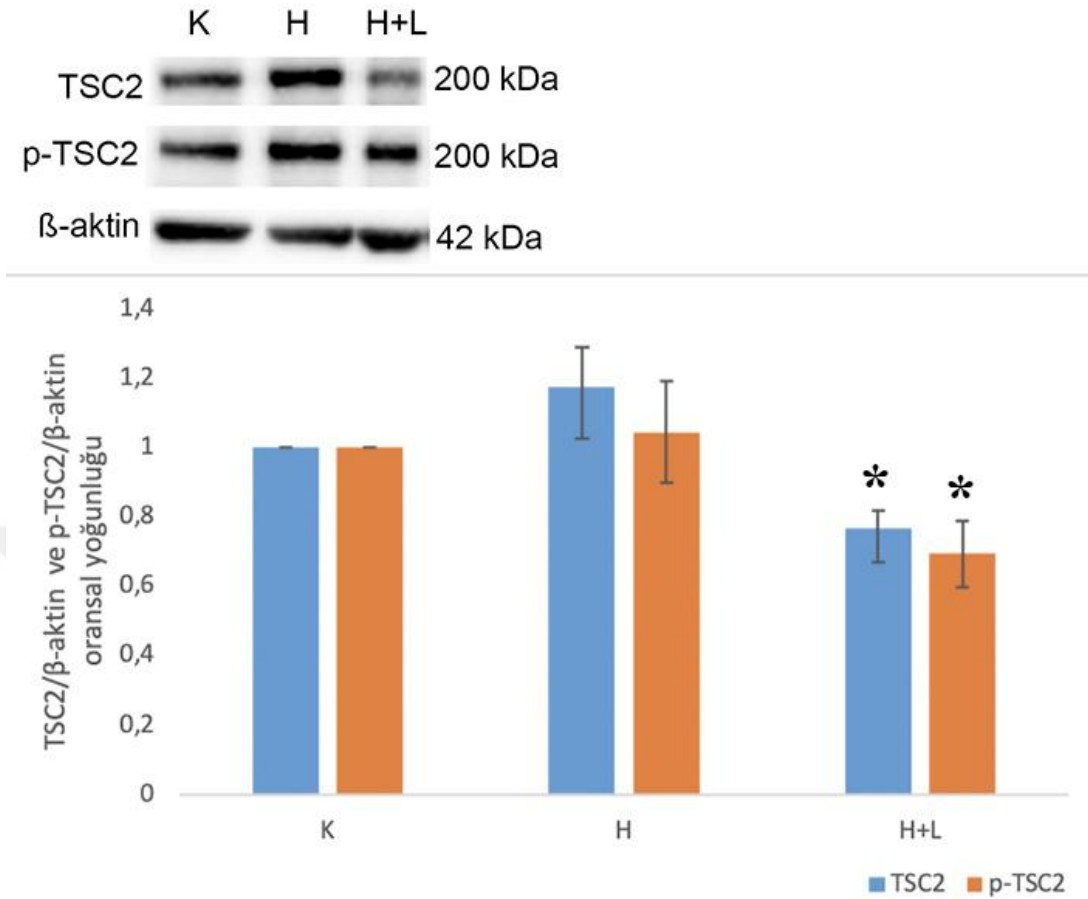
Şekil 4.5.25. Hipokampusun dentat girus bölgesinin p-mTOR immünlokalizasyonu. PL: Pleomorfik katman, GL: Granüler katman, ML: Moleküler katman. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X.



Şekil 4.5.26. Hipokampusün kornu ammonis ve dentat girusunda p-mTOR immünreaksiyon. İmmü floresan yöntemi. Objektif büyümesi 40X.

4.5.4. TSC2 ve p-TSC2 immünlokalizasyonu ve ekspresyonu

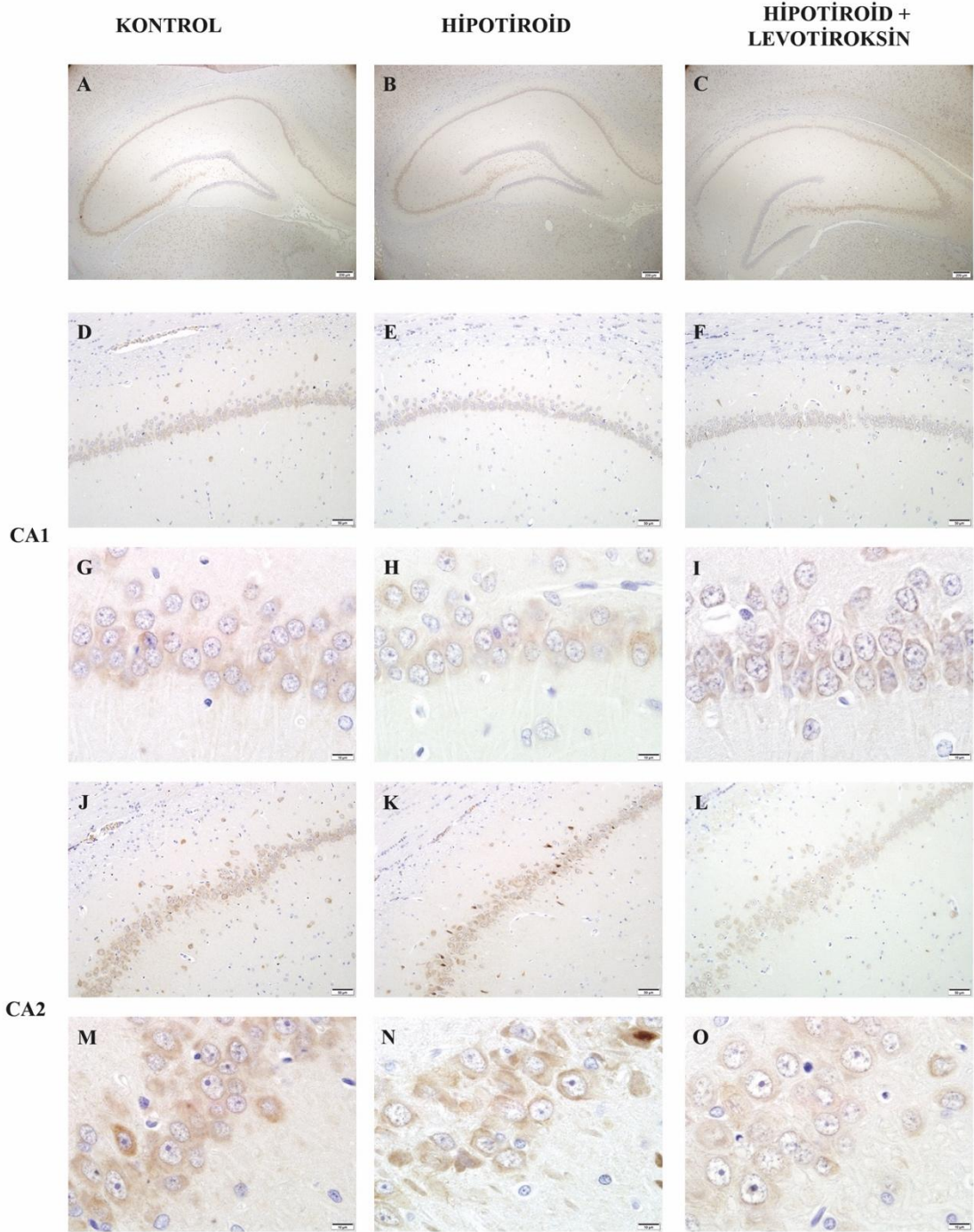
Kontrol, hipotiroidili ve Levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotroidili gruptaki sıçanlardan alınan hipokampüs doku örneklerinde TSC2 ve bunun fosforile edilmiş formu p-TSC2-Thr1462'nin ekspresyon düzeyindeki olası değişiklikler western blot, immünohistokimya ve immünfloresan analiz yöntemleriyle incelendi. Western blot analiz sonuçları TSC2 ve p-TSC2-Thr1462'nin ekspresyon düzeylerinin Levotiroksin ile tedavi edilmiş gruptaki hayvanların hipokampüslerinde en düşük olduğunu, hipotiroidili grupta ise diğer grup değerlerinden daha yüksek olduğunu gösterdi. TSC2 ve p-TSC2-Thr1462 ekspresyonları açısından kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki farklılıklar önemsiz bulunurken ($P>0.05$), hipotroidili ve Levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotroidili grup arasındaki farklılıkların istatistiksel önem taşıdığı tespit edildi ($P<0.05$). Ortalama p-TSC2-Thr1462 miktarının toplam TSC2 miktarına oranı gruplara göre kıyaslandığında, hipotiroidili sıçanların hipokampüslerinde bu oranın diğer gruplardakinden daha düşük olduğu ve gruplar arasındaki farklılıkların önemsiz olduğu gözlendi ($P>0.05$).



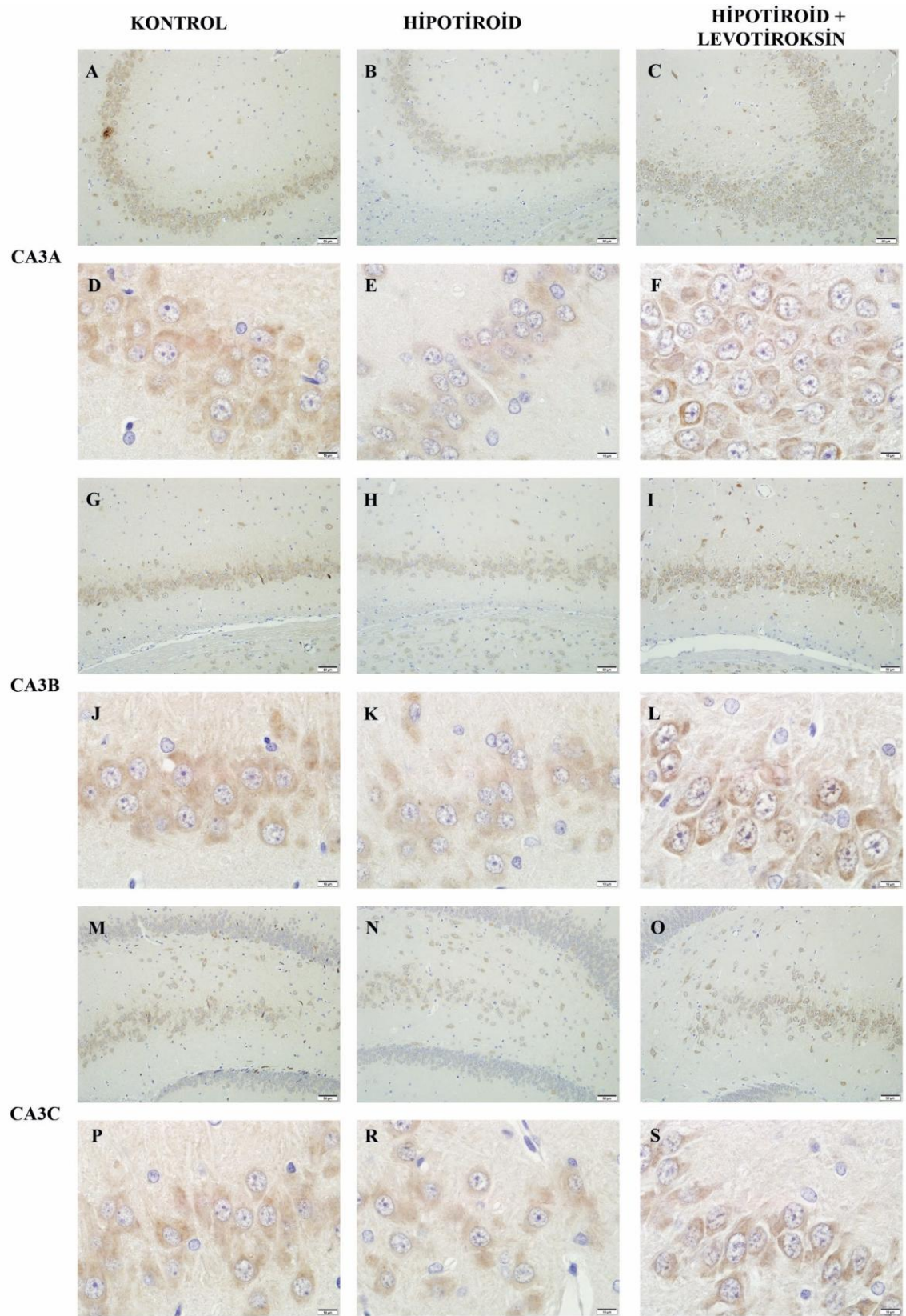
Şekil 4.5.27. Kontrol, hipotiroidili ve levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili sıçanların TSC2 ve p-TSC2 ekspresyonları. Western blot analiz yöntemi. *: Gruplar arası farklılıkların %95 oranında ($P<0.05$) önemli olduğunu göstermektedir.

İmmunohistokimyasal boyamalar incelendiğinde TSC2'nin hipokampüsün kornu ammonis bölgesindeki piramidal hücrelerin sitoplazmalarında orta yoğunlukta eksprese olduğu, dentat girustaki hücrelerde ise daha zayıf ekspresyon sergilediği gözlemlendi. Boyanma yoğunluklarının gruplar arasında çok farklılık göstermediği tespit edildi (Şekil 4.5.28 - 4.5.30). p-TSC2 için, sitoplazmik boyanmanın TSC2'ye göre daha yoğun olduğu ve dentat girus bölgesinde de p-TSC2'nin eksprese olduğu gözlemlendi. P-TSC2'nin kornu ammonis ve dentat girus nöronlarının sitoplazmalarında granüler immün boyanma sergilediği görüldü (Şekil 4.5.31 - 4.5.33).

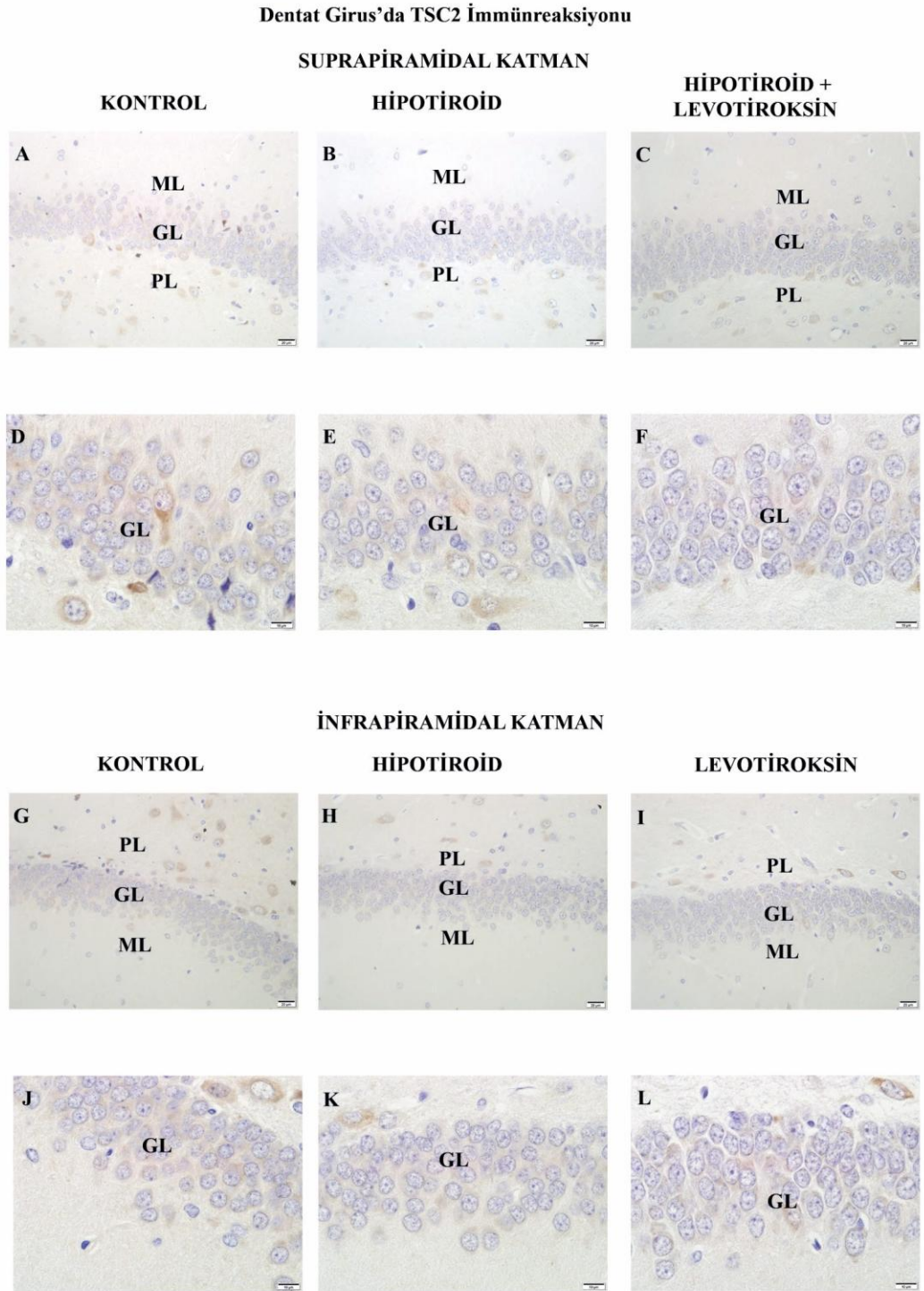
HİPOKAMPÜS'DE TSC2 İMMÜNREAKSİYONU



Şekil 4.5.28. Korne ammonis'deki CA1 ve CA2 bölgesinin TSC2 immünlokalizasyonu. CA: Korne ammonis. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 4X; D-F, 20X; G-I, 100X; J-L, 20X; M-O, 100X.

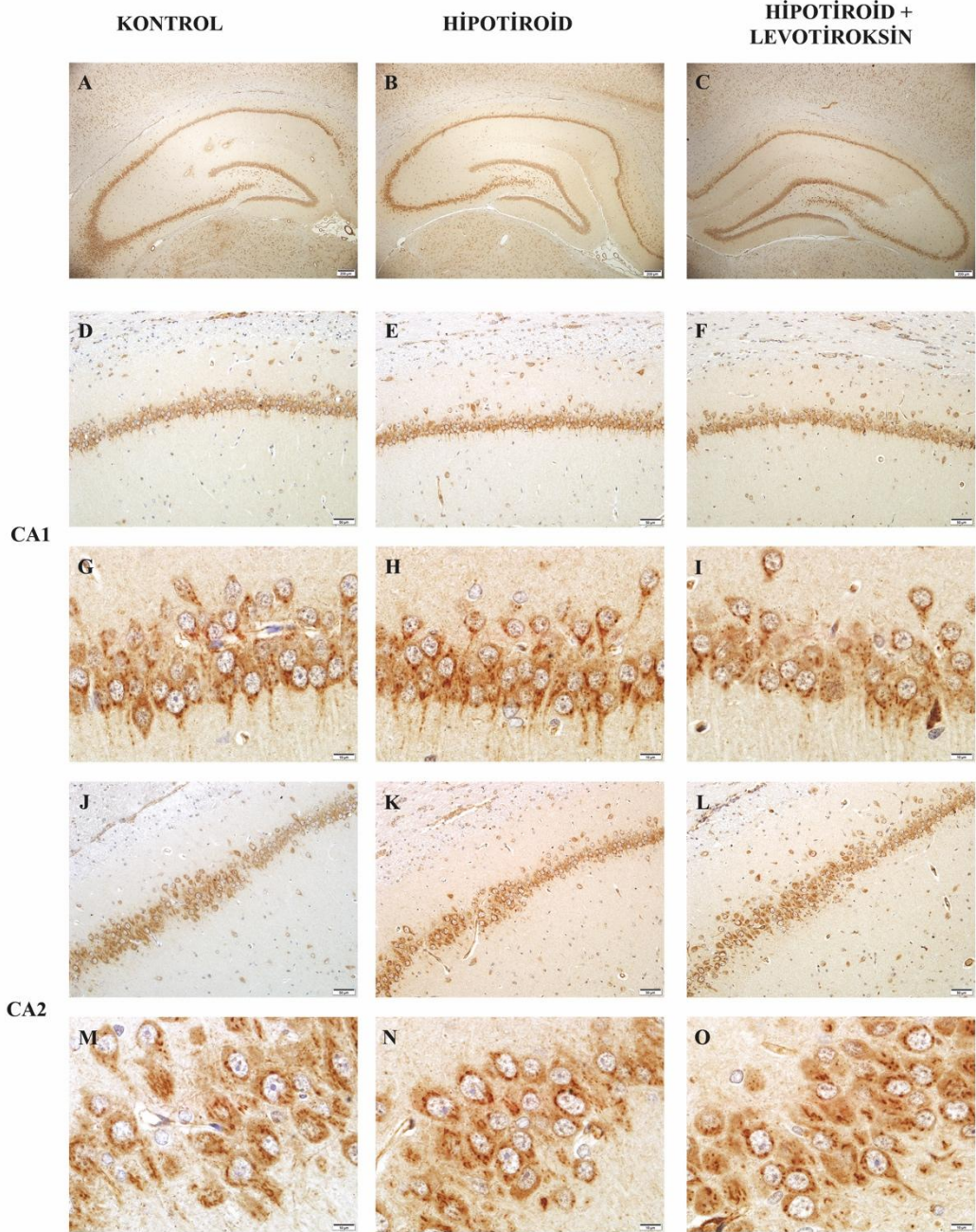


Şekil 4.5.29. Kornu ammonis'deki CA3 bölgesinin TSC2 immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X; M-O, 20X; P-S, 100X.

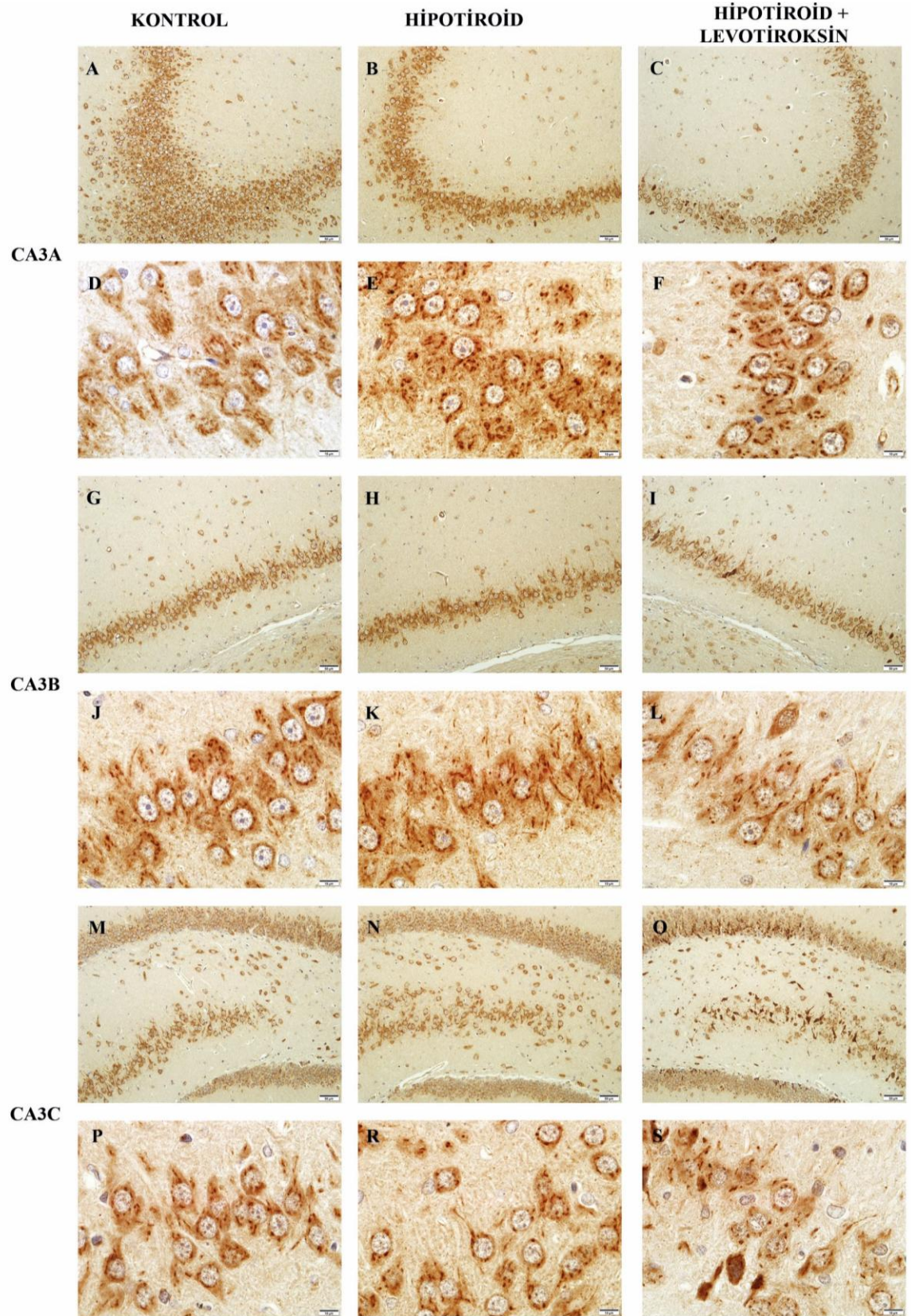


Şekil 4.5.30. Hipokampusun dentat girus bölgesinin TSC2 immünlokalizasyonu. PL: Pleomorfik katman, GL: Granüler katman, ML: Moleküler katman. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X.

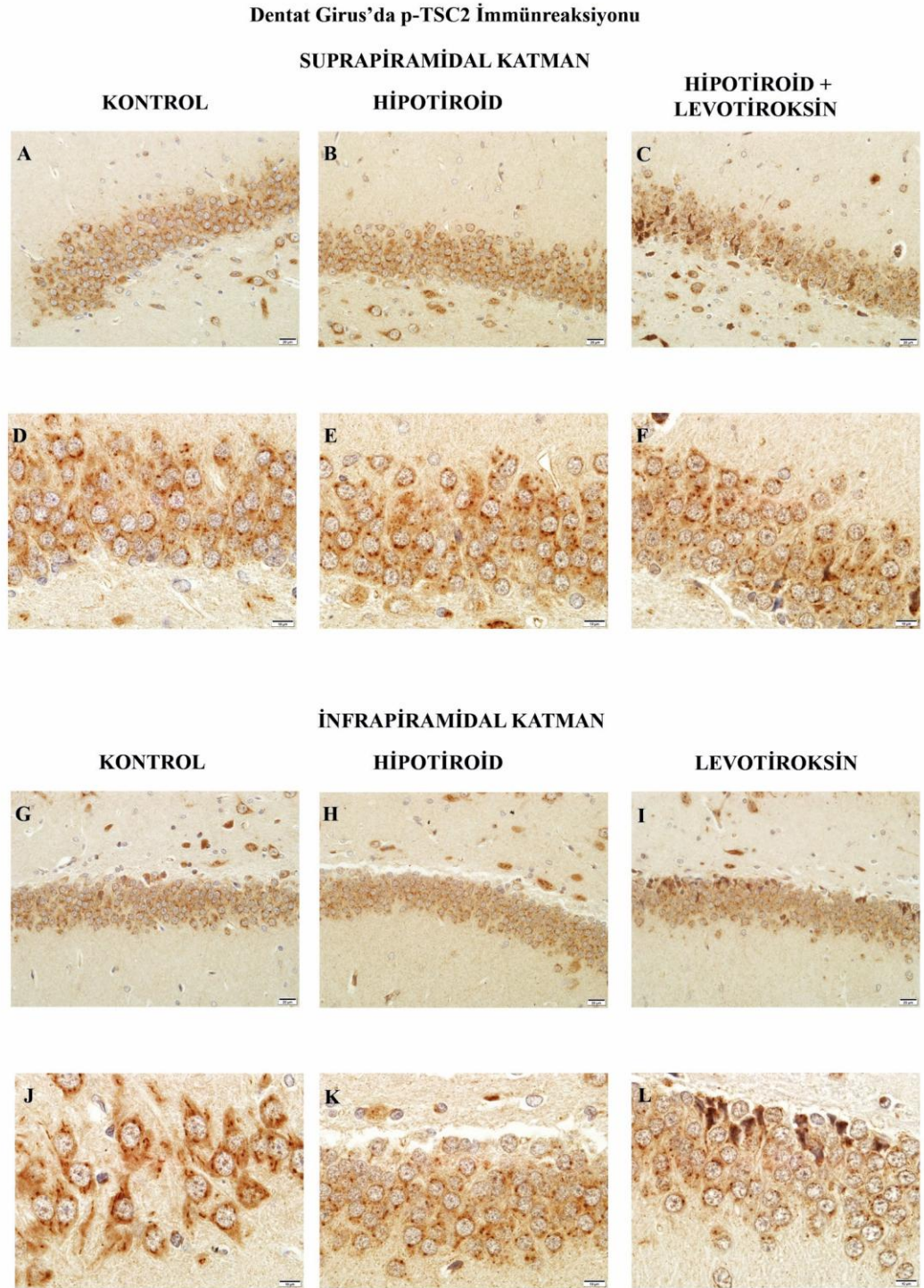
HİPOKAMPÜS'DE p-TSC2 İMMÜNREAKSİYONU



Şekil 4.5.31. Kornu ammonis'deki CA1 ve CA2 bölgesinin p-TSC2 immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 4X; D-F, 20X; G-I, 100X; J-L, 20X; M-O, 100X.



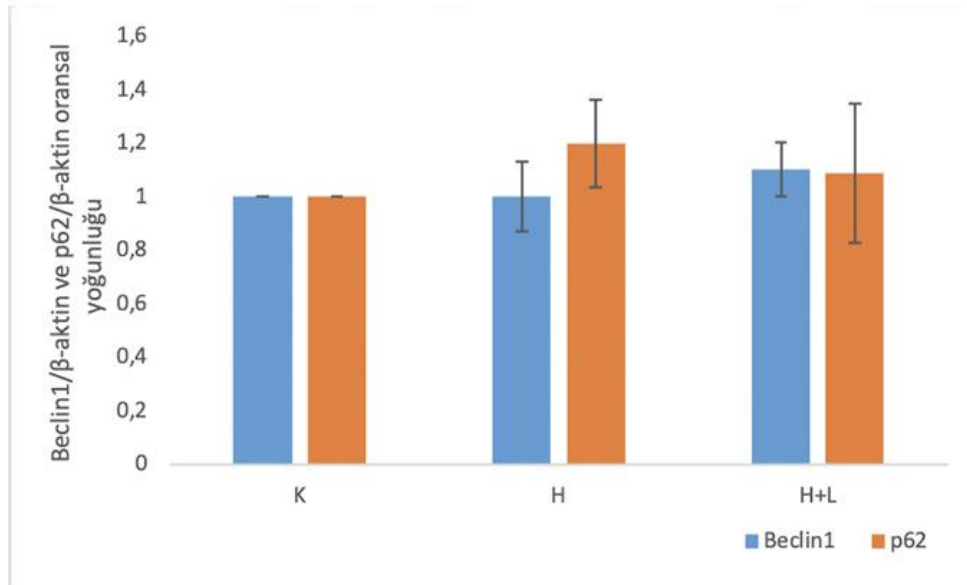
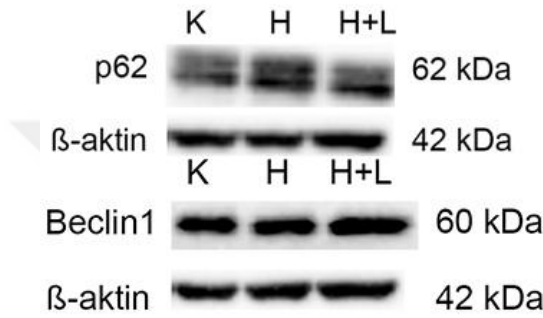
Şekil 4.5.32. Kornu ammonis'deki CA3 bölgesinin p-TSC2 immünlökalisasyonu. CA: Kornu ammonis. Strepavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X; M-O, 20X; P-S, 100X.



Şekil 4.5.33. Hipokampusun dentat girus bölgesinin TSC2 immünlokalizasyonu. PL: Pleomorfik katman, GL: Granüler katman, ML: Moleküler katman. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X.

4.5.5. Beclin 1 ve p-62 ekspresyonu ve immünlokalizasyonu

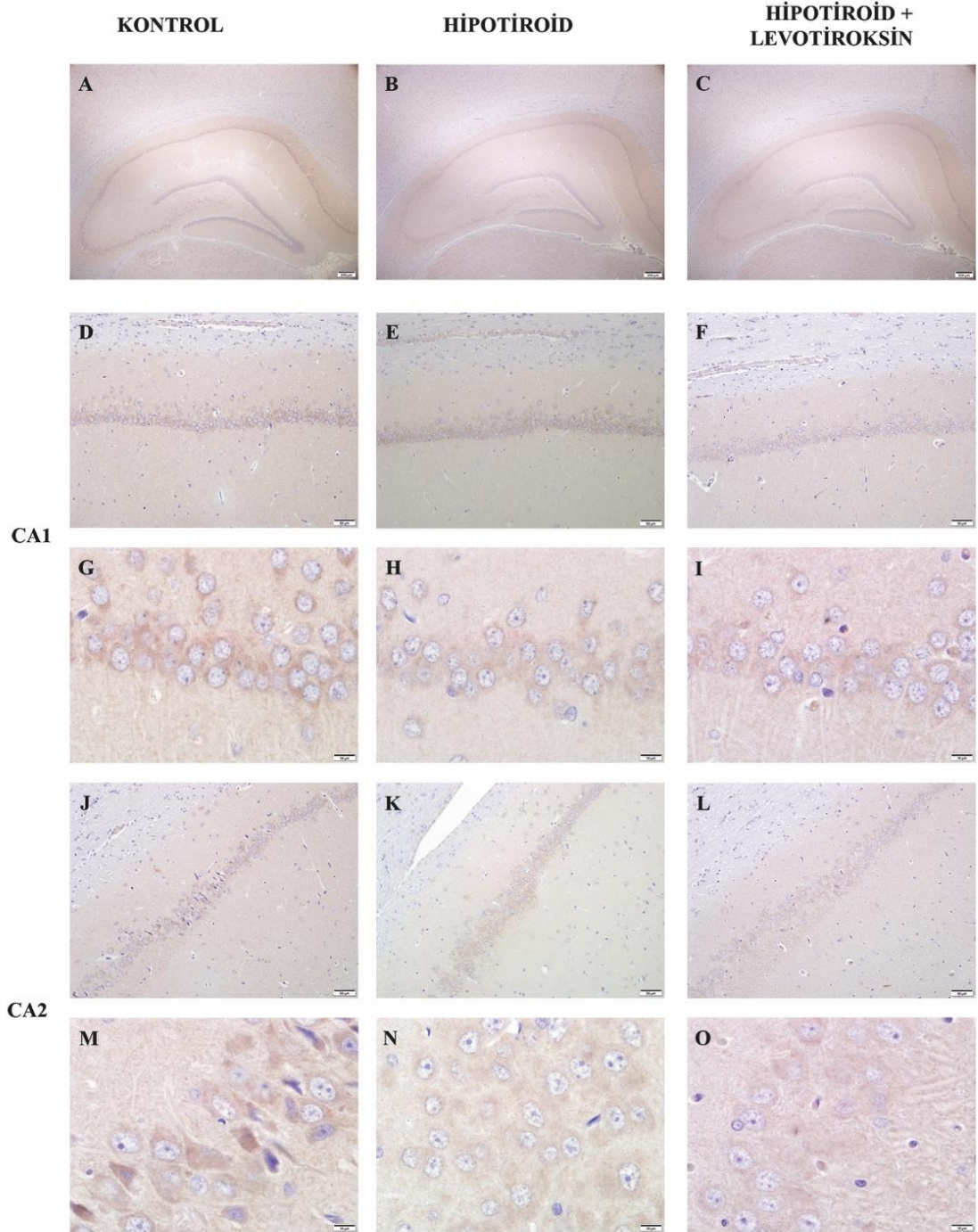
Otofaji düzenleyici proteinlerden Beclin 1 ve p-62'nin ekspresyon düzeylerinde hipotiroidiye bağlı değişiklik olup olmadığını belirlemek için western blot analizi yapıldı. Hipotiroidili gruptaki sıçanların hipokampuslerinde p62'nin, Levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili gruptaki sıçanların hipokampuslerinde ise Beclin 1'in kontrole göre ve bir diğer gruba göre daha yüksek olduğu tespit edildi. Bununla birlikte gruplararası farklılıklar anlamlı bulunmadı ($P>0.05$).



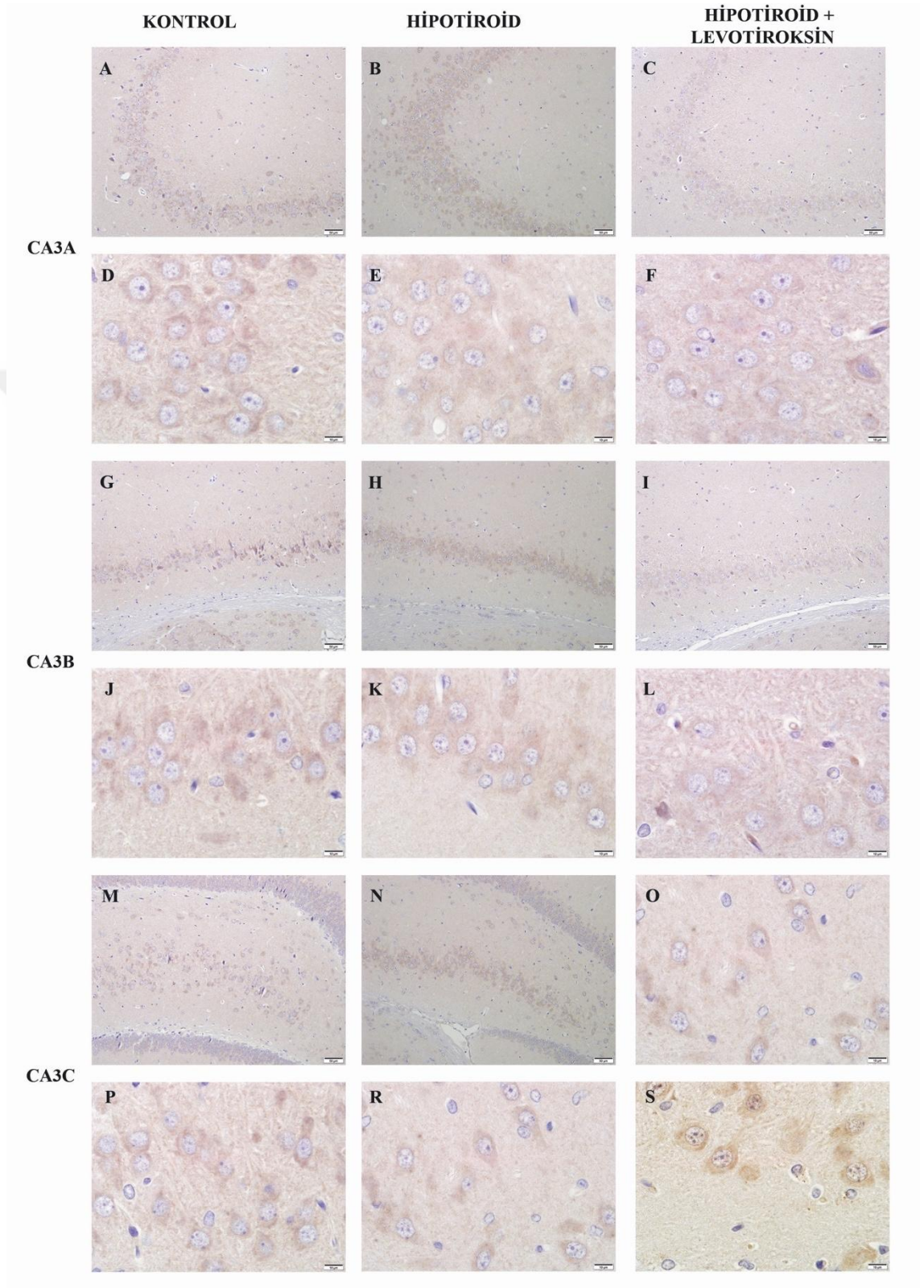
Şekil 4.5.34. Kontrol, hipotiroidili ve levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili sıçanların Beclin1 ve p62 ekspresyonları. Western blot analiz yöntemi.

İmmünohistokimyasal analizde Beclin1 ve p62'nin nöronlarda sitoplazmada lokalize olduğu belirlendi. Her iki antikor için immün boyanmalarda belirgin farklılıklar gözlenmedi.

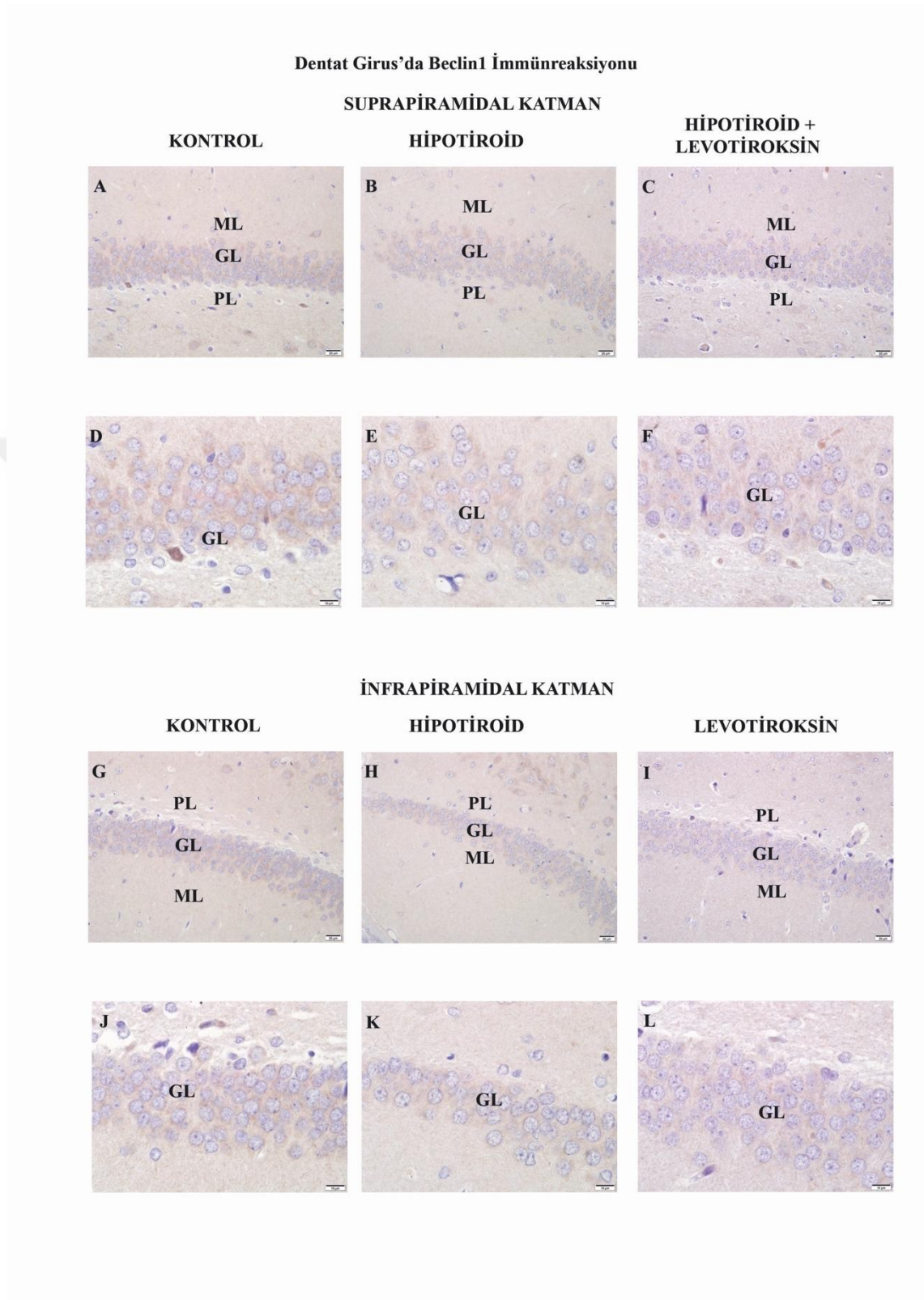
HİPOKAMPÜS'DE BECLİN1 İMMÜNREAKSİYONU



Şekil 4.5.35. Kornu ammonis'deki CA1 ve CA2 bölgesinin Beclin1 immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 4X; D-F, 20X; G-I, 100X; J-L, 20X; M-O, 100X.

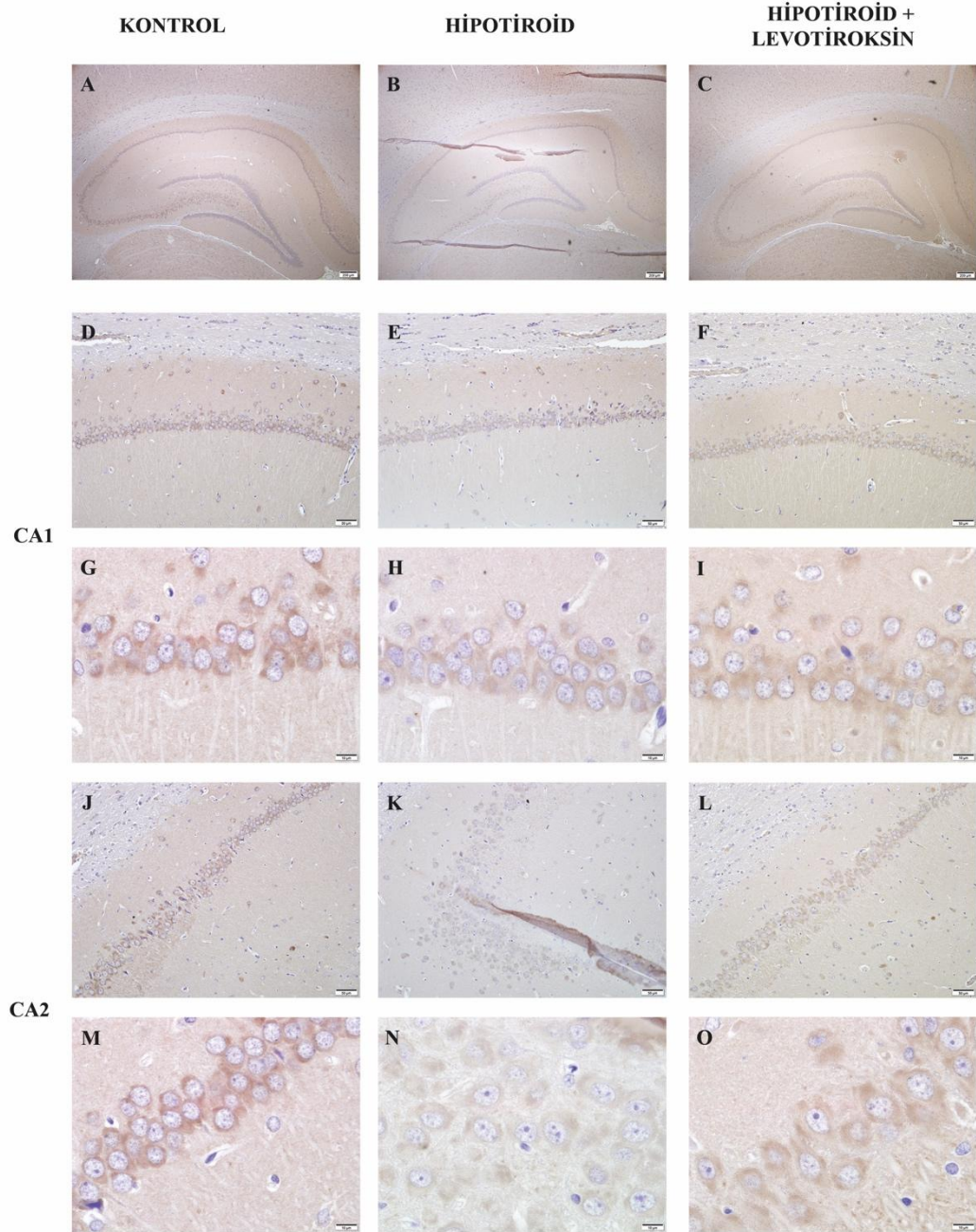


Şekil 4.5.36. Kornu ammonis'deki CA3 bölgesinin Beclin1 immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X; M-O, 20X; P-S, 100X.

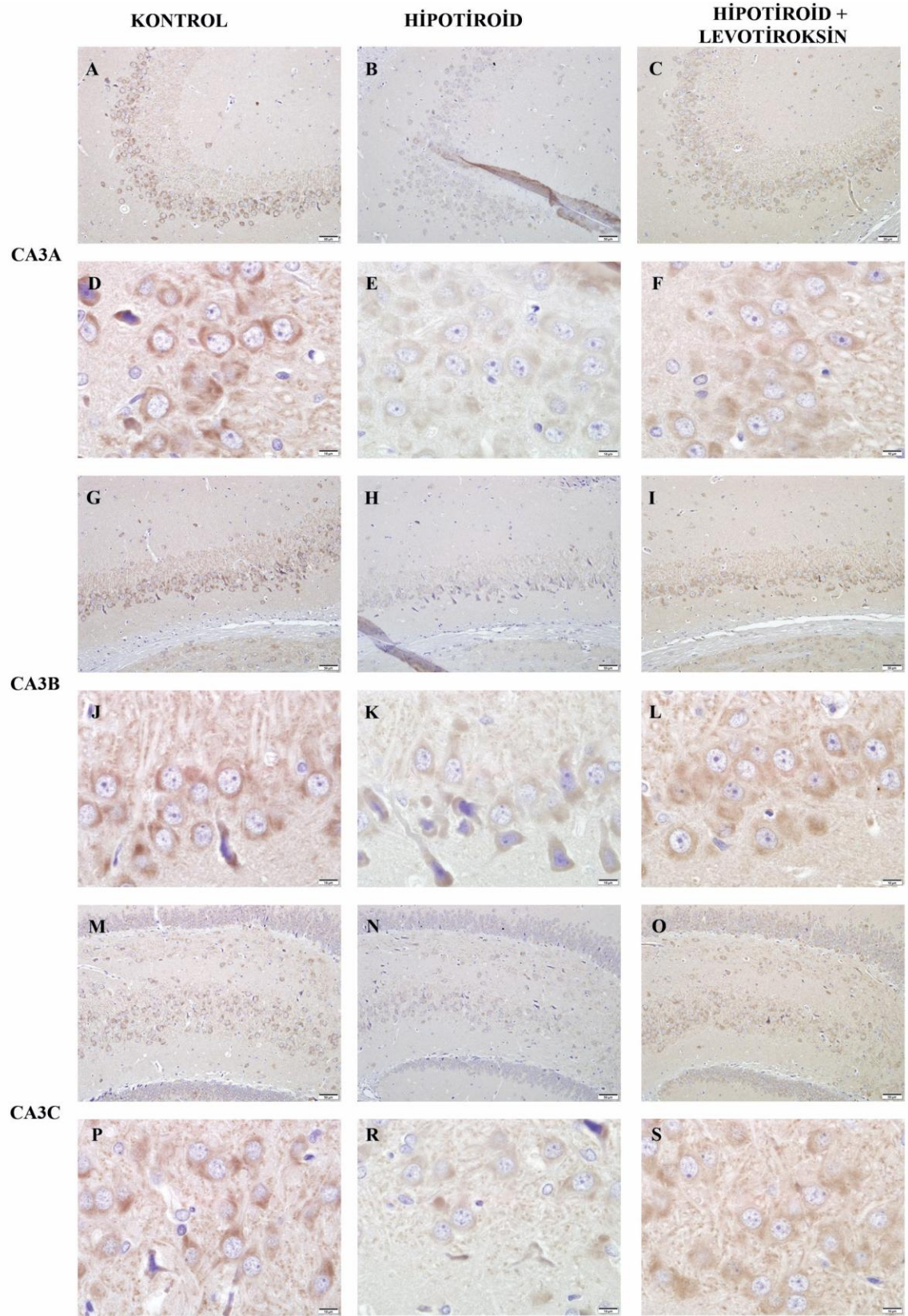


Şekil 4.5.37. Hipokampusun dentat girus bölgesinin Beclin1 immünlokalizasyonu. PL: Pleomorfik katman, GL: Granüler katman, ML: Moleküler katman. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X.

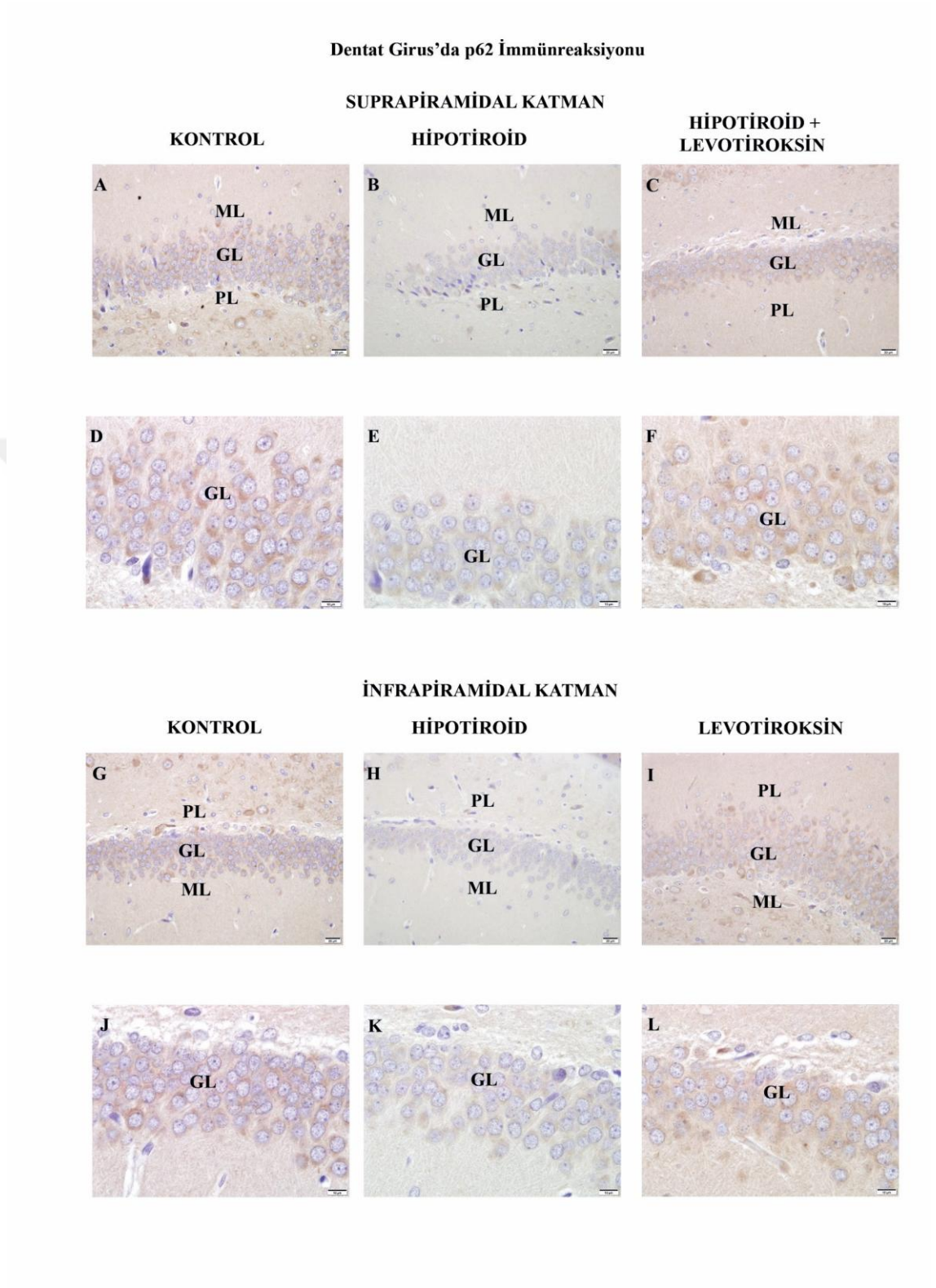
HİPOKAMPÜS'DE P62 İMMÜNREAKSİYONU



Şekil 4.5.38. Kornu ammonis'deki CA1 ve CA2 bölgesinin p62 immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 4X; D-F, 20X; G-I, 100X; J-L, 20X; M-O, 100X.



Şekil 4.5.39. Kornu ammonis'deki CA1 ve CA2 bölgesinin p62 immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X; M-O, 20X; P-S, 100X.

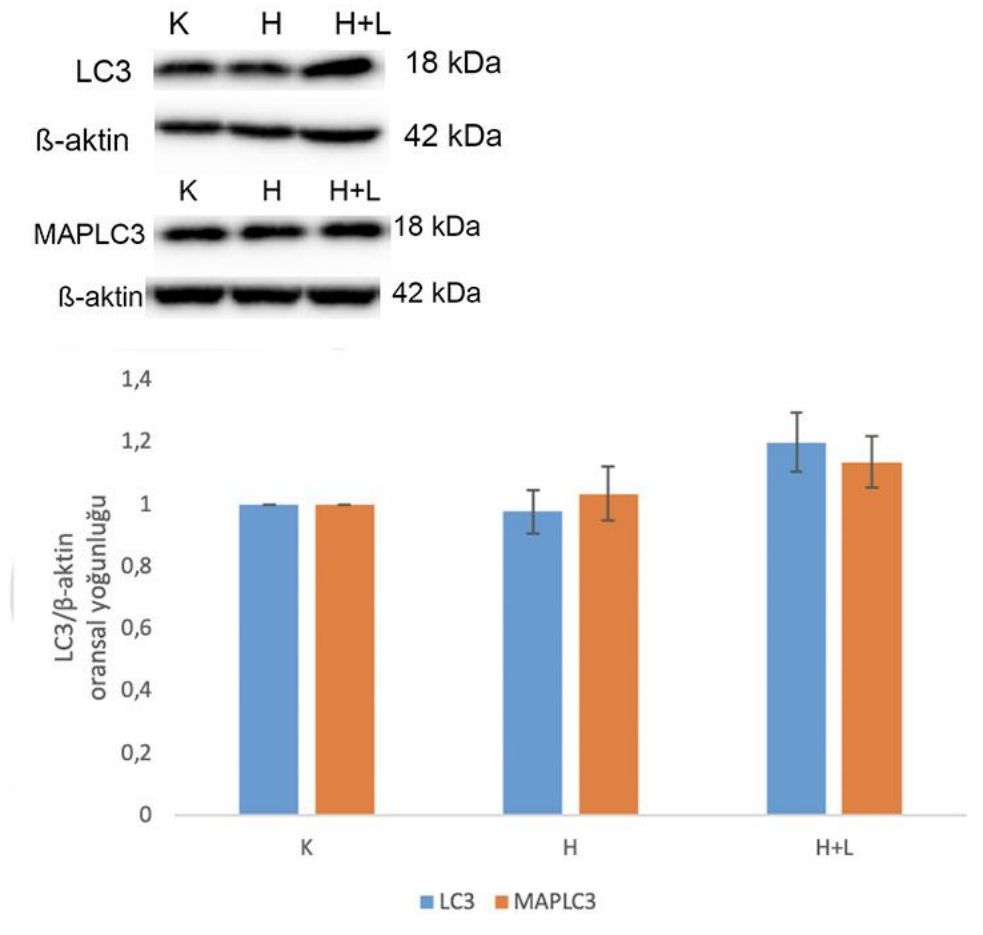


Şekil 4.5.40. Hipkampüsün dentat girus bölgesinin p62 immünlokalizasyonu. PL: Pleomorfik katman, GL: Granüler katman, ML: Moleküler katman. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X.

4.5.6. Otofazom belirteci MAPLC3'ün immünlökalisasyonu ve ekspresyonu

Kontrol, hipotiroidili ve Levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili gruplardaki sıçanlardan alınan hipokampus doku örneklerinde otofagozom şekillenmesindeki olası değişiklikler western blot, immünohistokimya ve immünfloresan analiz yöntemleriyle incelendi. Bunun için iki farklı otofagozom belirteci antikor (MAP1LC3A ve MAPLC3 α/β) kullanıldı.

Western blot analizleri sonucunda her iki antikorun yaklaşık 18 kda moleküler ağırlığa sahip tek band olarak eksprese olduğu gözlemlendi. Her iki otofagozom belirtecinin ekspresyon düzeylerinin hipotiroidili sıçanların hipokampus örneklerinde kontrol değerlerinden biraz düşük olduğu, Levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili gruptaki sıçanların hipokampuslerinde ise kontrol ve hipotiroidili gruplarından daha yüksek olduğu ancak gruplar arası farklılıkların anlamlı olmadığı belirlendi ($P>0.05$).

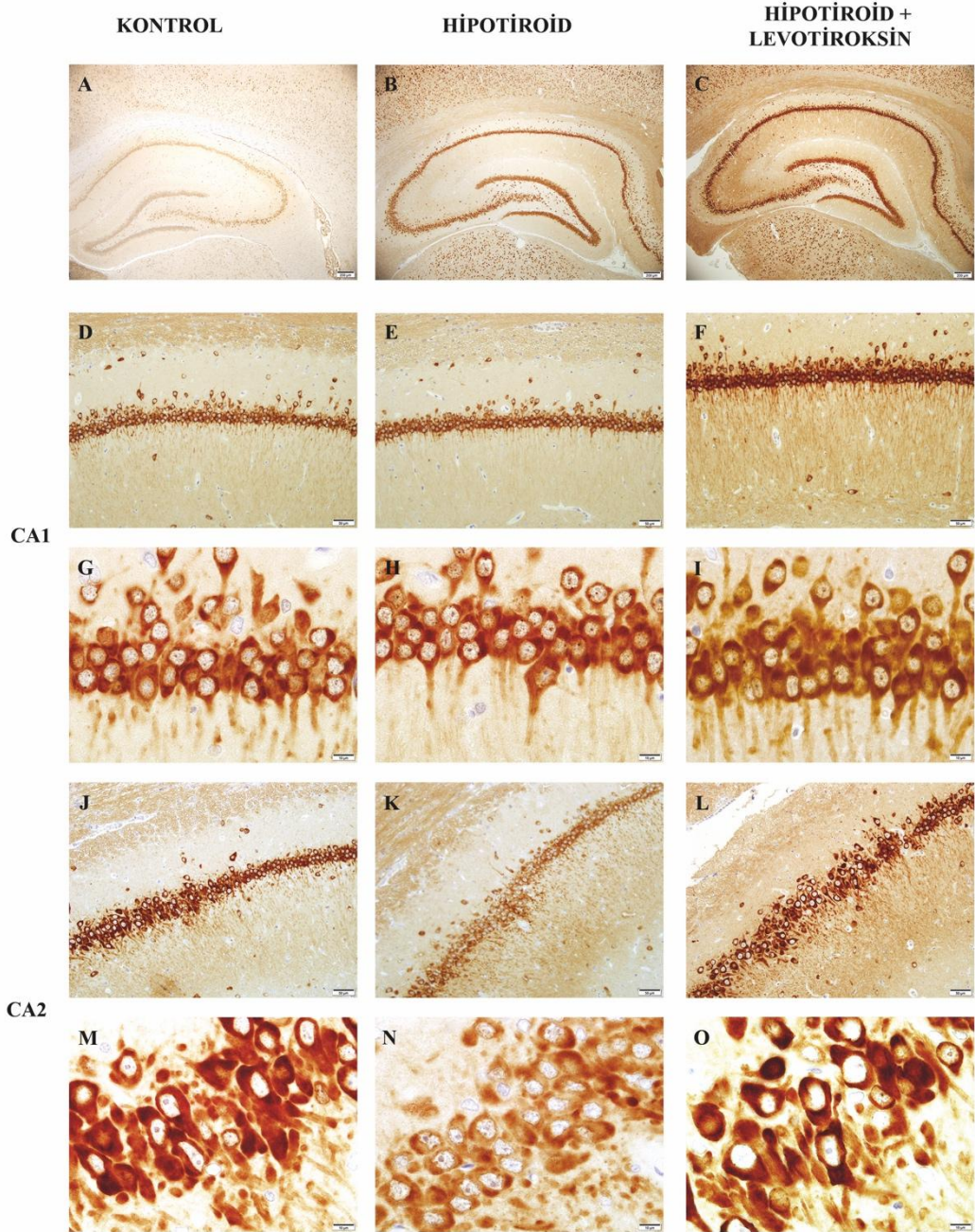


Şekil 4.5.41. Kontrol, hipotiroidili ve levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili sıçanların MAPLC3 α/β ve MAPLC3 ekspresyonları. Western blot analiz yöntemi.

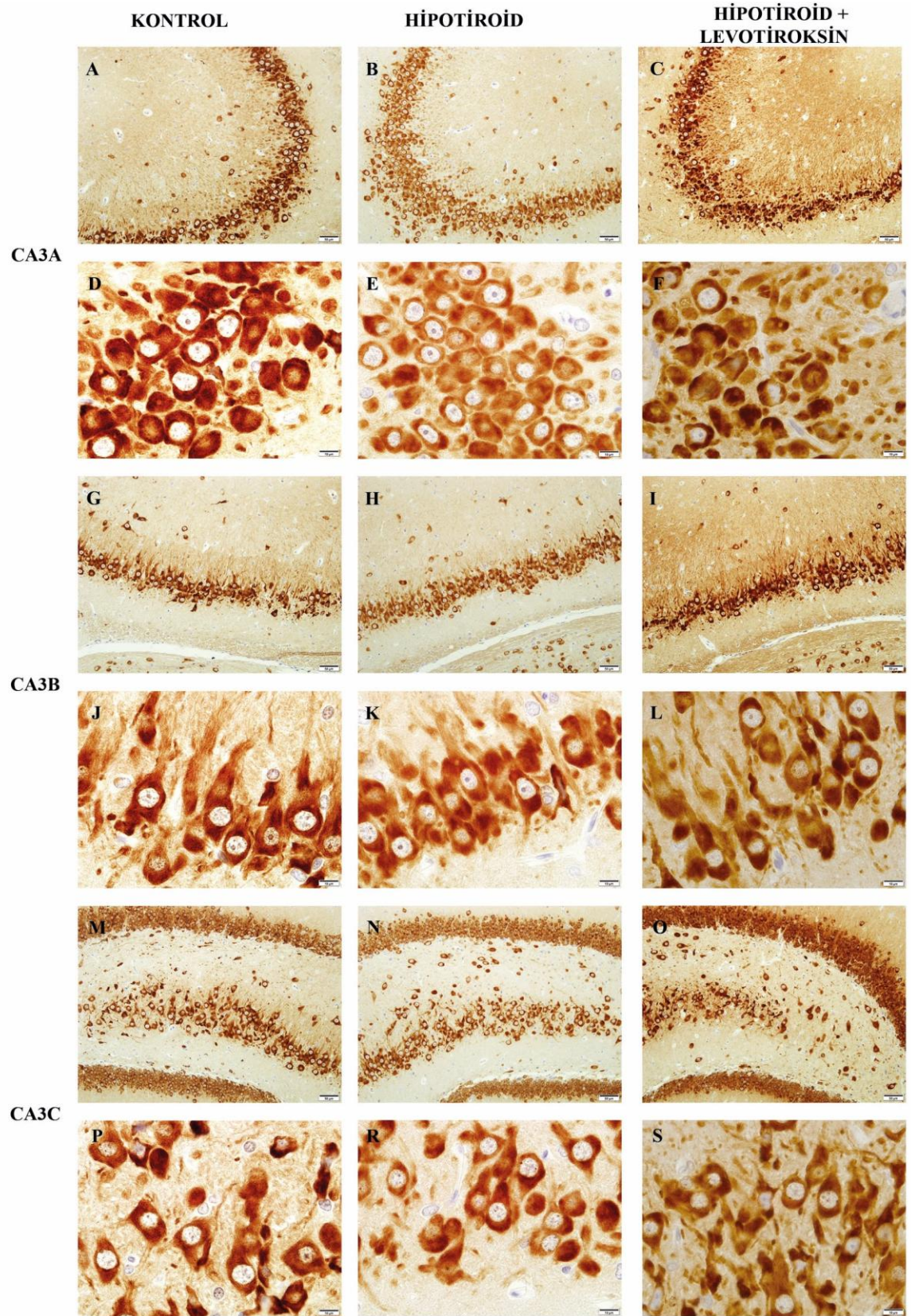
İmmunohistokimyasal incelemede tüm grupların hipokampüslerinde MAPLC3 α/β ve MAPLC3A'nın CA bölgelerinde stratum pyramidale katmanındaki ve dentat girusun granüler hücre katmanındaki nöronların sitoplazmalarında yerleştiği, bazı nöronlarda intranükleer boyanmanın bulunduğu görüldü. Sitoplazmik reaksiyonun kuvvetli ve homojen bir boyanma tarzında olduğu dikkat çekti. Her iki otofagozom belirtecinin immünboyanmalarının hipotiroidili sıçanların hipokampüs örneklerinde kontrol grubuna kıyasla biraz daha zayıf olduğu, Levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili gruptaki sıçanların hipokampüslerinde ise diğer gruplardakinden daha yoğun olduğu gözlemlendi (Şekil 4.5.42 – 4.5.47).



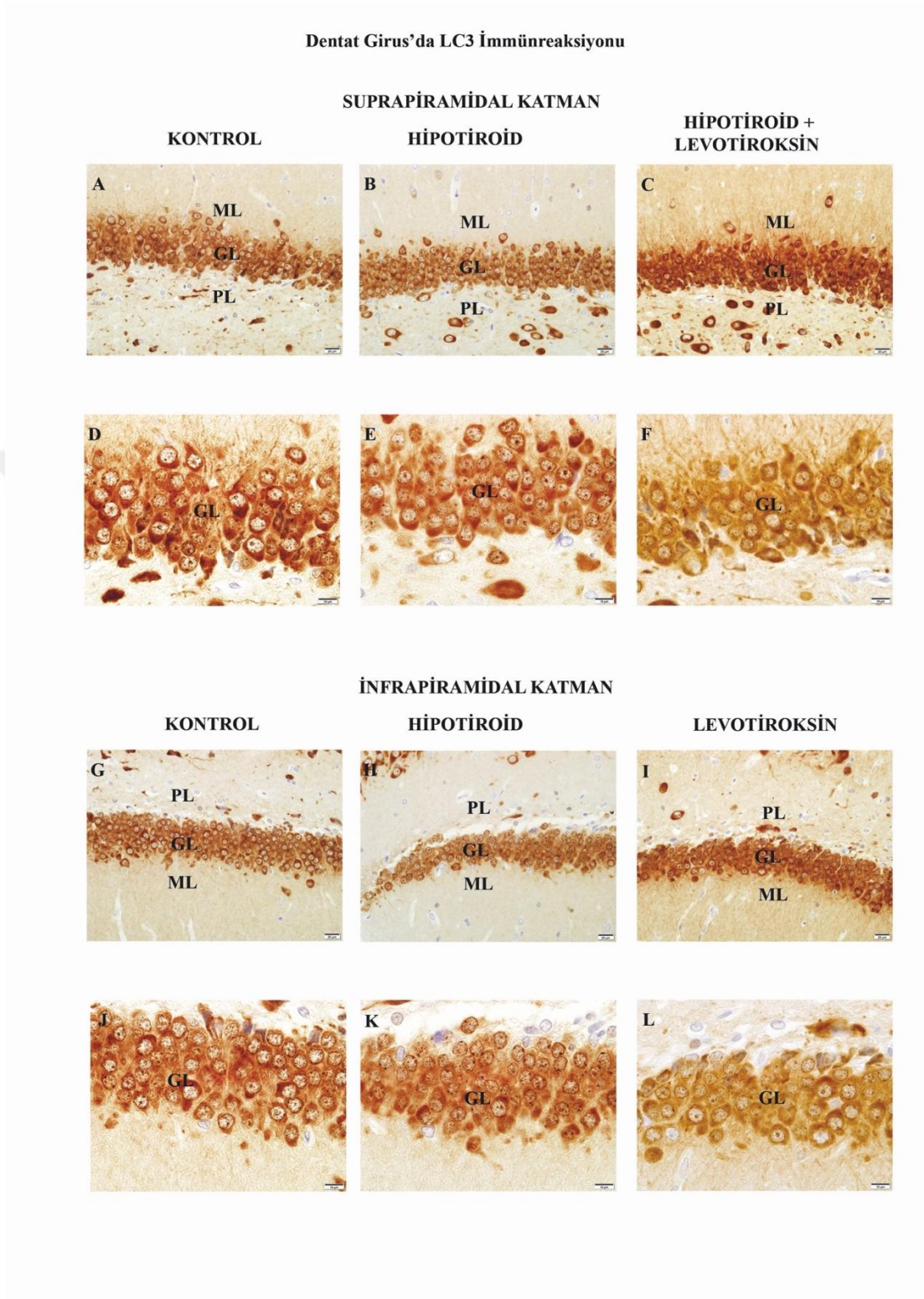
HİPOKAMPÜS'DE LC3 İMMÜNREAKSİYONU



Şekil 4.5.42. Kornu ammonis'deki CA1 ve CA2 bölgesinde MAPLC3 α/β immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 4X; D-F, 20X; G-I, 100X; J-L, 20X; M-O, 100X.

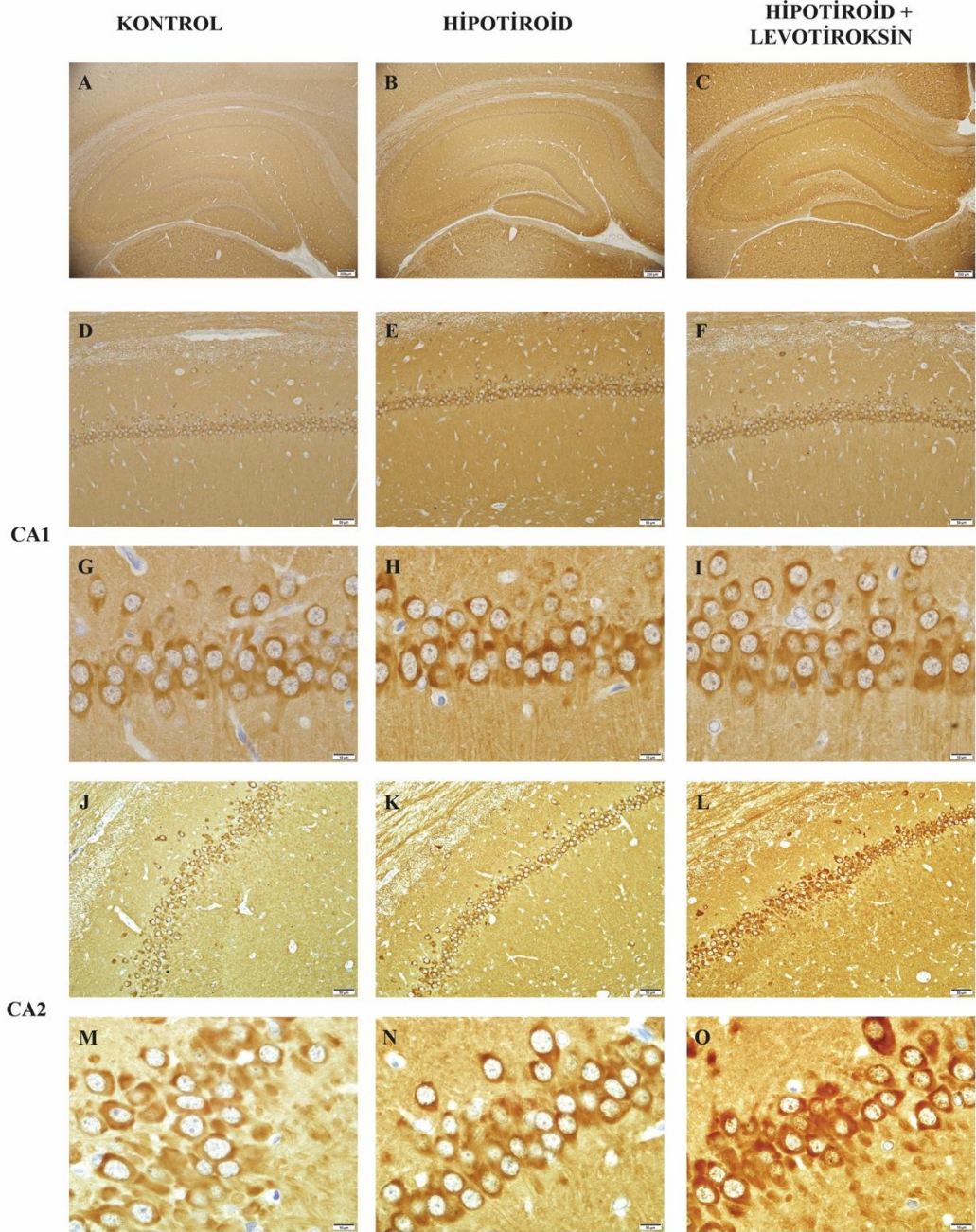


Şekil 4.5.43. Kornu ammonis'deki CA3 bölgesinin MAPLC3 α/β immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X; M-O, 20X; P-S, 100X.

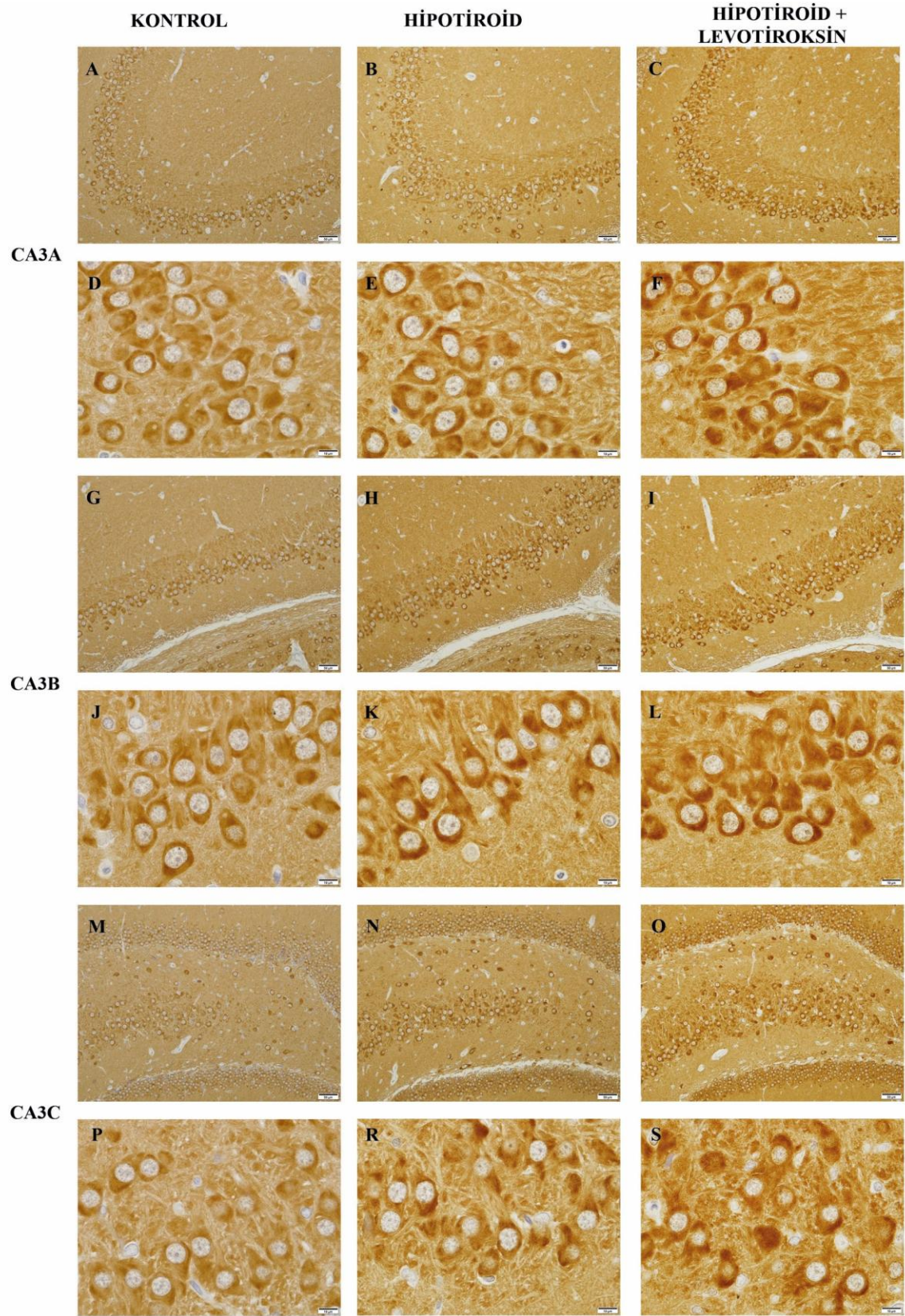


Şekil 4.5.44. Hipokampusun dentat girus bölgesinin MAPLC3 α/β immünlokalizasyonu. PL: Pleomorfik katman, GL: Granüler katman, ML: Moleküler katman. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X.

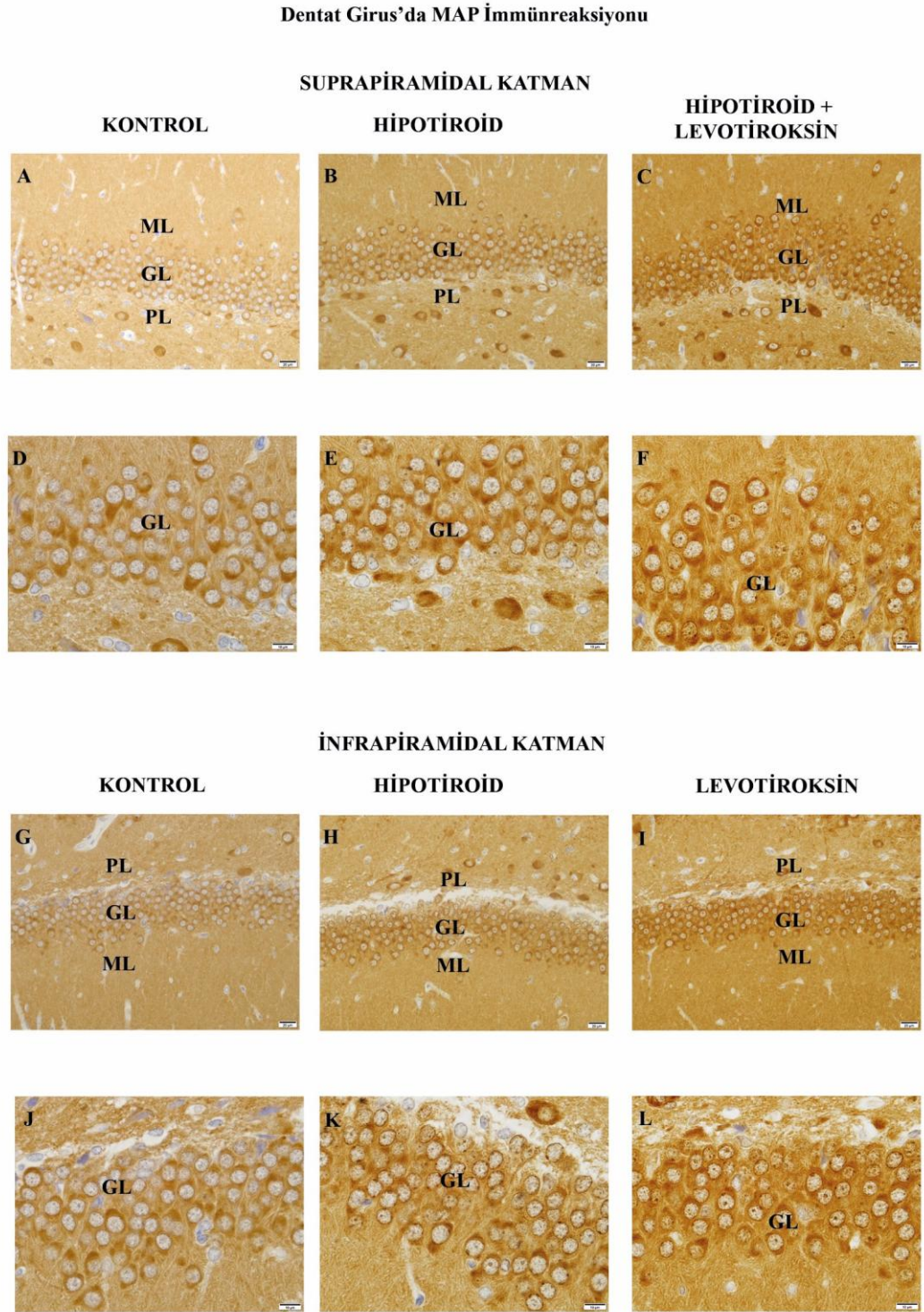
HİPOKAMPÜS'DE MAPLC3 İMMÜNREAKSİYONU



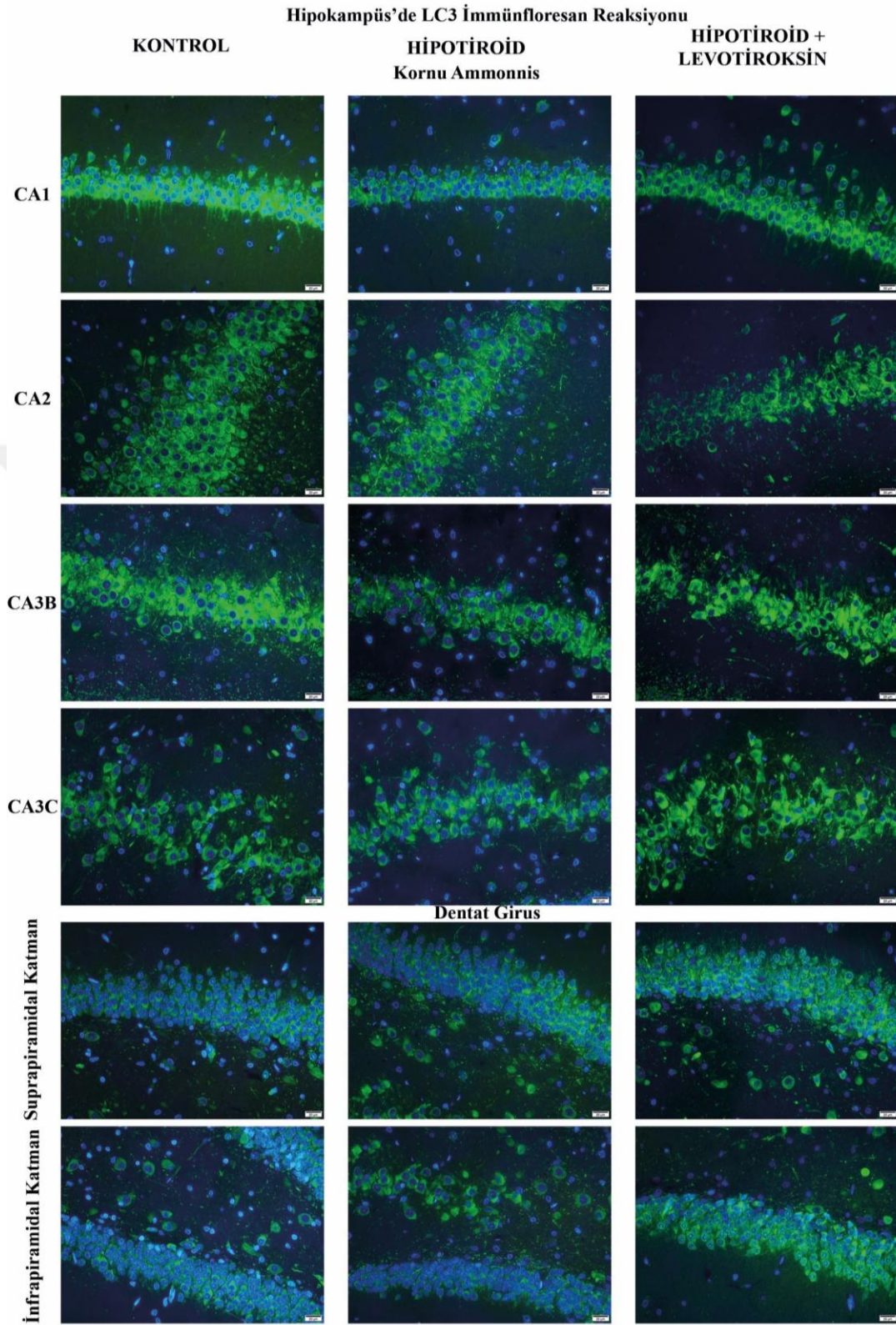
Şekil 4.5.45. Kornu ammonis'deki CA1 ve CA2 bölgesinde MAPLC3A immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 4X; D-F, 20X; G-I, 100X; J-L, 20X; M-O, 100X.



Şekil 4.5.46. Kornu ammonis'deki CA3 bölgesinin MAPLC3A immünlokalizasyonu. CA: Kornu ammonis. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X; M-O, 20X; P-S, 100X.



Şekil 4.5.47. Hipokampusun dentat girus bölgesinin MAPLC3A immünlokalizasyonu. PL: Pleomorfik katman, GL: Granüler katman, ML: Moleküler katman. Streptavidin biotin peroksidaz immunohistokimya tekniği. Objektif büyütmesi: A-C, 20X; D-F, 100X; G-I, 20X; J-L, 100X.



Şekil 4.5.48. Hipokampusün kornu ammonis ve dentat girusunda MAPLC3 α/β immünreaksiyon. İmmü floresan yöntemi. Objektif büyütmesi 40X.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tiroid hormonları (TH), genomik veya genomik olmayan etkilerle hemen hemen tüm dokularda hücrelerin normal büyüme ve gelişmeleri için gerekli olan metabolik süreçlerin ve yetişkinlerde protein, yağ ve karbonhidrat metabolizmalarının düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. TH'lerin plazma konsantrasyonları, hipotalamusun paraventriküler çekirdeği, ön hipofiz bezi ve tiroid bezinden oluşan tiroid hormonu eksenini tarafından kontrol edilir. Tiroid bezinden salgılanan tiroid hormonları tiroksin olarak da bilinen tetraiodotironin (tetraiodo-thyronine, tiroksin, T4) ve 3,5,3-triiodo-L-tironin'dir (3,5,3-triiodo-L-thyronine, T3) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551611/>, Erişim tarihi: 21 Ocak 2021). Tiroid bezi fonksiyonundaki değişiklikler hipotiroidizm ve hipertiroidizm olarak adlandırılan iki önemli metabolik hastalığa neden olur. Hipotiroidizm tiroid hormon yetersizliğiyle karakterize patolojik durumu tanımlar ve daha yaygın olarak görülür. Hipertiroidizm ise tiroid bezinden aşırı miktarda tiroid hormonunun sentezlenip salgılandığı patolojik bir bozukluktur. Primer hipertiroidizm, düşük TSH, yüksek serbest T3 ve T4 bulgusu ile, primer hipotiroidizm ise yüksek TSH ve düşük serbest T3 ve T4 düzeyleri ile karakterizedir (Chaker, 2017).

Tiroid hormonları, nörogenez, nöronal göç, nöronal ve glial hücre farklılaşması, miyelinasyon ve sinaptogenez gibi süreçlerin düzenlenmesinde önemli rol oynadığından beynin olgunlaşması ve hayat boyu süren işlevi için gereklidir. Fetal ve postnatal gelişim sırasında tiroid hormonu eksikliği, beynin olgunlaşmasının gecikmesine ve bazı durumlarda nörolojik bozukluklara neden olabilir. Gelişim sırasında beyinde tiroid hormonu eksikliği, iyot eksikliği, konjenital hipotiroidizm ve maternal hipotiroidizm ve hipotiroidizmin kaynaklanır. Yetişkinlerde tiroid hastalıkları çeşitli klinik belirtilere yol açabilir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK285549>, Erişim tarihi: 21 Ocak

2021; Laureno 1996). Örneğin, hipotiroidizm uyuşukluğa, hiporefleksi ve zayıf motor koordinasyona neden olur. Subklinik hipotiroidizm genellikle hafıza bozukluğu ile ilişkilidir. Hipotiroidizm ayrıca özellikle yaşlılarda bipolar afektif bozukluklar, depresyon veya bilişsel işlevlerin kaybı ile ilişkilidir (Ganguli ve ark., 1996). Hipertiroidizm, anksiyete, sinirlilik ve hiperrefleksiye neden olur. Hem hipotiroidizm hem de hipertiroidizm duygudurum bozukluklarına, demansa, kafa karışıklığına ve kişilik değişikliklerine yol açabilir. Bu bozuklukların çoğu genellikle uygun tedavi ile geri döndürülebilir, bu da yetişkin başlangıcındaki tiroid hormonu değişikliklerinin kalıcı yapısal kusurlar bırakmadığını gösterir (Simon ve ark., 2002; Bauer ve ark., 2005).

Sıçanlar, tiroid bezi fizyolojisi ve tiroid hormonunun beyin üzerindeki etkilerinin araştırılmasında en yaygın olarak kullanılan hayvan modelidir. Hayvan çalışmalarının sonuçları insana uyarlandığında, olayların sırası benzer olsa bile, memeliler arasında doğumla ilgili gelişim zamanlaması önemli farklılıklar gösterir (Holt ve ark., 1981). Beynin büyümesi insanlarda ve kemirgenlerde doğumdan sonra meydana gelir, ancak sıçanlar ve fareler insanlardan daha az gelişmiş bir tiroid eksenini ile doğarlar (Legrand, 1984).

Hipotiroidizm ve hipertiroidizmin deneysel olarak oluşturulmasında çeşitli ilaçlar kullanılır. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanları Levotiroksin (L-tiroksin) ve 6-n-propil tiourasil (PTU)'dir. Levotiroksin primer hipotiroidizmi tedavi etmek için kullanılır. Levotiroksin TSH'ı düşürerek etki gösterir (Charles, 2018). PTU ise tiroid bezi tarafından tiroid hormonu salgılanmasını arttırarak ve T4'ün aktif T3'e dönüşümünü sağlayan 5'-deiodinaz enzimini inhibe ederek hipertiroidizmi tedavi eden tiyoamid türevi bir ilaçtır (Nakamura ve ark., 2007). PTU, tiroid hormonlarının sentezini inhibe eder; spesifik olarak, T4'ün T3'e dönüşümünü engeller (Moriyama ve ark., 2007). Çeşitli araştırmacılar, PTU'nun primer hipotiroidizme neden olduğunu göstermiştir (Hang ve ark., 2005; Hidayat ve ark., 2019). Bu çalışmalarda hipotiroidizmi indüklemek için PTU farklı dozlarda uygulanmış ancak 10 mg/kg düzeyinde uygulandığında sabit antioksidan etkiler gösterdiği saptanmıştır (Hicks ve ark., 1992; ve ark., 2010; Kim ve ark., 2012).

Bu tez çalışmasında tiroid hormonlarının yetersizliğine bağlı olarak şekillendiği bilinen bilişsel bozukluklarda otofajik mekanizmalardaki değişikliklerin rolünün olup

olmadığının ortaya konması amaçlanmıştır. Çalışmada propiltiourasil (PTU) verilerek hipotiroidizm oluşturulan erişkin sıçan modelinde ve hipotiroidizm oluşturulduktan sonra Levotiroksin ile tedavi edilen sıçan modelinde, hipokampus dokusunda AMPK α 1, fosfo-AMPK α 1, tuberin (tuberoz skleroz kompleks 2, TSC2), mTOR, fosfo-mTOR, ULK1, fosfo-ULK1, BECLIN1 gibi otofaji ile ilişkili çeşitli proteinlerin ve otofagozom oluşumunda önemli rol oynayan LC3'ün ekspresyon düzeylerinin değişip değişmediği; eğer değişiyorsa bu değişimin otofajinin indüklenmesi veya baskılanması yönünde olup olmadığı ve otofajinin indüklenmesinde AMPK sinyal yolağının rol oynayıp oynamadığı araştırıldı. Bu amaçla çalışmada, sıçanlarda hipotiroidizm oluşturmak için PTU 10 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak 28 gün süreyle hem hipotiroidili gruba hem de Levotiroksin ile tedavi edilmiş gruba tedavi öncesinde uygulandı. Bu hayvanlarda hipotiroidizmin şekillenip şekillenmediğini belirlemek amacıyla yapılan hormon ölçümlerinde, hipotiroidili grupta ve Levotiroksin ile tedavi edilmiş grubun tedavi öncesinde serbest T3 ($1,0279 \pm 0,151$ pg/mL) ve T4 ($11,315 \pm 1,319$ pg/mL) hormon düzeylerinin kontrol grubuna (T3: $4,48 \pm 0,183$ pg/mL; T4: $44,3783 \pm 1,74$ pg/mL) göre önemli ölçüde düşük olduğu, buna karşın TSH düzeylerinin ise yüksek olduğu (H: $42,9257 \pm 1,822$ ng/mL; K: $16,0917 \pm 0,972$ ng/mL) görüldü. Bu sonuçlar PTU ile indüklenmiş hipotiroidizmli sıçanlarda yapılan önceki çalışmaların sonuçları (Alkalby ve ark., 2013; Nambiar ve ark., 2014; Godini ve ark., 2015; Donzelli ve ark., 2016; Hwang ve ark., 2018) ile örtüşmekte olup, primer hipotiroidizmin başarıyla oluşturulduğunu göstermektedir. Levotiroksin ile tedavi edilmiş grupta ise 15 günlük tedavi sonrası özellikle T3 ($3,9869 \pm 0,09$ pg/mL) ve T4 ($42,6369 \pm 2,218$ pg/mL) düzeylerinin kontrol grubu düzeylerine ulaştığı, TSH ($27,6685 \pm 1,342$ ng/mL) düzeylerinin de oldukça düştüğü tespit edildi. Bu bulgular Levotiroksin'in hipotiroidizmi tedavi ettiğini göstermektedir (Yang ve ark., 2018).

Tiroid hormonunun vücut ağırlığı ve enerji harcaması ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Fox ve ark., 2008; Iwen ve ark., 2013; Knudsen ve ark., 2005). TH, enerji depolama ve harcamasını düzenleyerek enerji dengesini kontrol eden temel metabolik yolları etkiler (Cheng ve ark., 2010; Iwen ve ark., 2013; Liu ve ark., 2010). TH metabolizmayı öncelikle beyin, beyaz yağ, kahverengi yağ, iskelet kası, karaciğer ve pankreasdaki eylemlerle düzenler (Cheng ve ark., 2010). Aşırı tiroid hormonu üretimi olan hipertiroidizm, istirahatte artan enerji harcaması, kilo kaybı, azalmış kolesterol seviyeleri, artan lipoliz ve glukoneogenez ile karakterize hipermetabolik bir

durumu teşvik eder (Motomura, 1998; Brent, 2008). Tersine, hipotiroidizm, azalmış tiroid hormon seviyeleri, istirahatte enerji harcamasında azalma, kilo alımı, artan kolesterol seviyeleri, azalmış lipoliz ve azalmış glukoneogenez ile karakterize düşük metabolizma hızı ile ilişkilidir (Brent, 2012). TH hem lipogenezi hem de lipolizi uyarır, ancak TH seviyeleri yükseldiğinde net etki yağ kaybıdır (Oppenheimer ve ark., 1991). Bu çalışmada tiroid hormonun metabolik etkisini belirlemek amacıyla sıçanların canlı ağırlıkları ve kan glikoz düzeyleri incelendi. Denemelere sıçanlar 39 günlük iken başlandı ve kontrol ile hipotiroidili gruptaki sıçanlar 28 gün süre ile denemeye tabi tutuldu. Levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi grubunda ise bu süreye ek olarak 15 gün Levotiroksin ile tedavi uygulandı. Denemelerin bitiminde tüm gruptaki hayvanların canlı ağırlıklarının (K: 205.266 ± 6.18 g; H: 116.823 ± 3.847 g; H+L: 198.875 ± 2.715 g) deneme sürecinde hayvanların büyümesine paralel olarak arttığı ve canlı ağırlıktaki bu artışın istatistiksel açıdan önemli olduğu gözlemlendi ($P < 0.05$). Bununla birlikte canlı ağırlık artış oranının gruplara göre farklı olduğu ve bu farklılığın istatistiksel önem taşıdığı saptandı ($P < 0.05$). Kontrol grubunda canlı ağırlık artış oranının (2.0918 ± 0.0417) diğer gruplara göre daha yüksek olduğu, ikinci sırada Levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi grubunun (1.6418 ± 0.018) bulunduğu, hipotiroidi grubunun (1.3954 ± 0.046) ise en düşük canlı ağırlık artış oranına sahip olduğu tespit edildi. Metabolizmanın yavaşlaması ve buna bağlı kilo artışının hipotiroidizmin önemli klinik belirtilerinden olduğunun bildirilmesine (Brent, 2012) karşılık, bu çalışmada saptanan hipotiroidili hayvanlardaki düşük canlı ağırlık artış oranının varlığı, PTU ile indüklenen hipotiroidizmli sıçan modeli çalışmalarında da gösterilmiştir (Nambiar ve ark., 2014; Godini ve ark., 2015; Xu ve ark., 2017; Hwang ve ark., 2018).

Hipotiroidizm dünyada en sık görülen endokrinopatilerden biridir ve insidansı hızla artmaktadır. Sıklıkla hem tip 1 hem de tip 2 diabetes mellitus ile bir arada bulunur. Son yıllarda yapılan çalışmalar hipotiroidizmin, hipoglisemiye sebep olabilecek çeşitli hormonal biyokimyasal ve sinir sistemi anormallikleriyle bağlantılı olduğunu göstermektedir (Kalra ve ark., 2014). Hipotiroidizmin hipoglisemiye yol açmasının birkaç farklı mekanizması açıklanmıştır: i) Bu durum insülin ile indüklenen hipoglisemiye karşı düşük büyüme hormonu ve kortizol yanıtları ile bağlantılıdır (Ridgway ve ark., 1972). Örneğin hipotiroidizm hem hipotalamus hem de hipofize etki ederek bazal ve uyarılmış büyüme hormonu düzeylerini azaltır. Düşük büyüme

hormonu cevabı hipotiroidizmde hipogliseminin iyileşme süresini uzatır (Katz ve ark., 1969). ii) Hipotiroidili hastalar primer adrenal bozukluk ile ilgili olmamasına rağmen göreceli olarak adrenal yetmezlik gösterir. Hipotiroidili hastalarda hipoglisemiye karşı etkisiz bir hipotalamo-hipofiziyal-adrenal yanıt vardır. Hipotiroidizmde belirtilen insülin kaynaklı hipoglisemiye kortizol yanıtlarının azalması da hipoglisemiye kötüleştirir (Kamilaris ve ark., 1987). iii) hipotiroidizmde hipoglisemiye neden diğer anormallikler olarak glukagon hormonu sekresyonunda azalma (Clausen ve ark., 1986), hepatositlerde glukagonun etkisinin azalması (Müller ve Seitz, 1987) ve insülin krilensinin azalması (Shah ve ark., 1975) sayılabilir. Hem yenidoğanlarda (Kurtoglu ve ark., 1998) hem de yetişkinlerde (Shibutani ve Yokota, 1991) hipotiroidizm ve hipoglisemi arasındaki ilişkiyi tanımlayan vaka raporları yayınlanmıştır.

Sıçanlarda kan glikoz düzeyi çeşitli çalışmalarda açlık ve tokluk kan glikoz düzeyi olarak gösterilmiştir. Wang ve arkadaşları (2010) ortalama açlık ve tokluk kan glikoz düzeylerinin sırasıyla 3.95 ± 1.31 mmol/L ve 5.65 ± 1.65 mmol/L olduğunu, açlık kan glikoz düzeyinin üst sınırının 6.22 mmol/L, tokluk kan glikozunun üst sınırının ise 7.9 mmol/L olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca Bräsläşu ve arkadaşları (2007) 117.06 ± 20.31 mg/dL, Cakir ve arkadaşları (2018) ise 104.29 ± 5.39 mg/dL olarak saptamışlardır. Kan glikoz seviyeleri 2-3 mmol/L ve hatta 2 mmol/L'nin altında olduğunda bu durum hipoglisemi olarak tanımlanmıştır. Hipotezlerimizden birisi hipotiroidizmin kan glikoz düzeyini düşürerek hipoglisemi oluşturabileceği ve bunun sonucu olarak hipokampüste AMPK'nın aktive edebileceğidir. Çalışma bulgularımız kan glikoz değerlerinin hipotiroidizimli sıçanlarda ($89,117 \pm 1$ mg/dL), kontrol grubu (K: 105 ± 1.37 mg/dL) ve Levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidi grubuna (H+L: $104,375 \pm 1.13$ mg/dL) göre anlamlı ($P < 0.05$) ölçüde düşük olduğunu göstermektedir. Bu değerler daha önceki çalışmaların (Bräsläşu ve ark., 2007; Wang ve ark., 2010; Cakir ve ark., 2018) verileriyle örtüşmektedir. Bu, sıçanlarda PTU ile şekillendirilen hipotiroidizmin kan glikoz düzeyini önemli ölçüde düşürdüğünü ancak hipoglisemiye neden olmadığını göstermektedir.

Hipotiroidizm tiroid bezinde büyüme foliküler ve parafoliküler hücrelerde artış gibi morfolojik değişikliklerle karakterizedir (Elkalawy ve ark., 2013). Bu çalışmada hipotiroidinin şekillenip şekillenmediğini belirlemek amacıyla tiroid makroskopik ve mikroskopik olarak incelendiğinde hipotiroidili sıçanların tiroid bezlerinin oldukça

büyük olduğu belirlendi. Mikroskopik olarak kontrol grubu ve Levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidili sıçanlardan alınan tiroid bezlerinde tiroid foliküllerinin kübik veya basık prizmatik, yuvarlak çekirdekli epitel hücreleri ile çevrili olduğu gözlemlendi. Hipotiroidili sıçanlardan alınan tiroid bezi örneklerinde folikül lümeninin çok dar olduğu, foliküllerde kolloidin bulunmadığı, folikül epitel hücrelerinin sayıca arttığı, bu hücrelerin yüksek prizmatik şekilli ve yuvarlak çekirdekli olduğu saptandı. Bu sonuç sıçanlarda PTU'nun sT3 ve sT4 hormon düzeylerini düşürerek TSH düzeyini arttırarak folikül epitel hücrelerinin aktivitesini değiştirdiğini ve böylece hipotiroidizme neden olduğunu göstermektedir (Elkalawy ve ark., 2013; Hwang ve ark., 2018).

Tiroid hormonunun glikoz metabolizması ile olan ilişkisi nedeni ile, glikozu büyük oranda tüketen beyin için hipotiroidizm, bilişsel değişikliklerde önemli bir etkidir. Hipotiroidizm, sözlü, görsel, ilişkisel ve çalışma belleği gibi bir dizi bilişsel işlevde öğrenme ve bellek bozukluklarına neden olur. Bu bozukluklar, tiroid durumundaki değişikliklerin, beynin bilişsel işlevle ilişkili bölgelerinde değişikliklere yol açabileceğini göstermektedir. Tiroid hormonları, beynin çeşitli bölgeleri özellikle de hipokampüsün kornu ammonis ve dentat girus bölgelerinin gelişimi için önemlidir. Hipokampüs, beynin öğrenme ve hafızayla ilgili, tiroid hormonu reseptörü bakımından zengin bir bölgesidir. Yenidoğan, perinatal, postnatal ve yetişkin sıçanlarda yapılan çalışmalar, tiroid hormon düzeylerindeki değişikliklerin hipokampal ilişkili öğrenme ve hafızayı, sinaptik plastisiteyi ve nörojenezi bozduğunu ortaya koymuştur (Gilbert ve ark., 2012; Koromilas ve ark., 2010; Alzoubi ve ark., 2009; Gerges ve ark., 2004; Gilbert, 2004; Madeira ve ark., 1992). Hipotiroidizmin hipokampüsün CA1, CA3 ve dentat girus bölgeleri üzerindeki etkilerini araştıran ilk çalışmalar, hipokampüsün dentat girus ve CA1 bölgelerindeki hücrelerin hacminde, ağırlığında ve sayısal yoğunluğunda bir azalma olduğunu, ancak CA3 bölgesinin hacminde azalma, hücrelerin sayısal yoğunluğunda ise artış olduğunu göstermiştir (Madeira ve ark., 1991; Madeira ve ark., 1992). Hem gelişmekte olan hem de yetişkin hipotiroid sıçanlarda belirgin olan bu farklılıklar hipotiroidizmin başlangıç zamanı ve süresi ne olursa olsun, hipokampüsün bu duruma karşı savunmasız olduğunu, gelişimsel ve yetişkinlik dönemlerinde hem morfolojik değişiklikler hem de öğrenme ve hafıza kusurlarının bulunduğu bildirilmektedir (Gerges ve ark., 2004; Correia ve ark., 2006; Alzoubi ve ark., 2009). DeSouza ve ark. (2005). Yetişkin beyninde hipokampal nörojenizin düzenlenmesinde ve progenitör hücrelerin canlılığının devamlılığında tiroid hormonlarının rol oynadığını

bildirmişlerdir. Dahası hipokampal nörogenezdeki düşüşün tiroid hormonu replasmanı ile zayıflatılabileceğini bulmuşlardır. Ambrogini ve ark. (2005) da tiroid hormonlarının apoptozu önleyerek, hücrelerin hayatta kalmasını sağladığını göstermişlerdir. Yetişkin başlangıçlı hipotiroidizmin özellikle sağ hipokampüste önemli hacim azalmasına neden olduğu da gösterilmiştir (Gillian ve ark., 2014).

Beyin toplam vücut ağırlığının %2'sini oluşturmaya rağmen, tüm glikoz arzının %50'sinden yararlanır. Beyin hücreleri tarafından enerji tüketimi çok yüksektir ve diğer periferik hücrelerden farklı olarak, nöronlar enerji kaynağı olarak sadece glikozu kullanırlar. Nöronlar, yeterli miktarda glikojen sentezleyip depolayamadığı için, sürekli bir glikoz kaynağı temin etmek zorundadırlar. Glikoz homeostaz dengesizliklerinin erişkin nörogenez ve sinaptik plastisitede yer alan sinyal yollarını değiştirebileceği ve böylece nörodejeneratif bozukluk riskini artırdığı bildirilmektedir (Kodl ve Seaquist, 2008). Memelilerde glikoz eksikliğinin çeşitli doku ve organlarda otofajiyi indüklediği (Maruyama ve ark. 2008; Williams ve ark. 2009; Singh ve Cuervo, 2011; Kobayashi ve ark., 2012), otofaji ile karbonhidrat metabolizması arasında bir etkileşimin olduğu ve otofaji ile hücrel enerji dengesi arasında dinamik bir geri bildirimin bulunduğu son yıllarda yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Singh ve Cuervo, 2011).

Otofaji, fazla veya zarar görmüş proteinleri, protein komplekslerini ve organelleri ortadan kaldırmak için önemli bir hücrel mekanizmadır. Otofajinin düzenlenmesinde çeşitli sinyal yolları yer alır. Genetik çalışmalar, ULK1'in otofaji indüksiyonunda önemli bir role sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, otofaji, anahtar bir enerji sensörü olan ve enerji homeostazını sürdürmek için hücrel metabolizmayı düzenleyen AMP ile aktive edilmiş protein kinaz (AMPK) tarafından desteklenir. Tersine, otofaji, büyüme faktörü ve besin sinyallerini entegre eden merkezi bir hücre büyüme düzenleyicisi olan rapamisin (mTOR) memeli hedefi tarafından engellenir. Glikoz açlığı durumunda AMPK, ULK1'i Ser 317 ve Ser 777'nin fosforilasyonu yoluyla doğrudan aktive ederek otofajiyi teşvik eder. Besin yeterliliği altında, yüksek mTOR aktivitesi, ULK1 Ser 757'yi fosforile ederek ve ULK1 ile AMPK arasındaki etkileşimi bozarak ULK1 aktivasyonunu önler. Bu koordineli fosforilasyon, otofaji indüksiyonunda ULK1 için önemlidir. AMPK'nın mTOR yollarını inhibe eden tuberokleroz kompleksini (TSC1 / 2) fosforile ettiği gösterilmiştir.

Otofaji nöronal homeostaza katkıda bulunarak merkezi sinir sisteminde önemli bir rol oynar. Otofajinin nöronları beslenme açlığından koruduğu dolayısıyla nöroprotektif bir rol oynadığı bilinmektedir (Kaushik ve ark., 2011). Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalar i) otofajinin nöronlarda da normal koşullar altında yapısal olarak meydana geldiğini, ii) yapısal otofajinin nöronal sağkalımdan sorumlu olduğunu (Poels ve ark., 2012), iii) yapısal otofajinin bozulmasının nörodejenerasyona yol açtığını ve iv) ayrıca bozulmuş otofajinin Alzheimer hastalığı (Liu ve Li, 2019), Parkinson hastalığı (Hou ve ark., 2020), şizofreni (Schneider ve ark., 2016), Scrapie (Fan ve ark., 2015) gibi nörogelişimsel ve nörodejeneratif bozuklukların patogenezinde rol oynadığını göstermiştir (Hara ve ark., 2006; Komatsu ve ark., 2006; Vijayan ve Verstreken, 2017). Tiroid hormonu ve otofajinin iskelet kası büyümesinin, rejenerasyonunun ve farklılaşmasının düzenlenmesinde benzer işlevleri paylaştığı, TH ile indüklenen otofajinin, mitokondriyal reaktif oksijen türleri (ROS) ile AMPK ve Unc-51 benzeri otofajiyi aktive eden kinaz (ULK1)'in aktivasyonunu ve rapamisin'in memeli hedefi (mTOR) yolağının inhibisyonunu içerdiği, ayrıca TH kaynaklı otofajinin, iskelet kasında mitokondriyal aktiviteyi ve biyogenezi korumak için gerekli olduğu (Lesmana ve ark., 2016) ve TH'nun karaciğerde otofajiyi arttırdığı gösterilmiştir (Sinha ve ark., 2012). Bununla birlikte yapılan literatür taramalarında hipotiroidizmin hipokampusda otofajiyi inhibe ya da modüle edip etmediği ve otofagozom oluşumunu indükleyip indüklenmediği bilinmemektedir. Sunulan tez çalışmasında tiroid hormonlarının yetersizliğine bağlı olarak şekillendiği bilinen bilişsel bozukluklarda otofajik mekanizmalardaki değişikliklerin rolünün olup olmadığı araştırıldı.

Dokularda glikoz eksikliği adenosin trifosfat (ATP) konsantrasyonunun azalmasına ve adenosin monofosfat (AMP) düzeyinin artmasına yani AMP/ATP oranında bir artışa neden olur. AMP düzeyindeki artış bir hücrel enerji sensörü olan adenosin monofosfat ile aktive olan protein kinaz (AMPK)'ın upstream kinazlar tarafından fosforile olarak aktifleşmesini sağlar (Stein ve ark., 2000; Hardie ve Hawley, 2001; Hardie, 2011). AMPK'nın AMP/ATP oranından bağımsız olarak glikoz seviyesinin düşmesiyle de aktive olduğu bilinmektedir (Lin ve Hardie, 2018). Aktifleşen AMPK, mTOR bağımlı protein translasyonu gibi enerji yoğun süreçleri kapatarak, hücrel ATP üretimini arttırarak ve ATP tüketimini azaltarak enerji tasarrufu sağlayan bir program koordine eder (Towler ve Hardie, 2007) ve otofajiyi indükler (Gwinn ve ark., 2008).

AMPK, tüm ökaryotlarda bir α katalitik alt birim ile β ve γ düzenleyici alt birimlerden oluşan bir $\alpha\beta\gamma$ heterotrimerdir. Memelilerde her alt birim için birden fazla izoform mevcuttur ($\alpha1$, $\alpha2$, $\beta1$, $\beta2$, $\gamma1$, $\gamma2$ ve $\gamma3$). α -alt birimleri, bir N-terminal kinaz katalitik alanı, bir otoinhibitör sekans ve bir C-terminal β -alt birim bağlanma alanından (Crute ve ark., 1998) oluşur. β alt birimleri, bir internal karbonhidrat bağlama modülü (β -CBM) ve α - ve γ -alt birimlerini bağlamak için işlev gören korunmuş bir C-terminal dizisi içerir (Mitchell ve ark., 1997; Iseli ve ark., 2005; Townley ve ark., 2007; Lin ve Hardie, 2018). β -CBM, AMPK'nın hücrede glikojen partiküllerinin lokalizasyonunu (Hudson ve ark., 2003) ve AMPK'nın bir tür glikojen sensörü gibi çalışmasını sağlar. AMPK, $\beta1$ alt biriminde glisin2'nin N-terminal miristoilasyonu ile translaşyonel olarak ve α ve β alt ünitelerinde yoğun fosforilasyonla post-translaşyonel olarak modifiye edilir. AMPK γ alt ünitesi ise düzenleyici nükleotidler olan AMP, ADP ve ATP için bağlanma alanları bulundurur (Lin ve Hardie., 2018). Fizyolojik ATP konsantrasyonu (5 mM) sağlandığında $\gamma1$ ve $\gamma2$ içeren kompleksler AMP ile daha yüksek oranda aktive olurlar (Ross ve ark., 2016).

Son on yılda elde edilen veriler AMPK'nın nöronlarda enerji üretimi ve tüketiminin düzenlenmesi için gerekli olduğunu ve merkezi sinir sistemi fizyopatolojisinde önemli rol oynadığını göstermektedir (Rosso ve ark., 2017). Sunulan çalışmada PTU ile indüklenmiş hipotiroidizmlili sıçan modelinde hipokampüsünde AMPK ekspresyonundaki olası değişiklikler immunohistokimya ve western blot analiz teknikleri kullanılarak incelendi. İmmünohistokimyasal sonuçlarımız da AMPK'nın hipokampüsde yoğun olarak nöropilde ve hücre çekirdeklerinde lokalize olduğunu, p-AMPK-Thr183/Thr172'nin ise nöronlarda sitoplazmada ve bazen de çekirdekte yerleştiğini gösterdi. Hipokampüs bölgelerindeki AMPK immünreaksiyonunun genel olarak hipotiroidili ve Levotiroksin ile tedavi edilmiş sıçanlarda kontrole göre artmış olduğu p-AMPK-Thr183/Thr172 immünreaksiyonunun ise kontrol grubuna göre özellikle CA3a bölgesindeki nöronların çekirdek ve sitoplazmalarında ve dentat gyrusunun granüler katmanındaki nöronların çekirdeklerinde arttığı tespit edildi. Bu çalışmada AMPK'nın alfa1/2 alt ünitesine karşı hazırlanmış antikör kullanıldı. Bu nedenle her bir alt ünitenin ayrı ayrı hipokampal nöronlardaki hücresel yerleşimi belirlenemedi. Ancak sıçan embriyolarının beyinlerinde ve hipokampal kültürlerde bildirilenlere (Culmsee ve ark., 2001) benzer olarak immunohistokimyasal bulgularımız AMPK'nın erişkin sıçan hipokampüslerinde yapısal olarak eksprese olduğunu ve bu

hücrelerde fonksiyonel AMPK'nın varlığını göstermektedir. Sunulan çalışmada her ne kadar hipoglisemi şekillenmemiş olsa da hipotiroidili grupta kan glikoz düzeylerinin kontrol ve Levotiroksin ile tedavi edilmiş gruptakilere kıyasla düşük olarak saptanması, hipokampüste AMPK ekspresyonunun aktive olması gerektiği, yani p-AMPK-Thr183/Thr172 düzeylerinde bir artış olması beklentisini oluşturdu. Çünkü AMPK'nın enerji arzını taleple dengelemek için bir sinyal merkezi olarak işlev gördüğü ve Thr172'nin aktivasyon döngüsünün fosforilasyonunun AMPK aktivasyonu için gerekli bir basamak olduğu bilinmektedir (Viollet ve ark., 2014). Elde edilen western blot analiz sonuçları hipotiroidili gruptaki sıçanlarda p-AMPK β 1, p-AMPK β 2 ve p-AMPK γ 2 ekspresyon düzeylerinin, kontrol grubuna göre daha yoğun olmasına karşın p-AMPK β 2 ve p-AMPK γ 2 ekspresyonlarının diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek olduğunu gösterdi ($P < 0.05$). Levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili grupta diğer gruptakilere göre total AMPK α 1/2 ekspresyonu önemsiz derecede yüksek ($P > 0.05$) iken, p-AMPK α 1/2 ekspresyonu ise yine bu grupta kontrol grubundakinden anlamlı olarak yüksek ($P < 0.05$) bulundu. AMPK alt birimlerinin enzim aktivitesi üzerindeki etkileri ve / veya AMPK'nin substratları üzerindeki etkileri bilinmemektedir. Bununla birlikte, farklı AMPK kompleksleri arasında işlevsel farklılıkların var olmasının muhtemel olduğu düşünülebilir.

Çalışmamızda hücre içi AMP düzeyleri ve buna bağlı olarak AMP/ATP oranları ölçülemedi. Bununla birlikte western blot analiz sonuçları dikkate alındığında, hipotiroidili sıçanların hipokampüsünde p-AMPK β 2 ve p-AMPK γ 2 ekspresyonlarının yüksek olmasının nedeni olarak kan glikoz düzeyinin düşmesi sonucu AMP/ATP'nin artabileceği ve buna bağlı olarak da her iki düzenleyici AMPK alt tipinin aktive olabileceği fikri ileri sürülebilir. Çalışmada Levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili grupta p-AMPK α 1/2 ekspresyonunun özellikle kontrol grubuna göre yüksek olması ise bu grupta AMPK α 1/2'nin AMPK'nın katalitik aktivitesine aracılık ettiğini ve tedavi sürecinde hipokampüsteki AMPK aktivitesinin sürdürülmesini sağladığını gösterebilir (Akers ve ark., 2012). Son araştırmalar, AMPK aktivasyonunun Alzheimer hastalığı dahil çeşitli nörodejeneratif bozukluklar için nöroprotektif etkilere sahip olabileceğini gösterdi (Wang ve ark., 2020). Bu çalışmalar ışığında AMPK aktivasyonunun hipotiroidinin şekillenmesi ve tedavisi süreçlerinde hipokampus nöronlarının canlılığının devamlılığı için gerekli olduğunu gösterebilir. Bununla birlikte hipotiroidizme bağlı metabolik bozukluk ve AMPK aktivasyonu ile hipokampal

nöronların korunması arasındaki ilişkinin belirlenmesine yönelik başka çalışmaların yapılması gereklidir.

Hücrelerde TSC kompleksi, moleküler ağırlığı 130-kDa olan alt birim hamartin (TSC1 tarafından kodlanır) (van Slegtenhorst ve ark., 1997), 200-kDa moleküler ağırlıktaki protein tuberin (TSC2 gen ürünü) (Maheshwar ve ark., 1997) ve içinde yüksek oligomerik gruplar bulunduran TBC1 Alanı Aile Üyesi 7 (TBC1D7)'den (Dibble ve ark., 2012; Nakashima ve ark., 2007) oluşur (Hoogeveen-Westerveld ve ark., 2012). Tuberinin N terminal ucunun hamartin ile etkileşime aracılık ettiği gösterilmiştir (van Slegtenhorst ve ark., 1998.; Santiago ve ark., 2014). Hamartin ile etkileşime giren tuberin, protein kompleksleri oluşturur (van Slegtenhorst ve ark., 1998). Tuberin hamartinin yanı sıra 14-3-3 izoformları, protein kinaz B (Akt), AMPK, çeşitli hücre döngüsü düzenleyicileri, birkaç G-proteini ve birkaç nükleer reseptör dahil olmak üzere 20'yi aşkın proteine bağlanabilir (Rosner ve ark., 2004). Tuberin hücre büyümesi ve çoğalmasını kontrol eder. Hücre siklusunun negatif bir düzenleyicisidir. Tuberin yokluğunda hücre siklusunun G1 fazı kısalmıştır (Rosner ve ark., 2007). Tuberin, büyüme için önemli olan en az iki tip sinyale duyarlıdır: mitojenler ve enerji durumu. Mitojenik uyaranlar, Akt'yi aktive eden PI3K'i aktive eder ve bu da tuberinin inhibisyonu ve fosforilasyonuna neden olur. Böylece bir GTP bağlayıcı protein olan beyinde zenginleştirilmiş Ras homologunun (Rheb) ve mTOR'un negatif regülasyonunu düzelterek hücre büyümesi ve proliferasyonunu sağlar (Tee ve ark., 2003). Tuberinin hücrelerde sitoplazmik yerleşim gösterdiği, bunun yanı sıra Golgi aparatına ve çekirdeğe de lokalize olduğu bildirilmiştir (Lou ve ark., 2001). Tuberinin çekirdekteki lokalizasyonunun geçici olduğu ve bu lokalizasyonun, hücre içindeki fosforilasyon olayları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Lou ve ark., 2001).

Sunulan çalışmada TSC2'nin sıçan hipokampuslerinin kornu ammonis bölgesindeki piramidal hücrelerin sitoplazmalarında orta yoğunlukta eksprese olduğu, dentat girüstaki hücrelerde ise daha zayıf ekspresyon sergilediği belirlendi. p-TSC2-Thr1462'nin ise kornu ammonis ve dentat girus nöronlarının sitoplazmalarında granüler immün boyanma sergilediği ve ayrıca çekirdekte de yerleşim gösterdiği tespit edildi. Bu bulgular TSC2'nin sitoplazmik ekspresyonunu gösteren çalışmaları (Lou ve ark., 2001) destekler niteliktedir. Ayrıca p-TSC2-Thr1462'nin nöronlarda granüler immünreaksiyonu ise, bu proteinin sitoplazmada Golgi aygıtında ya da Nissl

cisimciklerinde yerleştiğini (Lou ve ark., 2001) gösterebilir. Çalışmamızın western blot analiz sonuçları TSC2 ve p-TSC2-Thr1462'nin ekspresyon düzeylerinin Levotiroksin ile tedavi edilmiş gruptaki hayvanların hipokampuslerinde en düşük olduğunu, hipotiroidili grupta ise önemsiz derecede diğer grup değerlerinden daha yüksek olduğunu gösterdi. İmmünohistokimyasal sonuçlara paralel olarak TSC2 ve p-TSC2-Thr1462 ekspresyonları açısından kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki farklılıklar önemsiz bulunurken ($P>0.05$), hipotiroidili ve Levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili grup arasındaki farklılıkların istatistiksel önem taşıdığı tespit edildi ($P<0.05$). Tuberin, AMPK'nın bir substratıdır (Inoki ve ark., 2003). Enerji açlığı koşulları altında, AMPK, TSC2'yi fosforile eder ve aktivitesini artırır. TSC2'nin AMPK tarafından fosforilasyonu, enerji yoksunluğuna yanıt olarak translasyonun düzenlenmesi ve hücre boyutunun kontrolü için gereklidir. Bu fosforilasyon, tuberini aktive eder ve hücre büyümesinin durmasına neden olur. Ayrıca AMPK tarafından fosforile edilen p-TSC2-Thr1462, hücreleri enerji yoksunluğunun neden olduğu apoptozdan korur (Rosner ve ark., 2007). Bu bilgilerin ışığında hipotiroidili sıçanların hipokampuslerinde önemsiz de olsa artmış TSC2 ve p-TSC2-Thr1462 ekspresyonunun hücre büyümesi ve canlılığın devamlılığında görev aldığı ve olası enerji yoksunluğunun neden olduğu apoptozdan koruduğu ileri sürülebilir.

mTOR yolağı enerji, besin, büyüme faktörleri ve diğer çevresel durumlara yanıt olarak hücre büyümesini ve makrotofajiyi kontrol eder (Zoncu ve ark., 2011) mTOR protein sentezi ve yıkım arasındaki dengenin kontrolünde anahtar rol oynar. mTOR, PI3K ile ilişkili aileye ait bir proteindir (Keith ve ark., 1995)). mTOR farklı iki komplesten oluşur. mTOR kompleks 1 (mTORC1) raptor alt ünitesi ile (Hara ve ark., 2002)), mTORC2 ise rictor alt ünitesi ile tanımlanır (Loewith ve ark., 2002). Her iki kompleks zorunlu memeli letal SEC13 protein 8 (mLST8) alt ünitesi bulundururken (Chen ve Kaiser, 2003), raptor ve rictor'la etkileşen diğer alt ünitelerde farklılık gösterir (Zoncu ve ark., 2011). Protein homeostazını kontrol eden mTORC1'in aktivitesi rapamisin tarafından inhibe edilir. mTORC1 hücre büyümesini translasyon, ribozom biyogenezi ve otofaji ile sağlar (Zoncu ve ark., 2011). Aktivasyonu besinler ve amino asitler gerektirir, bu da raptor aracılı mTORC1'in lizozomlara ve geç endozomlara alınması (Sancak ve ark., 2008) ve kendi aktivatörü olan küçük GTPase Rheb'lerle birlikte bulunmasıyla sonuçlanır (Saucedo ve ark., 2003).

mTORC2, öncelikle büyüme faktörlerine yanıt verir. Hücre döngüsü girişini, hücrenin hayatta kalmasını, aktin hücre iskeleti polarizasyonunu ve anabolik çıkışı teşvik eder (Loewith ve ark., 2002). Substratları, S6K1 ile hidrofobik motif fosforilasyon bölgesini paylaşan Ser / Thr protein kinazları AKT, SGK ve PKC'yi içerir (Zoncu ve ark., 2011; Shaw ve ark., 2006). Aktin fonksiyonunu modüle ederek hücrenin şekli kontrol eden mTORC2 rapamisinine duyarlıdır (Loewith ve ark., 2002).

TSC1 veya TSC2'nin kaybının mTORC1'in yapısal aktivasyonuna neden olduğu bilinmektedir. mTORC1 otofajiyi negatif olarak regüle ettiğinden mTORC1'in hiperaktivasyonu TSC2 içermeyen hücrelerde otofajiyi sınırlar. Özellikle, TSC2 içermeyen hücrelerin canlılığı, mTORC1-bağımlı bir şekilde otofajiye bağlıdır. Ayrıca otofaji, AMPK'ye bağlı RAPTOR fosforilasyonu ve tuberinden bağımsız olarak downstream aktive edilir. Çalışmamızın western blot analiz sonuçları hipotiroidili sıçanların hipokampusunda p-mTOR düzeylerinin diğer gruplardan anlamlı ölçüde yüksek olduğunu yani mTOR'un aktive olduğunu göstermektedir. mTOR'un aktive olması ise otofajinin inhibe olduğunun bir göstergesidir. Kazyken ve arkadaşları (2019) yaptıkları bir çalışmada AMPK'nın mTORC2'yi direkt olarak fosforile ettiğini ve aktivitesini arttırdığını göstermişlerdir. mTOR'un baskılanmamasındaki bir diğer neden de AMPK'nın mTOR'u TSC2 yoluyla inhibe etmesidir (Inoki ve ark., 2003). TSC1-2 kompleksi hücre içinde merkezi bir sinyal bütünleştirme düğümü olarak görev yapar. TSC1-TSC2 kompleksi içinde TSC1, TSC2'yi stabilize ederken (Chong-Kopera ve ark., 2003), TSC2, küçük GTPaz Rheb (beyinde zenginleştirilmiş Ras homologu) için GTPaz aktive edici bir protein (GAP) görevi görür (Inoki ve ark., 2003). GTP'ye bağlı Rheb, hücre büyümesini ve çoğalmasını teşvik etmede evrimsel olarak korunmuş bir rol oynayan mTORC1'i (Wullschleger ve ark., 2006) aktive eder (Long ve ark., 2005). TSC1-TSC2 kompleksi aktifleştğinde, Rheb-GTP'nin Rheb-GDP'ye dönüşümünü uyararak mTORC1'i inhibe ederken TSC1-2 kompleksi mTORC2 kinaz aktivitesini Rheb ve mTORC1 üzerindeki etkilerinden bağımsız bir şekilde aktive ettiği bilinmektedir (Huang ve ark., 2008). TSC1-2 kompleksi içermeyen hücrelerde mTORC2 aktivasyonunun kaybından dolayı Akt fosforilasyonunda genel bir azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (Huang ve ark., 2008). Sunulan çalışmada mTOR'un alt üniteleri mTORC1 ve mTORC2'nin ekspresyonları incelenmediğinden hangi alt

ünitenin inhibe ya da aktive olduğu belirlenemedi. Bununla birlikte Levotiroksin ile tedavi edilmiş gruptaki hayvanların hipokampuslerinde TSC2 ve p-TSC2-Thr1462'nin ekspresyon düzeylerinin en düşük olduğunu gösteren bulgularımız, yine bu gruptaki sıçanların hipokampus örneklerinde mTOR ekspresyon düzeylerinin en yüksek, p-mTOR-Se2448 düzeylerinin ise en düşük olduğunu gösteren bulgularımız ile birlikte ele alındığında mTOR'un fosforile olarak aktiflemediğini bunun nedeninin de bu grupta TSC2 düzeylerinin düşük olmasından kaynaklandığı düşünülebilir. Bu sonucu net olarak açıklayabilmek için mTOR'un kompleksleri olan mTORC1 ve mTORC2'nin raptor ve riktor alt ünitelerinin ekspresyonlarının incelenmesi gereklidir.

Alzheimer hastalığı (AD) olan insan beyinlerinden elde edilen kanıtlarla, p-mTOR seviyelerinin ve downstream hedeflerinden ikisi olan p70S6K ve ökaryotik çeviri faktörü 4E'nin (eIF4E) yaş eşleştirilmiş kontrol vakalarına kıyasla arttığı ve AD olan insan beyinlerinde daha yüksek mTOR aktivitesinin bulunduğu gösterilmiştir (Chang ve ark., 2002; Lafay-Chebassier ve ark., 2005). Li ve arkadaşları (2005) AD vakalarında beyin medial temporal korteksinde Ser2481'de fosforile mTOR düzeylerinde kontrol grubuna göre 3 kat artış olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuçlar daha sonra fosfoSer2448-mTOR / toplam mTOR oranının AD'li beyinlerde kontrol vakalarına kıyasla ~2.6 kat daha yüksek olduğunu bildiren başka bir grup tarafından da tekrarlanmıştır (Griffin ve ark., 2005). İnsan beyni çalışmaları (Chang ve ark., 2002; Peel ve Bredesen, 2003; Onuki ve ark., 2004) ve hayvan modellerinde mTOR sinyallemesinin AD beyinlerinde arttığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda mTOR'un hipokampusün kornu ammonis bölgesindeki piramidal hücrelerin sitoplazmalarında orta yoğunlukta eksprese olduğu, dentat girüstaki hücrelerde ise daha zayıf bir ekspresyon sergilediği gözlemlendi. p-mTOR-Se2448'in ise nüklear immünreaksiyon gösterdiği belirlendi. Bu reaksiyonun Levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili sıçanların özellikle CA3 bölgesinde diğer gruplardakine göre daha zayıf olduğu gözlemlendi. Bu bulgulara paralel olarak çalışmamızda hipotiroidili grupta glikoz düşüklüğüne bağlı olarak AMPK'nın β ve γ düzenleyici alt birimlerinin, Levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidili grupta ise glikoz seviyesinde düşüklük olmaksızın AMPK'nın α katalitik alt biriminin aktive olduğunu gösteren bulgularımız, bu grupların hipokampusünde mTOR'un baskılanması gerektiğini düşündürdü. Western blot analiz sonuçlarımız hipotiroidili grupta p-mTOR-Se2448'un ekspresyon düzeyinin

diğer gruplara göre daha yüksek, mTOR düzeyinin ise kontrol grubu sıçanlarınkine yakın olduğunu gösterdi. Levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili sıçanların hipokampus örneklerinde mTOR ekspresyon düzeylerinin diğer gruplara göre en yüksek, p-mTOR-Se2448 düzeylerinin ise en düşük olduğu tespit edildi. mTOR ve p-mTOR-Se2448'in ekspresyon düzeyleri açısından gruplarası farklılıklar değerlendirildiğinde ise mTOR ekspresyonu açısından gruplar arasındaki farklılık önemsiz iken, p-mTOR-Se2448 ekspresyonunun hipotiroidili ve Levotiroksin ile tedavi edilmiş gruplar arasında anlamlı farklılık taşıdığı belirlendi ($P<0.05$). Bu bulgular AMPK bulguları ile birleştirildiğinde Levotiroksin ile tedavi edilmiş grupta aktive olan katalitik AMPK α 'nın mTOR'un fosforilasyonunu engellediğini, ancak hipotiroidili grupta aktive olan düzenleyici AMPK β ve AMPK γ 'nın mTOR'u baskılamakta yetersiz kaldığını göstermektedir. Nitekim önceki çalışmalarda glikoz yetersizliğinin AMPK'yi etkinleştirdiği ve mTORC2 sinyalini ve mTOR fosforilasyonunun AMPK'ye bağlı bir şekilde teşvik ettiği gösterilmiştir (Kazyken ve ark., 2019).

ULK1 ve ULK2, mitokondriyal hasar, enfeksiyon, proteotoksik stres veya çeşitli metabolik stres formlarına yanıt olarak indüklenen seçici ve seçici olmayan otofajide önemli roller oynar (Noda ve Fujioka, 2015). ULK1 aktivitesi yani fosforilasyonu mTORC1 tarafından düzenlenir, fakat mTORC1'den bağımsız olarak AMPK ile de aktive edilebilir (Akers ve ark., 2012). Besin / enerji tükenmesine yanıt olarak ULK1, birden fazla alt birimi fosforile ederek (Egan ve ark., 2015; Russell ve ark., 2013) ATG14-BECN1-VPS34 içeren PI3-kinaz kompleksini aktive eder ve böylece otofagozom şekillenme bölgelerine PI3P bağlayan proteinlerin taşınmasını sağlar. Bununla birlikte, metabolik stresin yokluğunda bile, ULK1 / ATG1 kompleksinin otofajiyi indükleyen aktivitesi, kargo reseptörleri ile etkileşim yoluyla hücre içi patojenleri ve yükü ortadan kaldırmak için uyarılabilir (Huang ve Brumell, 2014). Önceki çalışmalar memelilerde ULK1 ve ULK2'nin mTORC1 sinyal yolağında negatif etkisi olduğunu göstermiştir (Jung ve ark., 2011). ULK1 raptor ve mTOR ile besince zengin ortamda etkileşimde bulunmakta, ancak açlık durumunda bu etkileşim oldukça büyük bir oranda azalmaktadır (Hosokawa ve ark., 2009). Ayrıca ULK1, raptorun fosforilasyonu sağlar ve mTORC1'in kinaz aktivitesini inhibe eder (Jung ve ark., 2011). Spesifik amino asitlerin, büyüme faktörlerinin veya ATP'nin düşük konsantrasyonları, hipoksi, belirli protein agregatları ve endoplazmik retikulum stresi mTORC1'i baskılar, böylece ULK1 ve ULK2'yi aktive eder ve otofajiyi başlatır. Nöronlarda mTORC1'in

inaktivasyonu ile ULK1 ve ULK2'nin aktivasyonu, otofaji yerine protein sentezini destekleyen bu kompleksin aktivasyonu arasında geçiş yapmak sinaptik plastisite, dendritik arborizasyon ve miyelinizasyon gibi çeşitli nöronal fonksiyonları etkiler (Nixon, 2013).

ULK1 merkezi sinir sisteminde beyincikte ve hipokampüste yüksek düzeylerde eksprese edilir. ULK1 ve ULK2'nin beyinde eksikliğinin farelerde nörolojik defektler oluşturduğu özellikle hipokampüsün CA1 bölgesinin piramidal nöronlarda dejenerasyona neden olduğu gösterilmiştir (Joo ve ark., 2016). Sunulan çalışmada farelerdeki (Joo ve ark., 2016) benzer olarak sıçanlarda hipokampüsün kornu ammonis ve dentat girus bölgesinde ULK1'in ve p-ULK1-S556'nın tüm hücrelerde sitoplazmik ekspresyonu görüldü. Hipokampüsün kornu ammonis ve dentat girus bölgelerindeki ULK1 immünreaksiyonunun genel olarak hipotiroidili sıçanlarda daha yoğun olduğu, Levotiroksin ile tedavi edilmiş sıçanlarda ise diğer gruplara göre daha zayıf bir boyanmanın olduğu gözlemlendi. Hipotiroidili ve Levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidili gruptaki sıçanların hipokampüsünde p-ULK1-S556 immünreaksiyonunun genel olarak hipokampüs bölgelerinde kontrol grubuna göre daha zayıf olduğu tespit edildi. Western blot analiz sonuçlarına göre ULK1 ekspresyon düzeyinin hipotiroidili gruptaki sıçanların hipokampüsünde en yüksek, Levotiroksin ile tedavi edilmiş gruptaki hayvanlarda ise en düşük olduğu belirlendi. ULK1 ekspresyonu gruplar arasında karşılaştırıldığında kontrol grubu ile hipotiroidi grubu ve kontrol grubu ile Levotiroksin ile tedavi edilmiş grup arasında önemli farklılık gözlenmezken, Levotiroksin ile tedavi edilmiş gruptaki sıçanların hipokampüsünde ULK1 düzeyinin hipotiroidili gruptakinden önemli ölçüde daha düşük olduğu ($P<0.05$) tespit edildi. p-ULK1 düzeyinin ise Levotiroksin ile tedavi edilmiş grupta en düşük olduğu ve bu grup ile kontrol grubu arasındaki farklılığın önemli olduğu ($P<0.05$) belirlendi. Bu sonuçlar mTOR sonuçlarıyla birlikte ele alındığında hipotiroidili sıçanların hipokampüsünde mTOR'un ULK1'i baskıladığını yani ULK1'in aktive olmadığını göstermektedir. Levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili sıçanların hipokampüslerinde hem p-ULK1-S556 hem de ULK1 ekspresyonunun düşük olmasının nedeni açıklanamamış olup, başka bir proteinin veya sinyal yolağının etkili olabileceği ileri sürülebilir. Bu konunun daha detaylı araştırılması gerekmektedir. Bununla birlikte artan AMPK'nın glikoz yetersizliğinde ULK1'i aktive etmesi (Kim ve ark., 2011) beklenirken, glikoz yetersizliğinde mTOR

aktivitesinin fazla olması AMPK-ULK1 etkileşimini bozduğu için (Kim ve ark., 2011) hipotiroidili gruptaki sıçanların hipokampusünde ULK1'in aktive olmadığı söylenebilir.

Maya Atg6'nın memeli ortoloğu Beclin 1, hücre stresi dönemlerinde artan ve hücre döngüsü sırasında azalan, otofajide merkezi role sahip bir proteindir (Kang ve ark., 2011). Beclin-1 Bcl-2 homoloji (BH3) motif, çift kıvrımlı alan (CCD) ve evrimsel olarak korunmuş alan (ECD) olmak üzere tanımlanan bir çok proteinle etkileşimini sağlayan 3 bölge içerir (Kang ve ark., 2011). ECD Beclin 1'in otofajiye aracı olması ve tümörogenezinin baskılanması için gereklidir. Beclin 1 ayrıca, verimli nükleer dışı aktarma sinyalinin sorumlu olan kısa bir lörin açısından zengin amino asit dizisi içerir (NES). Beclin 1 NES'in mutasyonları, besin yoksunluğuna bağılı otofajiyi teşvik etme ve tümör oluşumunu baskılama yeteneklerini ortadan kaldırır (Liang ve ark., 2001). Beclin 1, otofagozom oluşumu ve otofajinin başlaması için gerekli olan Sınıf III Fosfatidilinositol 3-Kinaz Vps34 kompleksinin temel bir bileşeni olarak işlev görür (He ve Levine, 2010; Furuya ve ark., 2005). Beclin 1 ayrıca kendi kendine etkileşime girme yeteneğine sahiptir. Evrensel bir oligomerizasyon alanı olan CCD, Beclin 1'in kendi kendine etkileşimine ve dimer oluşumuna in vivo ve in vitro aracılık eder (Adi-Harel ve ark., 2010). Normal büyüme koşulları altında Beclin 1, çeşitli Bcl-2 aile üyelerine bağlanırken, Bcl-2'den ayrılması otofajiye aracılık eder (Pattingre ve ark., 2005.). Glikoz eksikliği sırasında AMPK, normal koşullarda otofajiyi inhibe eden p53'ü fosforile eder. Bu durumda p53 çekirdeğe taşınır ve DAPK1 gen ekspresyonunu indükler. DAPK1 Beclin 1'i fosforile eder ve Beclin 1'i çeşitli Bcl-2 aile üyelerinden ayırarak otofajinin indüksiyonuna neden olur (Moruno ve ark., 2012). Erlich ve arkadaşlarının (2006) yaptığı bir çalışmada travmatik beyin hasarı oluşturulan farelerde Beclin 1'in otofajinin bir indikatörü olduğu ve Beclin 1 ekspresyonunun korteks, serebellum ve hipokampusdeki astrositlerde ve nöronlarda arttığını göstermiştir. Yapılan başka bir araştırmada ise Beclin 1'in immün lokalizasyonunun farelerde, doğumdan sonraki gelişim süreci boyunca sitoplazmadan çekirdeğe progresif olarak geçiş yaptığı, açlık durumunda ise çekirdekten tekrar sitoplazmaya lokalize olduğu gösterilmiştir (Xu ve ark., 2017). Benzer olarak sunulan tez çalışmasında immünohistokimyasal analizde Beclin1'in hipokampusün kornu ammonis ve dentat girus bölgesindeki piramidal nöronların sitoplazmalarında lokalize olduğu belirlendi. Her üç gruptaki sıçanlarda hipokampus nöronlarında benzer hücresel lokalizasyon görülmesi nedeni ile hipotiroidili grupta glikoz seviyeleri düşük olsa bile Beclin 1'in sitoplazmik yerleşim

gösterdiği sonucuna varıldı. Erlich ve arkadaşları (2006) yüksek düzeyde Beclin 1 eksprese eden nöronal hücrelerin çekirdek morfolojisinde değişiklik meydana getirmeksizin hasarlanmış DNA'ya sahip olduğunu ancak Beclin 1 aşırı eksprese eden bu nöronların ölmeyeceğini rapor etmişlerdir. Bu yazarlar aynı zamanda yaralanma yerinde Beclin 1'in yükselmesinin hasarlı hücreleri azaltmak için gelişmiş otofajiyi temsil ettiğini bildirmişlerdir (Erlich ve ark., 2006). Ayrıca çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda Beclin 1'in aşırı ekspresyonunun nöronal hücre ölümünü önleyebildiği ve direkt veya indirekt olarak otofajik sinyal yolağı aracılığıyla toksik protein kümelerinin temizlenmesini sağlayabildiği gösterilmiştir (Spencer ve ark., 2009). Bu tez çalışmasında hipokampus nöronlarında kayda değer bir morfolojik hasar tespit edilmemiştir. Ancak özellikle Levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili gruptaki sıçanların hipokampuslerinde Beclin 1 ekspresyonunun yüksek olması, Erlich ve arkadaşlarının (2006) bildirdiğine benzer olarak hipotiroidi oluşumu sırasında hipokampus nöronlarında meydana gelen olası moleküler değişikliklerin tedavi ile düzeltilmesinde Beclin 1'in işlevinin olabileceği görüşünü akla getirmektedir.

Sequestosome-1 (SQSTM1) olarak da bilinen p62, otofaji için belirli kargoları hedefleyen bir faktördür (Rusten ve Stenmark, 2010). Otofajiyi sağlayan mekanizmalardan bazıları bozulduğunda, p62, ubiquitin içeren agregatlarla birikir. p62'nin genetik ablasyonu, hepatositlerde ve nöronlarda ubiquitin pozitif protein agregatlarının görünümünü baskılar, bu da p62'nin inklüzyon cisimciği oluşumunda önemli bir rol oynadığını gösterir (Komatsu ve ark., 2007). p62 / SQSTM1, otofaji ve sinyal verme gibi farklı hücresel işlemlerde merkezi bir iskele proteini görevi gören çok işlevli bir adaptör proteindir (Katsuragi ve ark., 2015). p62 kümelenme eğilimindedir ve insan hücrelerinde sıklıkla p62 cisimcikleri olarak bilinen ayrı noktacık şeklinde gözlemlenir (Lamark ve ark., 2003). Bu cisimlerin oluşumu, p62'nin amino-terminal PB1 alanına bağlıdır (Lamark ve ark., 2003) ve PB1 p62'nin kendisiyle oligomerizasyonunu sağlar (Rogov ve ark., 2014). PB1 alanları, otofaji, sinyal verme, hücre bölünmesi ve redoks süreçlerinde yer alan protein komplekslerinin yapılmasında kritik rollere sahip protein etkileşim modülleridir (Moscat ve ark., 2006). p62'nin otofajinin yanı sıra farklı hücresel sinyallerde görev yaptığı gösterilmiştir (Liu ve ark., 2016). Bir otofaji reseptörü olarak p62, kargo proteinlerini otofagozom membranı ile birleştirir. p62'nin PB1 aracılı oligomerizasyonu, seçici bir otofaji reseptörü olarak işlevi için gereklidir (Itakura ve Mizushima, 2011). p62'nin C-terminal UBA alanı,

ubiquitinlenmiş kargoyu yakalar ve LIR motifi, kargo-reseptör kompleksini otofagozomal membranın yüzeyine tutturulmuş olan LC3'e yönlendirir (Björkøy ve ark., 2005; Pankiv ve ark., 2007). p62'nin protein homeostazına katılımı nedeniyle, otofaji veya oksidatif stresin bozulması, p62'nin kümelenmesine veya artmasına neden olur (Carroll ve ark., 2018). Omurgalılarda p62, ubiquitin ve otofajinin LC3 bileşeni ile etkileşimi yoluyla protein agregatlarının ve mitokondri dahil hasarlı organellerin otofajik olarak uzaklaştırılmasını düzenler (Johansen ve Lamark, 2011). p62 aynı zamanda mTORC1 ile de ilişkilidir. p62 ekspresyonu bloke edildiğinde açlığa yanıt olarak mTORC1 inhibisyonu yoluyla otofajiyi aktive eder, çünkü p62, mTORC1'in pozitif bir düzenleyicisidir (Duran ve ark., 2011). Bu veriler erken otofajik yapıların protein agregatlarının yüzeyinde direkt olarak birleştiğini, ve buna p62 ve upstream Atg proteinleri arasındaki etkileşimin aracılık edebileceğini gösterir. Daha sonra LC3 takviyesiyle fagofor şekillenir, büyüyen çift membran p62, LC3 ve diğer Atg proteinlerin etkileşimi ile p62 içeren agregatı kaplar (Alemu ve ark., 2012). p62 genel olarak sitoplazmik yerleşim göstermekle birlikte çekirdekte de lokalize olur. p62'nin subselüler lokalizasyonunun karsinogenezle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Pankiv ve ark., 2010). Sunulan tez çalışmasında immünohistokimyasal bulgular p62'nin sıçan hipokampuslerinde kornu ammonis ve dentat girus nöronlarında homojen bir sitoplazmik boyanma sergilediği tespit edilmiştir. Hipotiroidili gruptaki sıçanların hipokampuslerinde p62'nin, kontrol ve Levotiroksin ile tedavi edilmiş hipotiroidili gruptaki sıçanların hipokampuslerindeki göre önemli derecede farklı bulunmadı ($P>0.05$). Bu bulgu her üç grupta p62'nin otofajiyi başlatacak kadar aktive olmadığını göstermektedir.

Otofaji, otofaji ile ilgili genlerin (atg) kontrollü ekspresyonunu içeren oldukça düzenlenmiş bir süreçtir. Otofagozomların oluşumunda, ilk olarak çift lipit membran şekillenir. Takiben erken fagoforun olgunlaşmasıyla otofagozoma dönüşür. Olgun otofagozom lipidlenmiş ATG mikrotübül ilişkili proteinler 1A/1B hafif zincir 3 proteinlerini (MAP1LC3, LC3) içerir. İnsanlarda LC3 ailesinin üç üyesi vardır: LC3A, LC3B ve LC3C, bunlardan LC3B, otofaji için bir belirteç ve genel otofajik akışı değerlendirmek için bir araç olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Baeken ve ark., 2020). LC3A ve LC3C'nin LC3B'ye benzer işlevlere sahip olduğu öne sürülmektedir, ancak sinyal transdüksiyonu veya viral replikasyon gibi otofaji ile ilişkili olmayan

fenomenlerde de rol oynayabilir (Subramani ve Malhotra 2013). Kesin moleküler etki biçimleri bilinmemektedir.

Mikrotübül ile ilişkili protein 1 hafif zincir 3 (LC3), ilk olarak, sıçan beyninden mikrotübül ile ilişkili protein 1A ve 1B şeklinde saflaştırılan bir protein olarak tanımlandı (Mann ve Hammarback, 1994). Bu protein tüm memeli dokularında ve hücre kültürlerinde bulunan ve moleküler ağırlığı yaklaşık 17 kDa olan çözünür bir proteindir. (Tanida ve ark., 2008). LC3-II miktarı, otofagozom oluşumunun iyi bir göstergesi olarak görev yapan otofagozomların sayısı ile yakından ilişkilidir (Kabeya ve ark., 2000). Ayrıca, LC3B, lipide edilmemiş (LC3B-I) ve lipide edilmiş (LC3B-II) formda mevcuttur. Sitoplazmada, deasetillenmiş LC3B-I, fosfatidiletanolamin ile konjugasyon yoluyla lipide edilir ve böylece LC3B-II'ye dönüştürülür ve bu da otofagozomlar tarafından toplanır. LC3A ve LC3C'nin benzer bir şekilde düzenlenip düzenlenmediği hala bilinmemektedir (Baeken ve ark., 2020). Otofajik kaskad için LC3B'nin hücresel yerleşimi detaylı incelenmesine karşın LC3A ve LC3C'nin subselüler yerleşimi hakkında az sayıda çalışma bulunmaktadır (Koukourakis ve ark., 2015). LC3C'nin sekretuar ve otofajik yolu birbirine bağladığı (Stadel ve ark., 2015), ayrıca ksenofajide ve mitokondrinin mitofaji için spesifik hedeflenmesinde rol oynadığı bildirilmiştir (von Muhlen ve ark., 2012). LC3A ve LC3C, Parkin'den bağımsız mitofaji yollarıyla ilişkilendirildiğinden LC3A'nın da mitofajide de rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (Mohan ve Wollert, 2018). Baeken ve arkadaşları (2020) insan primer fibroblast kültürlerinde LC3B'nin lokalizasyonunun çekirdekle sınırlı olduğunu, LC3A'nın sitoplazmada, LC3C'nin ise her iki kompartmanda da lokalize olduğunu göstermiştir. Sunulan çalışmada iki farklı otofagozom belirteci antikor (MAP1LC3A ve MAPLC3 α/β) kullanıldı. İmmunohistokimyasal bulgularımız tüm grupların hipokampuslerinde MAPLC3 α/β ve MAPLC3A'nın Baeken ve arkadaşları (2020) tarafından bildirilenlere benzer olarak CA bölgelerinde stratum piramidale katmanındaki ve dentat girusun granüler hücre katmanındaki nöronların sitoplazmalarında yerleştiğini gösterdi. MAPLC3 α/β ile boyanan bazı nöronlarda intranükleer boyanmanın bulunduğu görüldü. Sitoplazmik reaksiyonun kuvvetli ve homojen bir boyanma tarzında olduğu dikkat çekti. Bu bulgular LC3'ün nöronlarda yapısal olarak eksprese olduğunu göstermektedir.

Endojen LC3, SDS-PAGE ve immünoiblotlamayı takiben iki bant olarak tespit edilir. Bunlar: sitozolik olan LC3-I, diğeri ise fosfatidiletanolamin (PE) ile konjuge olan ve izole membranlarda, otofagozomlarda ve daha az olarak otolizozomlarda bulunan LC3-II'dir (Mizushima ve Yoshimori, 2007). LC3-II'nin moleküler ağırlığı, PE ilavesinden dolayı LC3-I'den daha fazla olmasına rağmen, LC3-II, SDS-PAGE'de muhtemelen aşırı hidrofobikliğinden dolayı LC3-I'den daha hızlı hareket eder. LC3-I 16 kDa civarında bir moleküler ağırlığa sahip iken LC3-II 14 kDa'dur. Çalışmamızın western blot analiz sonuçları tüm grupların sıçan hipokampuslerinde her iki antikoru yaklaşık 18 kDa moleküler ağırlığa sahip tek band olarak eksprese olduğunu gösterdi. Bulgularımıza benzer olarak Mann ve Hammarback (1994) sıçan beyin ekstraktlarında sadece 18 kDa ağırlığındaki LC3'ün ekspresyonunu bildirirken Kabeya ve arkadaşları (2000) sıçan beyinde 16 kDa ağırlığında LC3'ün düşük seviyelerde bulunduğunu buna karşılık 18 kDa ağırlığındaki LC3'ün daha fazla eksprese edildiğini belirtmişlerdir. Kabea ve arkadaşları (2020) ayrıca LC3'ün 18 kDa ve 16 kDa ağırlığına karşılık gelen formlarını LC3-I ve LC-II olarak adlandırmışlardır. Bu bilgilere dayanarak çalışmamızda saptanan 18 kDa ağırlığına karşılık gelen bandın LC3-I olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca western blot analiz sonuçlarımız her iki otofagozom belirtecinin ekspresyon düzeylerinin gruplar arası önemli farklılık taşımadığını gösterdi ($P>0.05$). Bu durumun sıçan hipokampusünde sadece LC3-I'in eksprese olması ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Özetle bulgularımız PTU'nun sıçanlarda primer hipotiroidizmi şekillendirdiğini, ancak glikoz seviyesini anlamlı olarak düşürmesine rağmen hipoglisemi oluşturmadığını ortaya koymaktadır. İmmünohistokimyasal sonuçlarımız otofaji ile ilişkili proteinlerin sıçan hipokampuslerinde yapısal olarak eksprese olduğunu göstermektedir. Western blot (WB) analiz sonuçları ise hipotiroidili grupta katalitik AMPK α 1/2'nin aktifleşmediğini, bu nedenle mTOR'un aktifleşmesini baskılamadığını, aktifleşen mTOR'un AMPK'nın ULK1 ile etkileşmesini önlediği ve dolayısı ile otofajiyi inhibe ettiğini kanıtlar niteliktedir. Ayrıca Beclin 1, LC3 ve p62'nin ekspresyon düzeylerinin gruplar arasında farklılık göstermemesi de otofajinin indüklenmediğinin önemli kanıtı olabilir. Levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidili grupta ise WB sonuçları katalitik AMPK'nın aktifleştiğini, bu nedenle mTOR'un aktifleşmediğini ortaya koymaktadır. Ancak bu grupta hem ULK1 ile p-ULK1-S556 ve hem de TSC2 ile p-TSC2-Thr1462 ekspresyonlarının zayıf olduğunun belirlenmesi bu konuyla ilgili detaylı çalışmaların

yapılmasını gerekli kılmaktadır. Sonuç olarak bu bulgular PTU ile indüklenmiş hipotiroidizmin otofaji ile ilişkili çeşitli proteinlerin ekspresyonlarını AMPK sinyal yolağı üzerinden önemli ölçüde değıştirmediğini göstermektedir.



6. KAYNAKLAR

- Adi-Harel S, Erlich S, Schmukler E, Cohen-Kedar S, Segev O, Mizrachy L, Hirsch JA, Pinkas-Kramarski R. Beclin 1 self-association is independent of autophagy induction by amino acid deprivation and rapamycin treatment. *J Cell Biochem*, 2010; 110(5): 1262-1271.
- Alemu EA, Lamark T, Torgersen KM, Birgisdottir AB, Larsen KB, Jain A, Olsvik H, Øvervatn A, Kirkin V, Johansen T. ATG8 family proteins act as scaffolds for assembly of the ULK complex: sequence requirements for LC3-interacting region (LIR) motifs. *J Biol Chem*, 2012; 287(47): 39275-39290
- Alers S, Löffler AS, Wesselborg S, Stork B. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol*, 2012; 32(1): 2-11.
- Alkalby JMA, Alzerjawi SJS. Effect of propylthiouracil-induced hypothyroidism on reproductive efficiency of adult male rats. *Basrah Journal of Veterinary Research*, 2013; 12(2):113-121.
- Alzoubi KH, Gerges NZ, Aleisa AM, Alkadhi KA. Levothyroxin restores hypothyroidism-induced impairment of hippocampus-dependent learning and memory: Behavioral, electrophysiological, and molecular studies. *Hippocampus*, 2009; 19(1): 66–78.
- Amaral D, Lavenex P. Hippocampal neuroanatomy. In: Anderson P, Morris R, Amaral, Bliss T, O'Keefe J (eds.), *The hippocampus book*. First edition, Oxford University Press, New York, 2007: 37.
- Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res*, 2007; 163: 3–22.

- Amato S, Liu X, Zheng B, Cantley L, Rakic P, Man HY. AMP-activated protein kinase regulates neuronal polarization by interfering with PI 3-kinase localization. *Science*, 2011; 332(6026): 247–251.
- Ambrogini P, Cuppini R, Ferri P, Mancini C, Ciaroni S, Voci A, Gerdoni E, Gallo G. Thyroid hormones affect neurogenesis in the dentate gyrus of adult rat. *Neuroendocrinology*, 2005; 81(4): 244–253.
- Artış S, Bitiktaş S, Taşkın E, Dolu N, Liman N, Süer 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*, 2012; 24(3): 422–433.
- Baeken MW, Weckmann K, Diefenthaler P, Schulte J, Yusifli K, Moosmann B, Behl C, Hajieva P. Novel Insights into the Cellular Localization and Regulation of the Autophagosomal Proteins LC3A, LC3B and LC3C. *Cells*, 2020; 9(10): 2315.
- Batrinou ML. The problem of exogenous subclinical hyperthyroidism. *Hormones (Athens)*, 2006; 5(2): 119–125.
- Bauer M, London ED, Rasgon N, Berman SM, Frye MA, Altshuler LL, Mandelkern MA, Bramen J, Voytek B, Woods R, Mazziotta JC, Whybrow PC. Supraphysiological doses of levothyroxine alter regional cerebral metabolism and improve mood in bipolar depression. *Mol Psych*, 2005; 10: 456–469.
- Bauer M, Schlagenhauf F, London E, Miller K, Whybrow PC, Rasgon N, van Herle KV, van Herle, AJ, Phelps ME, Silverman DHS. Effects of hypothyroidism on brain metabolism and its associations with neuropsychiatric impairments. *Endocrine Abstracts*, 2006; 11: 16.
- Bauer M, Silverman DH, Schlagenhauf F, London ED, Gist CL, van Herle K, Rasgon N, Martinez D, Miller K, van Herle A, Berman SM, Phelps ME, Whybro PC. Brain glucose metabolism in hypothyroidism: a positron emission tomography study before and after thyroid hormone replacement therapy. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009; 94(8): 2922–2929.
- Bayer SA. The rat nervous system: forebrain and midbrain(1st ed), In: George Paxinos, Sydney, Academic Press, 1985: 335–352.
- Bianco AC, da Conceição RR. The Deiodinase Trio and Thyroid Hormone Signaling. *Methods Mol Biol*, 2018; 1801: 67–83.

- Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev*, 2002; 23: 38–89.
- Biondi B, Palmieri EA, Klain M, Schlumberger M, Filetti S, Lombardi G. Subclinical hyperthyroidism: clinical features and treatment options. *Eur J Endocrinol*. 2005; 152(1): 1–9.
- Bizhanova A, Kopp P, the Sodium–iodide symporter nis and pendrin in iodide homeostasis of the thyroid, *Endocrinology*, 2009; 150(3): 1084–1090.
- Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, Stenmark H, Johansen T. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*, 2005; 171(4): 603–614.
- Bliss TV, Long–lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *Lomo T J Physiol*, 1973; 232(2): 331–356.
- Blommaert EF, Krause U, Schellens JP, Vreeling–Sindelarova H, Meijer AJ. The phosphatidylinositol 3–kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem*, 1997; 243(1–2): 240–246.
- Boelen A. Thyroid hormones and glucose metabolism: the story begins before birth. *Exp Physiol*, 2009; 94(10): 1050–1051.
- Brăslașu ED, Brădălan C, Cornilă M, SĂVULESCU I, Cojmăleală R, Brăslașu MC. Normal blood glucose in white wistar rat and its changes following anesthesia, *Lucrări Științifice Medicină Veterinară*, 2007; 40: 120–123.
- Brent GA, Mechanisms of thyroid hormone action. *The J Clin Invest*, 2011; 122(9): 3035–3043.
- Brent GA. Clinical practice. Graves' disease. *N Engl J Med*, 2008; 358(24): 2594–2605.
- Brent GA. Hypothyroidism and thyroiditis. In: Melmed SP, Larsen PR, Kronenberg HM. Philadelphia, PA. *Williams Textbook of Endocrinology*, Philadelphia, Elsevier, 2012: 416–448.
- Cakir S, Eren M, Senturk M, Sarica ZS. The Effect of Boron on Some Biochemical Parameters in Experimental Diabetic Rats. *Biol Trace Elem Res*, 2018; 184(1): 165–172.

- Canal CE, Stutz SJ, Cold PE. Glucose injections into the dorsal hippocampus or dorsolateral striatum of rats prior to T-maze training: modulation of learning rats and strategy selection. *Learn Mem*, 2005; 12(4): 367–374.
- Cao J, Pan Jinhong, Lin H, Davis F, Zhou M, Davis P. L-thyroxine attenuates pyramidal neuron excitability in rat acute prefrontal cortex slices. *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem*, 2011; 11: 152–156.
- Carageorgiou H, Pantos C, Zarros A, Stolakis V, Mourouzis I, Cokkinos D, Tsakiris S. Changes in acetylcholinesterase, Na⁺,K⁺–ATPase, and Mg²⁺–ATPase activities in the frontal cortex and the hippocampus of hyper- and hypothyroid adult rats, *Metabolism*, 2007; 56(8): 1104–1110.
- Carlé A, Pedersen IB, Knudsen N, Perrild H, Ovesen L, Laurberg P. Gender differences in symptoms of hypothyroidism: a population-based DanThyr study. *Clin Endocrinol* 2015; 83: 717–725.
- Carroll B, Otten EG, Manni D, Stefanatos R, Menzies FM, Smith GR, Jurk D, Kenneth N, Wilkinson S, Passos JF, Attems J, Veal EA, Teyssou E, Seilhean D, Millecamps S, Eskelinen EL, Bronowska AK, Rubinsztein DC, Sanz A, Korolchuk VI. Oxidation of SQSTM1/p62 mediates the link between redox state and protein homeostasis. *Nat Commun*, 2018; 9(1): 256.
- Chaker L, Bianco AC, Jonklaas J, Peeters RP. Hypothyroidism. *Lancet*, 2017; 390(10101): 1550–1562.
- Chang RC, Wong AK, Ng HK, Hugon J. Phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha (eIF2alpha) is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's disease, *Neuroreport*, 2002; 13: 2429–2432.
- Charles HE. Hypothyroidism can be given between meals with similar effectiveness at various times of the day. *Clin Thyroidol*, 2018; 30: 456–459.
- Chen C, Zhou Z, Zhong M, Zhang Y, Li M, Zhang L, Qu M, Yang J, Wang Y, Yu Z. Thyroid hormone promotes neuronal differentiation of embryonic neural stem cells by inhibiting STAT3 signaling through TRalpha1. *Stem Cells Dev*, 2012; 21: 2667–2681.
- Chen EJ, Kaiser CA. LST8 negatively regulates amino acid biosynthesis as a component of the TOR pathway. *J Cell Biol*, 2003; 161(2): 333–347.
- Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev*, 2010; 31(2): 139–170.

- Cherubini E, Miles R. The CA3 region of the hippocampus: how is it? What is it for? How does it do it? *Front Cell Neurosci*, 2015; 9: 19.
- Chintamani, "Friend or foe" of a thyroid surgeon?—the tubercle of zuckerkindl. *Indian J Surg*, 2013; 75(5): 337–338.
- Chong-Kopera H, Inoki K, Li Y, Zhu T, Garcia-Gonzalo FR, Rosa JL, Guan KL. TSC1 stabilizes TSC2 by inhibiting the interaction between TSC2 and the HERC1 ubiquitin ligase. *J Biol Chem*, 2006; 281(13): 8313-8316.
- Clausen N, Lins PE, Adamson U, Hamberger B, Efendić S. Counterregulation of insulin-induced hypoglycaemia in primary hypothyroidism. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1986; 111: 516–521.
- Cohen NJ, Ryan J, Hunt C, Romine L, Wszalek T, Nash C. Hippocampal system and declarative (relational) memory: Summarizing the data from functional neuroimaging studies. *Hippocampus*. 1999; 9: 83–98.
- Cooke GE, Mullally S, Correia N, O'Mara SM, Gibney J. Hippocampal volume is decreased in adults with hypothyroidism, *Thyroid*, 2014; 24(3): 433–440.
- Correia N, Mullally S, Cooke G, Tun TK, Phelan N, FeeneyJ, Fitzgibbon M, Boran G, O'Mara S, Gibney J. Evidence for a specific defect in hippocampal memory in overtand subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009; 94: 3789–3797.
- Cotman CW, Monaghan DT Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their properties. *Adv Exp Med Biol*. 1986; 203: 237–252.
- Crane PK, Walker R, Larson EB. Glucose levels and risk of dementia. *N Engl J Med*, 2013; 369(19): 1863–1864.
- Crossmon, G. A modification of Mallory's connective tissue stain with a discussion of the principles involved. *Anat Rec*, 1937; 69: 33-38.
- Crute BE, Seefeld K, Gamble J, Kemp BE, Witters LA. Functional domains of the alpha1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 1998; 273(52): 35347-35354.
- Cukierman–Yaffee T. The relationship between dysglycemia and cognitive dysfunction. *Curr Opin Invest Dr*, 2009; 10(1): 70–74.
- Culmsee C, Monnig J, Kemp BE, Mattson MP. AMP-activated protein kinase is highly expressed in neurons in the developing rat brain and promotes neuronal survival following glucose deprivation. *J Mol Neurosci*, 2001; 17(1): 45-58.

- D'Arezzo S, Incerpi S, Davis FB, Acconcia F, Marino M, Farias RN, Davis PJ. Rapid nongenomic effects of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine on the intracellular pH of L-6 myoblasts are mediated by intracellular calcium mobilization and kinase pathways. *Endocrinology*, 2004; 145(12): 5694–5703.
- Dasgupta B, Milbrandt J. AMP-activated protein kinase phosphorylates retinoblastoma protein to control mammalian brain development. *Dev Cell*, 2009; 16(2): 256–270.
- Dasgupta B, Milbrandt J. Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007; 104(17): 7217–7222.
- Davis PJ, Davis FB, Mousa SA, Luidens MK, Lin HY. Membrane receptor for thyroid hormone: physiologic and pharmacologic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2011; 51: 99–115.
- Davis PJ, Glinsky GV, Lin HY, Leith JT, Hercbergs A, Tang HY, Ashur-Fabian O, Incerpi S, Mousa SA. Cancer cell gene expression modulated from plasma membrane integrin $\alpha\beta 3$ by thyroid hormone and nanoparticulat. *Tetrac Front Endocrinol (Lausanne)*, 2014; 5: 240.
- Davis PJ, Goglia F, Leonard JL. Nongenomic actions of thyroid hormone. *Nat Rev Endocrinol*, 2016; 12(2): 111–121.
- de Jong FJ, den Heijer T, Viser TJ, de Rijke YB, Drexhage HA, Hofman A, Breteler MM. Thyroid hormones, dementia, and atrophy of the medial temporal lobe. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006; 91(7): 2569–2573.
- Dekeyzer S, De Kock I, Nikoubashman O, Vanden Bossche S, Van Eetvelde R, De Groote J, Acou M, Wiesmann M, Deblaere K, Achten E. "Unforgettable" – a pictorial essay on anatomy and pathology of the hippocampus. *Insights Imaging*, 2017; 8(2): 199–212.
- Dentice M, Salvatore D. Deiodinases: the balance of thyroid hormone: local impact of thyroid hormone inactivation. *J Endocrinol*. 2011; 209(3): 273–282.
- Denver RJ, Hu F, Scanlan TS, Furlow JD. Thyroid hormone receptor subtype specificity for hormone-dependent neurogenesis in *Xenopus laevis*. *Dev Biol*, 2009; 326: 155–168.
- Desouza LA, Ladiwala U, Daniel SM, Agashe S, VaidyaRA, Vaidya VA. Thyroid hormone regulates hippo-campal neurogenesis in the adult rat brain. *Mol Cell Neuro Sci*, 2005; 29: 414–426.

- Dibble CC, Elis W, Menon S, Qin W, Klekota J, Asara JM, Finan PM, Kwiatkowski DJ, Murphy LO, Manning BD. TBC1D7 is a third subunit of the TSC1-TSC2 complex upstream of mTORC1. *Mol Cell*, 2012; 47(4): 535-546.
- Dohán O, De la Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, Ginter CS, Carrasco N. The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocr Rev*. 2003; 24(1): 48–77.
- Donzelli R, Colligiani D, Kusmic C, Sabatini M, Lorenzini L, Accorroni A, Nannipieri M, Saba A, Iervasi G, Zucchi R. Effect of Hypothyroidism and Hyperthyroidism on Tissue Thyroid Hormone Concentrations in Rat. *Eur Thyroid J*, 2016; 5(1): 27-34.
- dos Reis EA, de Oliveira LS, Lamers ML, Netto CA, Wyse AT Arginine administration inhibits hippocampal Na(+),K(+)-ATPase activity and impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats, *Brain Res*, 2002; 951(2): 151–157.
- Doubleday AR, Sippel RS. Hyperthyroidism. *Gland Surg*, 2020; 9(1): 124–135.
- D'Udine B, Gozzo S. Archicortex and neocortex in the precocial murid *Acomys cahirinus*. A comparison with two altricial species: *Mus musculus* and *Rattus norvegicus*. *Int J Neurosci*. 1983; 20(3–4): 255–263.
- Duran A, Amanchy R, Linares JF, Joshi J, Abu-Baker S, Porollo A, Hansen M, Moscat J, Diaz-Meco MT. p62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway. *Mol Cell*, 2011; 44: 134–146.
- Egan DF, Chun MG, Vamos M, Zou H, Rong J, Miller CJ, Lou HJ, Raveendra-Panickar D, Yang CC, Sheffler DJ, Teriete P, Asara JM, Turk BE, Cosford ND, Shaw RJ. Small molecule inhibition of the autophagy kinase ULK1 and identification of ULK1 substrates. *Mol Cell*. 2015; 59(2): 285-297.
- Elias MF, Goodell AL, Waldstein SR. Obesity, cognitive functioning and dementia: back to the future, *J Alzheimer's Dis*, 2012; 30(2): 113–125.
- Elkalawy S, Abo-Elnour R, El DD, Yousry, M. Histological and immunohistochemical study of the effect of experimentally induced hypothyroidism on the thyroid gland and bone of male albino rats. *The Egyptian Journal of Histology*. 2013; 36: 92-102.
- Epp JR, Chow C, Galea LA. Hippocampus-dependent learning influences hippocampal neurogenesis. *Front Neurosci*, 2013; 7: 57.

- Erickson EJ, Watts KD, Parent MB. Septal co-infusions of glucose with a GABAB agonist impair memory. *Neurobiol Learn Mem*, 2006; 85(1): 66–70.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn A, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH, Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*, 1998; 4: 1313–1317.
- Erlich S, Shohami E, Pinkas-Kramarski R. Neurodegeneration induces upregulation of Beclin 1. *Autophagy*, 2006; 2(1): 49–51.
- Fan XY, Tian C, Wang H, Xu Y, Ren K, Zhang BY, Gao C, Shi Q, Meng G, Zhang LB, Zhao YJ, Shao QX, Dong XP. Activation of the AMPK-ULK1 pathway plays an important role in autophagy during prion infection. *Sci Rep*, 2015 ; 5: 14728.
- Farid NR, Szkudlinski MW. Minireview: structural and functional evolution of the thyrotropin receptor. *Endocrinology*, 2004; 145(9): 4048–4057.
- Fernández-Lamo I, Montero-Pedrazula A, Delgado-García JM, Guadaño-Ferraz A, Gruart A. Effects of thyroid hormone replacement on associative learning and hippocampal synaptic plasticity in adult hypothyroid rats. *Eur J Neurosci*, 2009; 30(4): 679–692.
- Ferreira E, Silva AE, Serakides R, Gomes AES, Cassali GD. Model of induction of thyroid dysfunctions in adult female mice. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 2007; 59(5): 1245–1249.
- Filimonoff IN. A rational subdivision of the cerebral cortex. *Arch Neurol Psychiatry*, 1947; 58: 296–311.
- Flamant F, Gauthier K. Thyroid hormone receptors: the challenge of elucidating isotype-specific functions and cell-specific response. *Biochim Biophys Acta*, 2013 1830(7): 3900–3907.
- Fox CS, Pencina MJ, D'Agostino RB, Murabito JM, Seely EW, Pearce EN, Vasan RS. Relations of thyroid function to body weight: cross-sectional and longitudinal observations in a community-based sample. *Arch Intern Med*, 2008; 168: 587–592.
- Fundaro A. Behavioral modifications in relation to hypothyroidism and hyperthyroidism in adult rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 1989; 13(6): 927–940.

- Furuya N, Yu J, Byfield M, Pattingre S, Levine B. The evolutionarily conserved domain of Beclin 1 is required for Vps34 binding, autophagy and tumor suppressor function. *Autophagy*, 2005; 1(1): 46-52.
- Fusco, S., Pani, G. Brain response to calorie restriction. *Cell Mol Life*, 2013; 70(17): 3157–3170.
- Ganguli M, Burmeister LA, Seaberg EC, Belle S, DeKosky ST. Association between dementia and elevated TSH: a community-based study. *Biol Psychiatr*, 1996; 40: 714-725.
- Ganley, IG, Lam du H, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy, *J Biol Chem*, 2009; 284(18): 12297–12305.
- Gereben B, Zavacki AM, Ribich S, Kim BW, Huang SA, Simonides WS, Zeöld A, Bianco AC. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr Rev*, 2008; 29(7): 898–938.
- Gereben B, Zeöld A, Dentice M, Salvatore D, Bianco AC. Activation and inactivation of thyroid hormone by deiodinases: local action with general consequences. *Cell Mol Life Sci*, 2008; 65(4): 570–590.
- Gerges NZ, Alzoubi KH, Park CR, Diamond DM, Alkadhi KA. Adverse effect of the combination of hypothyroidism and chronic psychosocial stress on hippocampus-dependent memory in rats. *Behavioural Brain Research*, 2004; 155: 77–84.
- Gershengorn MC. Thyrotropin-releasing hormone receptor: cloning and regulation of its expression, in: bardin cw. *Recent Progress in Hormone Research*, Academic Press, 1993: 341–363.
- Gilbert ME, Rovet J, Chen Z, Koibuchi N. Developmental thyroid hormone disruption: prevalence, environmental contaminants and neurodevelopmental consequences. *Neurotoxicology*, 2012; 33: 842–852.
- Gilbert ME. Alterations in synaptic transmission and plasticity in area CA1 of adult hippocampus following developmental hypothyroidism. *Brain Res Dev Brain Res*, 2004; 148(1): 11–18.
- Gillian EC, Sinead M, Neuman C, Shane MO, James G. Hippocampal Volume Is Decreased in Adults with Hypothyroidism. *Thyroid*, 2014; 24(3): 433-440.

- Godini A, Ghasemi A, Zahediasl S. The Possible Mechanisms of the Impaired Insulin Secretion in Hypothyroid Rats. *PLoS One*, 2015; 10(7): e0131198.
- Gold PE. Role of glucose in regulating the brain and cognition. *Am J Clin Nutr*, 1995; 61(4): 987–995.
- 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.
- Griffin RJ, Moloney A, Kelliher M, Johnston JA, Ravid R, Dockery P, O'Connor R, O'Neill C. Activation of Akt/PKB, increased phosphorylation of Akt substrates and loss and altered distribution of Akt and PTEN are features of Alzheimer's disease pathology. *J Neurochem*, 2005; 93: 105–117.
- Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk, BE, Shaw RJ. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*, 2008; 30(2): 214–226.
- Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, Mitra K, Sougrat R, Kim PK, Lippincott-Schwarz J. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell*, 2010; 141(4): 656–667.
- Hall J, Gonder-Frederick LA, Chewning WW, Silveira J, Gold PE. Glucose enhancement of performance on memory tests in young and aged human. *Neuropsychologia*. 1989; 27(9): 1129–1138.
- Hammes SR, Davis PJ. Overlapping nongenomic and genomic actions of thyroid hormone and steroids. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2015; 29(4): 581–593.
- Hang XW, Yang RI, Zhao ZY, Ji C, Yang RW. Mechanism for apoptosis of hippocampus neuron induced by hypothyroidism in perinatal rats. *Zhejiang Da Xue Bao yi Xue Ban.*, 2005; 34(4): 298-303.
- Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J, Yonezawa K. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*, 2002; 110(2): 177-189.
- Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, 2006; 441(7095): 885–889.

- Hardie DG, Hawley SA. AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *Bioessays*, 2001; 23(12): 1112–1119.
- Hardie DG. AMP-activated protein kinase—an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev*, 2011; 25(18): 1895–1908.
- Harper ME, Seifert EL. Thyroid hormone effects on mitochondrial energetics. *Thyroid*. 2008; 18: 145–156.
- He C, Levine B. The Beclin 1 interactome. *Curr Opin Cell Biol*, 2010; 22(2): 140–149.
- Hestings NB, Tanapat P, Gould E. Neurogenesis in the adult mammalian brain. *Clin Neurosci Res*, 2001; 1 (3): 175–182.
- Hicks M, Wong LS, Day RO. Antioxidant activity of propylthiouracil. *Biochem Pharmacol*, 1992; 43(3):439–444.
- Hidayat M, Khaliq S, Khurram A, Lone K. Protective effects of melatonin on mitochondrial injury and neonatal neuron apoptosis induced by maternal hypothyroidism. *Melatonin Res*, 2019; 2(4): 42–60.
- Hodin RA, Lazar MA, Wintman BI, Darling DS, Koenig RJ, Larsen PR, Moore DD, Chin WW. Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific, *Science (New York, N.Y.)* 1989; 244(4900): 76–79.
- Hoffman SJ, Vasko-Moser J, Miller WH, Lark MW, Gowen M, Stroup G. Rapid inhibition of thyroxine-induced bone resorption in the rat by an orally active vitronectin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002; 302(1): 205–211.
- Hogervorst E, Huppert F, Matthews FE, Brayne C. Thyroid function and cognitive decline in the mrc cognitive function and ageing study. *Psychoneuroendocrinology*, 2008; 33(7): 1013–1022.
- Holdsworth CD, Besser GM. Influence of gastric emptying-rate and of insulin response on oral glucose tolerance in thyroid disease. *Lancet*, 1968; 2(7570): 700–702.
- Holt AB, Renfree MB, Chek DB. Comparative aspects of brain growth: a critical evaluation of mammalian species used in brain growth research with emphasis on the Tammar wallaby. In: Hetzel BS, Smith RM, eds. *Fetal brain disorders. Recent approaches to the problem of mental deficiency*. Amsterdam: Elsevier/North, Holland; 1981: 17–43.
- Hoogeveen-Westerveld M, van Unen L, van den Ouweland A, Halley D, Hoogeveen A, Nellist M. The TSC1-TSC2 complex consists of multiple TSC1 and TSC2 subunits. *BMC Biochem*, 2012; 13: 18.

- Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, Guan JL, Oshiro N, Mizushima N. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell*, 2009; 20(7): 1981-1991.
- Hou X, Watzlawik JO, Fiesel FC, Springer W. Autophagy in parkinson's disease. *J Mol Biol*, 2020; 432(8): 2651-2672.
- Hoyland A, Lawton CL, Dye L. Acute effects of macronutrient manipulations on cognitive test performance in healthy young adults: a systematic research review. *Neurosci Biobehav*, 2008; Rev, 32(1): 72–85.
- <http://braininfo.rprc.washington.edu/centraldirectory.aspx?type=a&ID=2336>, erişim tarihi: 20.12.2020
- http://cmbn-navigator.uio.no/rat_hippocampus_atlas/Structures/CA1.html, Erişim tarihi: 21.12.2020
- <https://aaushi.info/A14084>, Erişim tarihi: 20.01.2021
- https://en.wikipedia.org/wiki/Hippocampus_anatomy
- https://en.wikipedia.org/wiki/Hippocampus_anatomy, Erişim tarihi: 30.12.2020
- <https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/hippocampus-structure-and-functions>, Erişim tarihi: 21.12.2020
- <https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/hippocampus-structure-and-functions>, Erişim tarihi: 21.12.2020
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK285549>, Erişim tarihi: 21.01.2021
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551611/>, Erişim tarihi: 21.01.2021
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551659/>, Erişim tarihi: 21.01.2021
- Huang J, Brumell JH. Bacteria-autophagy interplay: a battle for survival. *Nat Rev Microbiol*. 2014 Feb;12(2):101-114.).
- Huang J, Dibble CC, Matsuzaki M, Manning BD. The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. *Mol Cell Biol*, 2008; 28(12): 4104-4115.
- Huang SA. Physiology and pathophysiology of type 3 deiodinase in humans. *Thyroid*, 2005; 15: 875–881.
- Hudson ER, Pan DA, James J, Lucocq JM, Hawley SA, Green KA, Baba O, Terashima T, Hardie DG. A novel domain in AMP-activated protein kinase causes

- glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias. *Curr Biol*, 2003; 13(10): 861-866.
- Hugo E. Endokrin Bezler, In: Reece WO, Dukes Veteriner Fizyoloji, 12. baskı, Medipres, Malatya, 2008: 632.
- Hwang JH, Jung HW, Kang SY, Kang AN, Ma JN, Meng XL, Hwang MS, Park YK. Therapeutic effects of acupuncture with MOK, a polyherbal medicine, on PTU-induced hypothyroidism in rats. *Exp Ther Med*, 2018; 16(1): 310-320.
- Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, 2003; 115(5): 577–590.
- Iseli TJ, Walter M, van Denderen BJ, Katsis F, Witters LA, Kemp BE, Michell BJ, Stapleton D. AMP-activated protein kinase beta subunit tethers alpha and gamma subunits via its C-terminal sequence (186-270). *J Biol Chem*, 2005; 280(14): 13395-13400.
- Ishizuka N, Weber J, Amaral DG. Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J Comp Neurol*, 1990; 295(4): 580–623.
- Itakura E, Mizushima N. p62 Targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding. *J Cell Biol*, 2011;192(1): 17-27.
- Iwen KA, Schroder E, Brabant G. Thyroid hormone and the metabolic syndrome. *Eur Thyroid J*, 2013; 2: 83–92.
- Jahagirdar V, McNay EC. Thyroid hormone's role in regulating brain glucose metabolism and potentially modulating hippocampal cognitive processes. *Metab Brain Dis*, 2012; 27(2): 101–111.
- Jiang M, Swann JW. Expression of claretinin indiverse neuronal populations during development of rat hippocampus. *Neuroscience*, 1997; 81: 1137–1154.
- Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*, 2011; 7: 279–296
- John DB, Harry CC. Manual of Histological Techniques and Their Diagnostic Application. New York : Churchill Livingstone, Edinburgh, 1994: 102-103
- Joo JH, Wang B, Frankel E, Ge L, Xu L, Iyengar R, Li-Harms X, Wright C, Shaw TI, Lindsten T, Green DR, Peng J, Hendershot LM, Kilic F, Sze JY, Audhya A, Kundu M. The Noncanonical Role of ULK/ATG1 in ER-to-Golgi trafficking is essential for cellular homeostasis. *Mol Cell*, 2016; 62(6): 982.

- Jung CH, Seo M, Otto NM, Kim DH. ULK1 inhibits the kinase activity of mTORC1 and cell proliferation. *Autophagy*, 2011; 7(10): 1212-1221.
- Just W, Alexander A, Walker CL. The role of LKB1 and AMPK in cellular responses to stress and damage. *FEBS Letters*, 2011; 585(7): 952–957.
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*, 2000; 19: 5720-5728.
- Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab*, 2005; 1(1): 15–25.
- Kalra S, Unnikrishnan AG, Sahay R. The hypoglycemic side of hypothyroidism, *Indian J Endocrinol Metab*, 2014; 18(1): 1–3.
- Kamal A, Spoelstra K, Biessels GJ, Urban IJA, Gispen WH. Effects of changes in glucose concentration on synaptic plasticity in hippocampal slices. *Brain Res*, 1999; 824(2): 238–242.
- Kamilaris TC, DeBold CR, Pavlou SN, Island DP, Hoursanidis A, Orth DN. Effect of altered thyroid hormone levels on hypothalamic–pituitary–adrenal function. *J Clin Endocrinol Metab*, 1987; 65(5): 994–999.
- Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ*, 2011; 18(4): 571-580
- Kapoor R, Desouza LA, Nanavaty IN, Kernie SG, Vaidya VA. Thyroid hormone accelerates the differentiation of adult hippocampal progenitors. *J Neuroendocrinol*, 2012; 24: 1259–1271.
- Kapoor R, Fanibunda SE, Desouza LA, Guha SK, Vaidya VA. Perspectives on thyroid hormone action in adult neurogenesis. *J Neurochem*, 2015; 133: 599–616.
- Katsuragi Y, Ichimura Y, Komatsu M. p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. *Febs J*, 2015; 282(24): 4672-4678.
- Katz HP, Youlton R, Kaplan SL, Grumbach MM. Growth and growth hormone. 3. Growth hormone release in children with primary hypothyroidism and thyrotoxicosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 1969; 29(3): 346–351.

- Kaushik S, Rodríguez-Navarro JA, Arias E, Kiffin R, Sahu S, Schwartz GJ, Cuervo AM, Singh R. Autophagy in hypothalamic AgRP neurons regulates food intake and energy balance. *Cell Metab*, 2011; 14(2): 173–183.
- Kazyken D, Magnuson B, Bodur C, Acosta-Jaquez HA, Zhang D, Tong X, Barnes TM, Steinl GK, Patterson NE, Altheim CH, Sharma N, Inoki K, Cartee GD, Bridges D, Yin L, Riddle SM, Fingar DC. AMPK directly activates mTORC2 to promote cell survival during acute energetic stress. *Sci Signal*, 2019; 12(585): eaav3249
- Keith CT, Schreiber SL. PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints. *Science*, 1995; 270(5233): 50-1.
- Kempermann G, Gage FH. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Novartis Found Symp*, 2000; 231: 220–235.
- Kerti L, Witte AV, Winkler A, Grittner U, Rujescu D, Flöel A. Higher glucose levels associated with lower memory and reduced hippocampal microstructure. *Neurology*, 2013; 81(20): 1746–1752.
- Kihara A, Noda T, Ishihara N, Ohsumi Y. Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, 2001; 152(3): 519–530.
- Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*, 2011; 13(2): 132–141.
- Kim SM, Kim SC, Chung IK, Cheon WH, Ku SK. Antioxidant and Protective Effects of *Bupleurum falcatum* on the L-Thyroxine-Induced Hyperthyroidism in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012; 2012: 578497.
- Klingenberg M, Winkler E. Reconstitution of an H⁺ translocator, the "uncoupling protein" from brown adipose tissue mitochondria, in phospholipid vesicles. *Methods Enzymol*. 1986; 127: 772–779.
- Knudsen N, Laurberg P, Rasmussen LB, Bulow I, Perrild H, Ovesen L, Jorgensen T. Small differences in thyroid function may be important for body mass index and the occurrence of obesity in the population. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005; 90: 4019–4024.
- Kobayashi S, Xu X, Chen K, Liang Q. Suppression of autophagy is protective in high glucose-induced cardiomyocyte injury. *Autophagy*, 2012; 8(4): 577–592.

- Kodl CT, Seaquist ER. Cognitive dysfunction and diabetes mellitus. *Endocrine Reviews*, 2008; 29(4): 494–511.
- Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*, 2006; 441(7095): 880–884.
- Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata J, Ezaki J, Murata S, Hamazaki J, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Yanagawa T, Uwayama J, Warabi E, Yoshida H, Ishii T, Kobayashi A, Yamamoto M, Yue Z, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*, 2007; 131(6): 1149–1163.
- Koromilas C, Liapi C, Schulpis KH, Kalafatakis K, Zarros A, Tsakiris S. Structural and functional alterations in the hippocampus due to hypothyroidism. *Metab Brain Dis*, 2010; 25(3): 339–354.
- Koukourakis MI, Kalamida D, Giatromanolaki A, Zois CE, Sivridis E, Pouliliou S, Mitrakas A, Gatter KC, Harris AL. Autophagosome Proteins LC3A, LC3B and LC3C Have Distinct Subcellular Distribution Kinetics and Expression in Cancer Cell Lines. *PLoS One*, 2015; 10(9): e0137675.
- Krebs–Kraft DL, Parent MB. Hippocampal infusions of glucose reverse memory deficits produced by co–infusions of a GABA receptor agonist. *Neurobiol Learn Mem*, 2008; 89(2): 142–152.
- Kuiper GG, Kester MH, Peeters RP, Visser TJ. Biochemical mechanisms of thyroid hormone deiodination. *Thyroid*, 2005; 15: 787–798.
- Kulikov A, Torr sani J, Jeanningros R. Experimental hypothyroidism increases immobility in rats in the forced swim paradigm. *Neurosci Lett*, 1997; 234(2–3): 111–114.
- Kurtoglu S, Tutu  A, Aydin K, Gen  E,  aksen H. Persistent neonatal hypoglycemia: An unusual finding of congenital hypothyroidism. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 1998; 11:277–279.
- Lafay-Chebassier C, Paccalin M, Page G, Barc-Pain S, Perault-Pochat MC, Gil R, Pradier L, Hugon J. mTOR/p70S6k signalling alteration by Abeta exposure as

- well as in APP-PS1 transgenic models and in patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 2005; 94(1): 215-25.).
- Lalli E, Sassone-Corsi P. Thyroid-stimulating hormone (TSH)-directed induction of the CREM gene in the thyroid gland participates in the long-term desensitization of the TSH receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995; 92(21): 9633-9637.
- Lamark T, Perander M, Outzen H, Kristiansen K, Øvervatn A, Michaelsen E, Bjørkøy G, Johansen T. Interaction codes within the family of mammalian Phox and Bem1p domain-containing proteins. *J Biol Chem*, 2003; 278(36): 34568-34581.
- Laureno R. Neurologic manifestations of thyroid disease. *The Endocrinologist*, 1996; 6: 467-473.
- Lavenex P, Amaral DG. Hippocampal-neocortical interaction: A hierarchy of associativity. *Hippocampus*, 2000; 10: 420-430.
- Lavenex P, Suzuki WA, Amaral DG. Perirhinal and parahippocampal cortices of the macaque monkey: Projections to the neocortex. *J Neurol*, 2002; 249: 394-420.
- Legrand J. Effects of thyroid hormones on Central Nervous System. In: Yanai J, ed. *Neurobehavioral Teratology*, Amsterdam: Elsevier Science Publishers, Holland, 1984: 331-363.
- Lesmana R, Sinha RA, Singh BK, Zhou J, Ohba K, Wu Y, Yau WW, Bay BH, Yen PM. Thyroid hormone stimulation of autophagy is essential for mitochondrial biogenesis and activity in skeletal muscle. *Endocrinology*, 2016; 157(1): 23-38.
- Li X, Alafuzoff I, Soininen H, Winblad B, Pei JJ. Levels of mTOR and its downstream targets 4E-BP1, eEF2, and eEF2 kinase in relationships with tau in Alzheimer's disease brain. *Febs J*. 2005; 272(16):4211-4220.
- Liang XH, Yu J, Brown K, Levine B. Beclin 1 contains a leucine-rich nuclear export signal that is required for its autophagy and tumor suppressor function. *Cancer Res*, 2001; 61(8): 3443-3449.
- Liman N. Endokrin Sistem, In: Özer A, Veteriner Özel Histoloji, İkinci baskı, Nobel Yayın, Ankara, 2010: 95-96.
- Lin HY, Sun M, Tang HY, Lin C, Luidens MK, Mousa SA, Incerpi S, Drusano GL, Davis FB, Davis PJ. L-Thyroxine vs. 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and cell

- proliferation: activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009; 296(5): 980–991.
- Lin SC, Hardie DG. AMPK: Sensing Glucose as well as Cellular Energy Status. *Cell Metab*, 2018; 27(2): 299-313.
- Liu J, Li L. Targeting Autophagy for the Treatment of Alzheimer's Disease: Challenges and Opportunities. *Front Mol Neurosci*. 2019; 12: 203.
- Liu WJ, Ye L, Huang WF, Guo LJ, Xu ZG, Wu HL, Yang C, Liu HF. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cell Mol Biol Lett*. 2016; 21: 29.
- Liu YY, Brent GA. Thyroid hormone crosstalk with nuclear receptor signaling in metabolic regulation. *Trends Endocrinol Metab*, 2010; 21: 166–173.
- Liu YY, Kogai T, Schultz JJ, Mody K, Brent GA. Thyroid hormone receptor isoform-specific modification by small ubiquitin-like modifier (SUMO) modulates thyroid hormone-dependent gene regulation. *J Biol Chem*, 2012; 287: 36499–36508.
- Liu ZW, Masterson L, Fish B, Jani P, Chatterjee K. Thyroid surgery for Graves' disease and Graves' ophthalmopathy. *Cochrane Database Syst Rev*, 2015; 11: CD010576.
- Loewith R, Jacinto E, Wullschlegel S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, Oppliger W, Jenoe P, Hall MN. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell*, 2002; 10(3): 457-468.
- Long X, Lin Y, Ortiz-Vega S, Yonezawa K. & Avruch, J. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr Biol*, 2005; 15: 702–713.
- Long X, Ortiz-Vega S, Lin Y, Avruch J. Rheb binding to mammalian target of rapamycin (mTOR) is regulated by amino acid sufficiency. *J Biol Chem*, 2005; 280(25): 23433-23436.
- Lou D, Griffith N, Noonan DJ. The tuberous sclerosis 2 gene product can localize to nuclei in a phosphorylation-dependent manner. *Mol Cell Biol Res Commun*, 2001; 4: 374–380
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193(1): 265-275.

- Ma T, Chen Y, Vingtdeux V, Zhao H, Viollet B, Marambaud P, Klann E. Inhibition of AMP-activated protein kinase signaling alleviates impairments in hippocampal synaptic plasticity induced by amyloid beta. *J Neurosci*, 2014; 34(36): 12230–12238.
- Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nature Rev Mol Cell Biol*, 2009; 10: 307–318.
- Madeira MD, Cadete-Leite A, Andrade JP, Paula-Barbosa MM. Effects of hypothyroidism upon the granular layer of the dentate gyrus in male and female adult rats: morphometric study. *J Comp Neurol*, 1991; 314:171–186.
- 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: 501–518.
- Maheshwar MM, Cheadle JP, Jones AC, Myring J, Fryer AE, Harris PC, Sampson JR. The GAP-related domain of tuberin, the product of the TSC2 gene, is a target for missense mutations in tuberous sclerosis. *Hum Mol Genet*, 1997; 6(11): 1991–1996.
- Mainardi M, Fusco S, Grassi C. Modulation of hippocampal neural plasticity by glucose-related signaling. *Neural Plasticity*, 2015; (1): 10.
- Mann SS, Hammarback JA. Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B. *J Biol Chem*, 1994; 269(15): 11492–11497.
- Manning CA, Stone WS, Korol DL, Gold PE. Glucose enhancement of 24-h memory retrieval in healthy elderly humans. *Behavioural Brain Research*, 1998; 93(1–2): 71–76.
- Manuchehri AM, The Impact of Thyroid Dysfunction on Cardiovascular Risk, Doktor Tezi, the University of Hull, 2008: 4
- Margolis RN. The Nuclear Receptor Signaling Atlas: catalyzing understanding of thyroid hormone signaling and metabolic control. *Thyroid*, 2008; 18(2): 113–122.
- Marsili A, Zavacki AM, Harney JW, Larsen PR. Physiological role and regulation of iodothyronine deiodinases: a 2011 update. *J Endocrinol Invest*. 2011; 34(5):395–407.

- Martin JH. Lymbic system and cerebral circuits for emotions, learning, and memory. In: Michael W, Peter JB. *Neuroanatomy: text and atlas* (fifth ed.). McGraw–Hill Medical, New York, 2003: 382.
- Maruyama R, Goto K, Takemura G, Ono K, Nagao K, Horie T, Tsujimoto A, Kanamori H, Miyata S, Ushikoshi H, Nagashima K, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. Morphological and biochemical characterization of basal and starvation–induced autophagy in isolated adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008; 295(4): 1599–1607.
- McCulloch AJ, Johnston DG, Baylis PH, Kendall–Taylor P, Clark F, Young ET, Alberti KG. Evidence that thyroid hormones regulate gluconeogenesis from glycerol in man. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1983; 19(1): 67–76.
- McDaniel HG, Pittman CS, Oh SJ, DiMauro S. Carbohydrate metabolism in hypothyroid myopathy. *Metabolism*, 1977; 26(8): 867–873.
- Melmed S, Chapter 15 – Hypothalamic–Pituitary Regulation, In: Conn PM, Conn's *Translational Neuroscience*, Academic Press, 2017: 317–331.
- Mihalova MM, Shaw RJ. The AMP–activated protein kinase (AMPK) signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol*, 2012; 13(9): 1016–1023.
- Mitchelhill KI, Michell BJ, House CM, Stapleton D, Dyck J, Gamble J, Ullrich C, Witters LA, Kemp BE. Posttranslational modifications of the 5'-AMP-activated protein kinase beta1 subunit. *J Biol Chem*, 1997; 272(39): 24475–22479.
- Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, 2007; 3(6): 542–545.
- Mohan J, Wollert T. Human ubiquitin-like proteins as central coordinators in autophagy. *Interface Focus*, 2018; 8(5): 20180025.
- Momcilovic M, Hong SP, Carlson M. Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP–activated protein kinase in vitro. *J Biol Chem*, 2006; 281(35): 25336–25343.
- Montero–Pedrazuela A, Venero C, Lavado–Autric R, Fernández–Lamo I, García–Verdugo JM, Bernal J, Guadaño–Ferraz A. Modulation of adult hippocampal neurogenesis by thyroid hormones: implications in depressive–like behavior. *Mol Psychiatry*, 2006; 11(4): 361–371.

- Moriyama K, Tagami T, Usui T, Naruse M, Nambu T, Hataya Y, Kanamoto N, Li YS, Yasoda A, Arai H, Nakao K. Antithyroid drugs inhibit thyroid hormone receptor-mediated transcription. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007; 92(3): 1066-1072.
- Moruno F, Perez-Jimenez E, Knecht E. Regulation of Autophagy by Glucose in Mammalian Cells. *Cells*, 2012; 1(3): 372–395.
- Moscat J, Diaz-Meco MT, Albert A, Campuzano S. Cell signaling and function organized by PB1 domain interactions. *Mol Cell*, 2006; 23(5): 631-640.
- Mota OM, Serkiz SR. the Comparative anatomy of the thyroid gland in humans and rats. *Bulletin of problems biology and medicine*, 2019; 151(2): 210–213.
- Motomura K, Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. Implications for the clinical manifestation of thyrotoxicosis. *Endocrinol Metab Clin N Am*, 1998; 27: 1–23.
- Müller MJ, Seitz HJ. Interrelation between thyroid state and the effect of glucagon on gluconeogenesis in perfused rat livers. *Biochem Pharmacol*, 1987; 36(10): 1623–1627.
- Nakamura H, Noh JY, Itoh K, Fukata S, Miyauchi A, Hamada N. Comparison of methimazole and propylthiouracil in patients with hyperthyroidism caused by Graves' disease. *J Clin Endocrinol and Metab*, 2007; 92 (6): 2157–2162
- Nakashima A, Yoshino K, Miyamoto T, Eguchi S, Oshiro N, Kikkawa U, Yonezawa K. Identification of TBC7 having TBC domain as a novel binding protein to TSC1-TSC2 complex. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007; 361(1): 218-223
- Nakatogawa H, Ichimura Y, Ohsumi Y. Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell*, 2007; 130(1): 165–178.
- Nambiar PR, Palanisamy GS, Okerberg C, Wolford A, Walters K, Buckbinder L, Reagan WJ. Toxicities associated with 1-month treatment with propylthiouracil (PTU) and methimazole (MMI) in male rats. *Toxicol Pathol*, 2014; 42(6): 970-983.
- Nikoletopoulou V, Papandreou ME, Tavernarakis N. Autophagy in the physiology and pathology of the central nervous system. *Cell Death Differ*, 2015; 22(3): 398–407.

- Nixon RA, Yang DS. Autophagy and neuronal cell death in neurological disorders. *cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012; 4(10): a008839 .
- Nixon, R. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med*, 2013; 19: 983–997.
- Noda NN, Fujioka Y. Atg1 family kinases in autophagy initiation. *Cell Mol Life Sci*, 2015; 72(16): 3083-3096.
- Nunez J, Celi FS, Ng L, Forrest D. Multigenic control of thyroid hormone functions in the nervous system. *Mol Cell Endocrinol*. 2008; 287(1–2): 1–12.
- Onuki R, Bando Y, Suyama E, Katayama T, Kawasaki H, Baba T, Tohyama M, Taira K. An RNA-dependent protein kinase is involved in tunicamycin-induced apoptosis and Alzheimer's disease. *Embo J*, 2004; 23: 959–968.
- Onyango IG, Lu J, Rodova M, Lezi E, Crafter AB, Swerdlow RH. Regulation of neuron mitochondrial biogenesis and relevance to brain health. *Biochim Biophys Acta*, 2009; 1802(1): 228–234.
- Oppenheimer JH, Schwartz HL, Lane JT, Thompson MP. Functional relationship of thyroid hormone-induced lipogenesis, lipolysis, and thermogenesis in the rat. *J Clin Invest*, 1991; 87: 125–132.
- Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Øvervatn A, Bjørkøy G, Johansen T. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem*, 2007; 282(33): 24131-24145.
- Pankiv S, Lamark T, Bruun JA, Overvatn A, Bjorkoy G, Johansen T. Nucleocytoplasmic shuttling of p62/SQSTM1 and its role in recruitment of nuclear polyubiquitinated proteins to promyelocytic leukemia bodies. *J Biol Chem*, 2010; 285(8): 5941–5953.
- Parsons MW, Gold PE. Glucose enhancement of memory in elderly humans: an inverted-U dose-response curve. *Neurobiology of Aging*, 1992; 13(3): 401–404.
- Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*. 2005; 122(6): 927-39.

- Peel AL, Bredesen DE. Activation of the cell stress kinase PKR in Alzheimer's disease and human amyloid precursor protein transgenic mice. *Neurobiol Dis*, 2003; 14: 52–62.
- Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW. Ligand binding to integrins. *J Biol Chem*, 2000; 275(29): 21785–21788.
- Poels J, Spasic MR, Callaerts P, Norga KK. An appetite for destruction: from self-eating to cell cannibalism as a neuronal survival strategy. *Autophagy*, 2012; 8(9): 1401–1403.
- Porcellini A, Messina S, De Gregorio G, Feliciello A, Carlucci A, Barone M, Picascia A, De Blasi A, Avvedimento EV. The expression of the thyroid-stimulating hormone (TSH) receptor and the cAMP-dependent protein kinase RII beta regulatory subunit confers TSH-cAMP-dependent growth to mouse fibroblasts. *J Biol Chem*, 2003; 278(42): 40621–40630. doi:10.1074/jbc.M307501200
- Potter WB, O'Riordan KJ, Barnett D, Osting SMK, Wagoner M, Burger C, Roopra A. Metabolic regulation of neuronal plasticity by the energy sensor AMPK. *PLoSOne*, 2010; 5(2): 8996–9005.
- Prinz PN, Scanlan JM, Vitaliano PP, Moe KE, Borson S, Toivola B, Merriam GR, Larsen LH, Reed HL. Thyroid hormones: positive relationships with cognition in healthy, euthyroid older men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 1999; 54(3): 111–116.
- Rabelo R, Schifman A, Rubio A, Sheng X, Silva JE. Delineation of thyroid hormone-responsive sequences within a critical enhancer in the rat uncoupling protein gene. *Endocrinology* 1995; 136: 1003–1013.
- Ragozzino ME, Pal SN, Unick K, Stefani MR, Gould PE. Modulation of hippocampal acetylcholine release and spontaneous alternation scores by intrahippocampal glucose injections. *J Neurosci*, 1998; 18(8): 1595–1601.
- Ramamurthy S, Chang E, Cao Y, Zhu J, Ronnett GV. AMPK activation regulates neuronal structure in developing hippocampal neurons. *Neuroscience*, 2014; 259: 13–24.
- Rao R, Ennis K, Long JD, Ugurbil K, Gruetter R, Tkac I. Neurochemical Changes in the Developing Rat Hippocampus During Prolonged Hypoglycemia. *J Neurochem*, 2010; 114(3): 728–738.

- Ravikumar B, Moreau K, Rubinsztein DC. Plasma membrane helps autophagosomes grow. *Autophagy*, 2010; 6(8): 1184–1186.
- Reed L, Pangaro LN. Physiology of the thyroid gland I: synthesis and release, iodine metabolism, and binding and transport. In: Becher KL. *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism*. Lippincott Company, Philadelphia, 1995: 285–291.
- Remaud S, Gothie JD, Morvan–Dubois G, Demeneix BA. Thyroid hormone signaling and adult neurogenesis in mammals. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2014; 5:62.
- Ribak CE, Seress L. Five types of basket cell in the hippocampal dentate gyrus: a combined Golgi and electron microscopic study. *J Neurocytol*, 1983; 12: 577–597.
- Ribeiro MO, Bianco SD, Kaneshige M, Schultz JJ, Cheng SY, Bianco AC, Brent GA. Expression of uncoupling protein 1 in mouse brown adipose tissue is thyroid hormone receptor–beta isoform specific and required for adaptive thermogenesis. *Endocrinology*. 2010; 151(1): 432–440.
- Ridgway EC, McCammon JA, Benotti J, Maloof F. Acute metabolic responses in myxedema to large doses of intravenous L-thyroxine. *Ann Intern Med*, 1972; 77(4): 549–555.
- Rogov V, Dötsch V, Johansen T, Kirkin V. Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Mol Cell*, 2014; 53(2): 167–178
- Rosner M, Freilinger A, Hanneder M, Fujita N, Lubec G, Tsuruo T and Hengstschläger M. p27Kip1 localization depends on the tumor suppressor protein tuberlin. *Hum Mol Genet*, 2007; 16: 1541–1556.
- Rosner M, Freilinger A, Hengstschläger M. Proteins interacting with the tuberous sclerosis gene products. *Amino Acids*, 2004; 27: 119–128.
- Ross FA, Jensen TE, Hardie DG. Differential regulation by AMP and ADP of AMPK complexes containing different γ subunit isoforms. *Biochem J*, 2016; 473: 189–199.
- Rosso P, Fioramonti M, Fracassi A, Marangoni M, Taglietti V, Siteni S, Marco S. AMPK in the central nervous system: physiological roles and pathological implications. *Res Rep Biol*, 2016: 2017(7): 1–13.

- Ruan YW, Zou B, Fan Y, Li Y, Lin N, Zeng YS, Gao TM, Yao Z, Xu ZC. Dendritic plasticity of CA1 pyramidal neurons after transient global ischemia. *Neuroscience*, 2006; 140: 191–201.
- Russell RC, Tian Y, Yuan H, Park HW, Chang YY, Kim J, Kim H, Neufeld TP, Dillin A, Guan KL. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat Cell Biol*. 2013 Jul;15(7):741-750.
- Rusten TE, Stenmark H. p62, an autophagy hero or culprit? *Nat Cell Biol*, 2010; 12(3): 207-209.
- Rykova Y, Shuper S, Shcherbakovsky M, Kikinchuk V, Peshenko A. Morphological characteristics of the thyroid gland of mature rats in moderate degree chronic hyperthermia. *Georgian Med News*, 2019; 292: 75–81.
- Samuels MH. Cognitive function in untreated hypothyroidism and hyperthyroidism. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2008; 15(5): 429–433.
- Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, Sabatini DM. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science*, 2008; 320(5882): 1496-1501.
- Sanchez–Varo R, Trujillo–Estrada L, Sanchez–Mejias E, Torres M, BagliettoVargas D, Moreno– Gonzalez I, De Castro V, Jimenez S, Ruano D, Vizuite M, Davila JC, Garcia–Verdugo JM, Jimenez AJ, Vitorica AJ, Gutierrez A. Abnormal accumulation of autophagic vesicles correlates with axonal and synaptic pathology in young Alzheimer’s mice hippocampus. *Acta Neuropathol*, 2012; 123(1): 53–70.
- Santiago Lima AJ, Hoogeveen-Westerveld M, Nakashima A, Maat-Kievit A, van den Ouweland A, Halley D, Kikkawa U, Nellist M. Identification of regions critical for the integrity of the TSC1-TSC2-TBC1D7 complex. *PLoS One*, 2014; 9(4): e93940.
- Saucedo LJ, Gao X, Chiarelli DA, Li L, Pan D, Edgar BA. Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. *Nat Cell Biol*, 2003; 5(6): 566-571.
- Scharfman HE, Myers CE. Hilar mossy cells of the dentate gyrus: a historical perspective. *Front Neural Circuits*, 2013; 6: 106.
- Schmidt B, Marrone DF, Markus EJ. Disambiguating the similar: the dentate gyrus and pattern separation. *Behav Brain Res*. 2012; 226(1): 56–65.

- Schneider JL, Miller AM, Woesner ME. Autophagy and Schizophrenia: a Closer look at how dysregulation of neuronal cell homeostasis influences the pathogenesis of schizophrenia. *Einstein J Biol Med*, 2016; 31(1-2): 34-39.
- Sellbom KS, Gunstad J. Cognitive function and decline in obesity. *J Alzheimer's Dis*, 2012; 30(2): 89-95.
- Shah JH, Motto GS, Papagiannes E, Williams GA. Insulin metabolism in hypothyroidism. *Diabetes*, 1975; 24(10): 922-925.
- Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature*, 2006; 441: 424-430.
- Shaw RJ, Kosmatka M, Bardeesy N, Hurley RL, Witters LA, dePinho RA, Cantley LC. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004; 101(10): 3329-3335.
- Shehata M, Matsumura H, Okubo-Suzuki R, Okhawa N, Inokuchi K. Neuronal stimulation induces autophagy in hippocampal neurons that is involved in AMPA receptor degradation after chemical long-term depression. *J Neurosci*, 2012; 32(30): 10413-10422.
- Shen DN, Zhang LH, Wei EQ, Yang Y. Autophagy in synaptic development, function, and pathology. *Neurosci Bull*, 2015; 31(4): 416-426.
- Shibutani Y, Yokota T. A case of acetohepamide-induced hypoglycemia: The influence of hypothyroidism on the metabolism of acetohepamide. *Nihon Naibunpi Gakkai Zasshi*, 1991; 67: 42-49.
- Simon NM, Blacker D, Korbly NB, Sharma SG, Worthington JJ, Otto MW, Pollack MH. Hypothyroidism and hyperthyroidism in anxiety disorders revisited: new data and literature review. *J Affect Disord*, 2002; 69: 209-217.
- Singh R, Cuervo AM. Autophagy in the Cellular Energetic Balance. *Cell Metab*, 2011; 13(5): 495-504.
- Sinha RA, You SH, Zhou J, Siddique MM, Bay BH, Zhu X, Privalsky ML, Cheng SY, Stevens RD, Summers SA, Newgard CB, Lazar MA, Yen PM. Thyroid hormone stimulates hepatic lipid catabolism via activation of autophagy. *J Clin Invest*, 2012; 122(7): 2428-2438.
- Sloviter RS, Lomo T. Updating the lamellar hypothesis of hippocampal organization. *Front. Neural Circuit*, 2012; 6: 102.

- Smith JW, Evans AT, Costal B, Smythe JW. Thyroid hormones, brain function and cognition: a brief review. *Neurosci Biobehav Rev*, 2002; 26(1): 45–60.
- Spencer B, Potkar R, Trejo M, Rockenstein E, Patrick C, Gindi R, Adame A, Wyss-Coray T, Masliah E. Beclin 1 gene transfer activates autophagy and ameliorates the neurodegenerative pathology in alpha-synuclein models of Parkinson's and Lewy body diseases. *J Neurosci*, 2009; 29(43): 13578-13588.
- Stadel D, Millarte V, Tillmann KD, Huber J, Tamin-Yecheskel BC, Akutsu M, Demishtein A, Ben-Zeev B, Anikster Y, Perez F, Dötsch V, Elazar Z, Rogov V, Farhan H, Behrends C.
- Stein SC, Woods A, Jones NA, Davison MD, Carling D. The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *Biochem J*, 2000; 345(3): 437–443.
- Strominger NL, Demarest RJ, Laemle LB. Cerebral Cortex, Noback's Human Nervous System, Seventh Edition. Humana Press, New York, 2012: 429–451.
- Subramani S, Malhotra V. Non-autophagic roles of autophagy-related proteins. *EMBO Rep*, 2013; 14(2): 143-151
- Suzuki WA, Amaral DG. Perirhinal and parahippocampal cortices of the macaque monkey: Cortical afferents. *J. Comp. Neurol*, 1994; 350: 497–533.
- Tahmezi L, Gökalp A, Kibar Y, Koçak I, Yalçın O, Özercan Y. Effect of hypothyroidism on the testes in mature rats and treatment with levothyroxine and zinc. *Andrologia*, 2000; 32(2): 85–89.
- Tanida I, Nishitani T, Nemoto T, Ueno T, Kominami E. Mammalian Apg12p, but not the Apg12p.Apg5p conjugate, facilitates processing. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002; 296(5): 1164–1170.
- Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol*, 2008; 445: 77-88
- Tee AR, Manning BD, Roux PP, Cantley LC and Blenis J. Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr Biol*, 2003; 13: 1259–1268.
- Towler MC, Hardie DG. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res*, 2007; 100(3): 328–341.

- Townley R, Shapiro L. Crystal structures of the adenylate sensor from fission yeast AMP-activated protein kinase. *Science*, 2007; 315: 1726–1729
- Turner DA, Buhl EH, Hailer NP, Nitsch R. Morphological features of the entorhinal–hippocampal connection. *Prog Neurobiol*. 1998; 55(6): 537–562.
- Turnley AM, Stapleton D, Mann RJ, Witters LA, Kemp BE, Bartlett PF. Cellular distribution and developmental expression of AMP-activated protein kinase isoforms in mouse central nervous system. *J Neurochem*, 1999; 72 (4): 1707–1716.
- van Groen T, Miettinen P, Kadish I. The entorhinal cortex of the mouse: organization of the projection to the hippocampal formation. *Hippocampus*. 2003; 13(1): 133–149.
- Van Pelt LF. Ketamine and xylazine for surgical anesthesia in rats. *J Am Vet Med Assoc*. 1977;171(9): 842-844.
- van Slegtenhorst M, de Hoogt R, Hermans C, Nellist M, Janssen B, Verhoef S, Lindhout D, van den Ouweland A, Halley D, Young J, Burley M, Jeremiah S, Woodward K, Nahmias J, Fox M, Ekong R, Osborne J, Wolfe J, Povey S, Snell RG, Cheadle JP, Jones AC, Tachataki M, Ravine D, Sampson JR, Reeve MP, Richardson P, Wilmer F, Munro C, Hawkins TL, Sepp T, Ali JB, Ward S, Green AJ, Yates JR, Kwiatkowska J, Henske EP, Short MP, Haines JH, Jozwiak S, Kwiatkowski DJ. Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. *Science*, 1997; 277(5327): 805-808.
- van Slegtenhorst M, Nellist M, Nagelkerken B, Cheadle J, Snell R, van den Ouweland A, Reuser A, Sampson J, Halley D, van der Sluijs P. Interaction between hamartin and tuberin, the TSC1 and TSC2 gene products. *Hum Mol Genet*, 1998; 7(6): 1053-1057.
- Vijayan V, Verstreken P. Autophagy in the presynaptic compartment in health and disease. *J Cell Biol*, 2017; 216(7): 1895–1906.
- Viollet B, Foretz M, Schlattner U. Bypassing AMPK phosphorylation. *Chem Biol*, 2014; 21(5): 567-569.
- Visser WE, Friesema EC, Visser TJ. Minireview: thyroid hormone transporters: the knowns and the unknowns. *Mol Endocrinol*. 2011; 25(1): 1–14.
- von Muhlinen N, Akutsu M, Ravenhill BJ, Foeglein Á, Bloor S, Rutherford TJ, Freund SM, Komander D, Randow F. LC3C, bound selectively by a noncanonical LIR

- motif in NDP52, is required for antibacterial autophagy. *Mol Cell*, 2012; 48(3): 329-342.
- Wang C. The relationship between type 2 diabetes mellitus and related thyroid diseases. *J Diabetes Res*, 2013; 2013: 390534.
- Wang L, Li N, Shi FX, Xu WQ, Cao Y, Lei Y, Wang JZ, Tian Q, Zhou XW. Upregulation of AMPK Ameliorates Alzheimer's Disease-Like Tau Pathology and Memory Impairment. *Mol Neurobiol*, 2020; 57(8): 3349-3361.
- Wang Z, Yang Y, Xiang X, Zhu Y, Men J, He M. Estimation of the normal range of blood glucose in rats. *Wei Sheng Yan Jiu*, 2010; 39(2): 133-137.
- Watson PD, Voss JL, Warren DE, Tranel D, Cohen NJ. Spatial reconstruction by patients with hippocampal damage is dominated by relational memory errors. *Hippocampus*, 2013; 23(7): 570–580.
- Wible CG. Hippocampal physiology, structure and function and the neuroscience of schizophrenia: a unified account of declarative memory deficits, working memory deficits and schizophrenic symptoms. *Behav Sci (Basel)*, 2013; 3(2): 298–315.
- Williams GR. Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Mol Cell Biol*. 2000; 20(22): 8329–8342.
- Williams T, Forsberg LJ, Viollet B, Brenman JE. Basal autophagy induction without AMP-activated protein kinase under low glucose conditions. *Autophagy*, 2009; 5(8): 1155–1165.
- Witter MP, Amaral DG. Entorhinal cortex of the monkey: V. Projections to the dentate gyrus, hippocampus, and subicular complex. *J Comp Neurol*, 1991; 307: 437–459.
- Won JS, Im YB, Kim J, Singh AK, Singh I. Involvement of AMP-activated-protein-kinase (AMPK) in neuronal amyloidogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010; 399(4): 487–491.
- Woods A, Dickerson K, Heath R, Hong SP, Momcilovic M, Johnstone SR, Carlson M, Carling D. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab*, 2005; 2(1): 21–33.

- Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LG, Neumann D, Schlattner U, Wallimann T, Carlson M, Carling D. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr. Biol*, 2003; 13(22): 2004–2008.
- Wrutniak C, Rochard P, Casas F, Frayssé A, Charrier J, Cabello G. Physiological importance of the T3 mitochondrial pathway. *Ann NY Acad Sci*. 1998; 839: 93–100.
- Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 2006; 124(3): 471–484.
- Wyse AT, Bavaresco CS, Reis EA, Zugno AI, Tagliari B, Calcagnotto T, Netto CA. Training in inhibitory avoidance causes a reduction of Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampus. *Physiol Behav*, 2004; 80(4): 475–479.
- Xu F, Fang Y, Yan L, Xu L, Zhang S, Cao Y, Xu L, Zhang X, Xie J, Jiang G, Ge C, An N, Zhou D, Yuan N, Wang J. Nuclear localization of Beclin 1 promotes radiation-induced DNA damage repair independent of autophagy. *Sci Rep*, 2017; 7: 45385.
- Xu Q, Wang X, Peng Y. Hypothyroidism induced by propylthiouracil decrease sirtuin1 content in rat heart. *J Lab Precis Med*, 2017; 2(8): 67–72.
- Yang J, Yi N, Zhang J, He W, He D, Wu W, Xu S, Li F, Fan G, Zhu X, Xue Z, Zhou W. Generation and characterization of a hypothyroidism rat model with truncated thyroid stimulating hormone receptor. *Sci Rep*, 2018; 8(1): 4004.
- Yonkers MA, Ribera AB. Molecular components underlying nongenomic thyroid hormone signaling in embryonic zebrafish neurons. *Neural Dev* 2009; 4: 20.
- Yu G, Song D, Berger TW. Implementation of the excitatory entorhinal–dentate–CA3 topography in a large-scale computational model of the rat hippocampus. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*, 2014; 2014: 6581–6584.
- Zanatta AP, Zanatta L, Gonçalves R, Zamoner A, Silva FR. Integrin participates in the effect of thyroxine on plasma membrane in immature rat testis. *Biochim Biophys Acta*, 2013; 1830(3): 2629–2637.
- Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature Rev. Mol. Cell Biol*. 2011; 12: 21–35.

22.03.2021

Turnitin

Turnitin Orjinallik Raporu

İşleme tarihi: 22-Mar-2021 10:39:40
 NUMARA: 1529165003
 Kaline Sayısı: 27813
 Gönderildi: 1

DENEYSEL HİPOTİROİDİZM OLUŞTURULAN ERİŞKİN S...

Ural Kemal Kavraal tarafından

Benzerlik Endeksi 66%	Kaynağa göre Benzerlik <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 2px;">İnternet Sources:</td> <td style="width: 50%; text-align: right; padding: 2px;">1%4</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Yayınlar:</td> <td style="text-align: right; padding: 2px;">%3</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Öğrenci Ödevleri:</td> <td style="text-align: right; padding: 2px;">%4</td> </tr> </table>	İnternet Sources:	1%4	Yayınlar:	%3	Öğrenci Ödevleri:	%4
İnternet Sources:	1%4						
Yayınlar:	%3						
Öğrenci Ödevleri:	%4						

aştırılan çikar
bibliyografya çikar
küçük eşleşmeler çikar

mod: rapor, hızlı görüntüle (klasik)

Change mode

vazdır

yenile

İndü

1% match (11-Ara-2014 tarihli öğrenci ödevleri) <u>Submitted to University of Chichester on 2014-12-11</u>	■
1% match (26-Ara-2017 tarihli öğrenci ödevleri) <u>Submitted to Erciyes Üniversitesi on 2017-12-26</u>	■
<1% match (18-May-2020 tarihli internet) https://veteriner.erciyes.edu.tr/Uploads/files/Endokrin%20Sistem.pdf	■
<1% match (28-Oca-2021 tarihli öğrenci ödevleri) <u>Submitted to Çankırı Karatekin University on 2021-01-28</u>	■
<1% match (17-Haz-2020 tarihli öğrenci ödevleri) <u>Submitted to (school name not available) on 2020-06-17</u>	■
<1% match (27-Ara-2017 tarihli öğrenci ödevleri) <u>Submitted to Erciyes Üniversitesi on 2017-12-27</u>	■
<1% match (06-Mar-2017 tarihli öğrenci ödevleri) <u>Submitted to Erciyes Üniversitesi on 2017-03-06</u>	■
<1% match (yayınlar) V. Jahagirdar, E. C. McNay, "Thyroid hormone's role in regulating brain glucose metabolism and potentially modulating hippocampal cognitive processes", <i>Metabolic Brain Disease</i> , 2012	■
<1% match (yayınlar) Sinem HİVAÇIOĞLU, Mehmet AKÇİREKSAZ, Ahmet AYDIN, "A Review on Doxorubicin Related Genotoxicity and Protective Effects of Phytochemicals", <i>Journal of Literature Pharmacy Sciences</i> , 2018	■
<1% match (18-Eyl-2017 tarihli öğrenci ödevleri) <u>Submitted to Erciyes Üniversitesi on 2017-09-18</u>	■
<1% match (23-Eki-2020 tarihli internet) https://abis-files.erciyes.edu.tr/avisis/94ac8f46-ad26-4125-9fde-2199143c1f2c?AWSAccessKeyId=CK5ZV1K8ZFAP1OGJCKYR&Expires=603457207&Signature=1CLHnHmEpf0v%2B%2sEue5aYcSC0%3D	■
<1% match (29-Eyl-2020 tarihli internet) https://www.semhub.com/en/library/anatomy/hippocampus-structure-and-functions	■
<1% match (07-May-2019 tarihli internet) http://adudspace.edu.edu.tr:8080	■
<1% match (16-Ara-2019 tarihli internet) http://sagons.erciyes.edu.tr	■
<1% match (yayınlar) Nadeko To, Kazuo Sakamoto, Chihiro Hikiuchi, Taji Matsusaka, Michio Nagata, "Biphasic MIF and SDF1 expression during podocyte injury promotes CD44 mediated glomerular parietal cell migration in focal segmental glomerulosclerosis", <i>American Journal of Physiology-Renal Physiology</i> , 2020	■
<1% match (25 Tem 2018 tarihli internet) http://cv.aku.edu.tr	■
<1% match (23-Haz-2015 tarihli internet) http://cspce.baskent.edu.tr:8080	■
<1% match (30-Oca-2020 tarihli internet) http://diocesit.uib.edu	■
<1% match (25 Şub 2021 tarihli internet) https://devh.univerv.wordpress.com/a-ghor/devh.univerv/	■
<1% match (18-Eyl-2019 tarihli internet) https://www.turkiyeyeklinikleri.com/pdf/?pdf=4ca7bfc4c1d64e6d2cd05688cc2c0c00	■
<1% match (29-Haz-2019 tarihli internet) http://halidtemderipnre2018.org	■
<1% match (16-Ara-2020 tarihli internet) https://archive.org/stream/goodman%20maninformalkolajivetdavielkitabipdfdrive.com/Goodman%20ve%20Gillman%20E%80%59%34%81n%20Farmakoloji%20ve%20	■
<1% match (13-May-2015 tarihli internet) http://sagons.erciyes.edu.tr	■
<1% match (12-Oca-2018 tarihli öğrenci ödevleri) <u>Submitted to Nevşehir Üniversitesi on 2018-01-12</u>	■
<1% match (14-Şub-2017 tarihli öğrenci ödevleri) <u>Submitted to Erciyes Üniversitesi on 2017-02-14</u>	■
<1% match (29-Nis-2018 tarihli öğrenci ödevleri) <u>Submitted to University of Birmingham on 2018-04-29</u>	■

https://www.turnitin.com/newreport_classic.asp?lang=tr&oid=1539165033&ft=1&bypass_cv=1

1/20

Ural Kemal Kavraal

Veteriner Hekim



Doğum Tarihi	01.01.1990	Cep Telefonu	0505 771 68 25
Doğum Yeri	Kayseri	E-Posta	uralkemal@gmail.com
Adres	Bozantı Cd. 144/28, Kocasinan, Kayseri		
Ehliyet	B (2010)		

Eğitim

Doktora	Histoloji-Embriyoloji ABD.
Verdiğim Dersler	Histoloji I ve Histoloji II uygulama dersleri (2016 - 2019)
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Lisans	Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Lise	Hacı Ahmet Arısoy Lisesi
Yabancı Dil	İngilizce (Çok İyi)

Yayınlar

- Beyaz F, Liman N, Sagsöz H, Koknur S, Ergen E, Kavraal UK.
Histochemical properties of gastric mucins of *Spermophilus xanthophrymnus* in hibernation and active period. 15. International Congress of Histochemistry and Cytochemistry “From Molecules to Diseases”, 2017, Antalya, pp.
- Liman, N., Ergen, E., Kavraal, U. K., Karakoç, Z. (2019) “Koç ve boğa abomazumunda progesteron reseptörünün immunlokalizasyonu”, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.
- Öztop, M., Özbek, M., LİMAN, N., BEYAZ, F., Ergün, E., Ergün, L., Kavraal, U. K. (2019). "Expression patterns of natriuretic peptides in pre-hibernating and hibernating anatolian ground squirrel (*Spermophilus xanthoprymnus*) lung." *Acta Histochemica*.
- KAVRAAL, U. K., (2021). “Deneyisel hipotiroidizm oluşturulan erişkin sıçanların hipokampusünde otofajinin araştırılması.” PhD dissertation.