

ÖZGÜN ARAŞTIRMA

# Metimazol ile Oluşturulan Sıçan Hipotiroidi Modelinde Kognitif Fonksiyonlar, Anksiyete ve Depresyon Benzeri Davranışların Değerlendirilmesi: Pilot Çalışma

Oğuzhan Ekin EFE<sup>1</sup>, Selda EMRE AYDINGÖZ<sup>1</sup>, Karl Michael LUX<sup>1</sup>,  
Eda ÖZTURAN ÖZER<sup>2</sup>, Ayşegül SÜZER<sup>3</sup>, Meral TUNCER<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Ankara.

<sup>2</sup> Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara

<sup>3</sup> Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

## ÖZET

Hipertiroidizm tedavisinde yaygın olarak kullanılan metimazol, deneysel çalışmalarda geçici hipotiroidizm modeli oluşturmak için kullanılmaktadır. Çalışmamızda metimazol ile oluşturulan sıçan hipotiroidi modelinde kognitif fonksiyonların değerlendirilmesi ve hipotiroidinin anksiyete ve depresyon benzeri davranışlar üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Oniki adet erişkin dişi/erkek Wistar sıçan (250-300 g) iki gruba ayrılarak bir gruba 4 hafta süre ile içme suyu içinde %0,02 metimazol verilerek hipotiroidizm oluşturulmuş, diğer gruba normal içme suyu verilmiştir. Dört hafta sonunda, Morris su labirenti, yükseltilmiş artı labirent, kuyruk suspansiyon testi, pasif sakınma testi uygulanmıştır. Metimazol kesildikten 8 hafta sonra serum serbest T4 ve TSH düzeyleri ölçülmüş ve tiroid dokusu histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. Morris su labirenti testinde sadece 1. günde gruplar arasında anlamlı fark izlenmiştir ( $p < 0,001$ ). Pasif sakınma testinde ise gruplar arasında anlamlı fark görülmemiştir ( $p = 0,477$ ). Yükseltilmiş artı labirentte hipotiroid sıçanlar açık alanda daha fazla süre geçirmiş ( $123,5 \pm 35,5$  sn vs.  $12,5 \pm 7,9$  sn;  $p = 0,012$ ); açık ve orta alana daha fazla sayıda giriş yapmıştır (sırasıyla,  $3,0 \pm 0,4$  vs.  $0,7 \pm 0,5$ ;  $p = 0,006$ ,  $6,2 \pm 1,2$  vs.  $2,8 \pm 0,7$ ;  $p = 0,042$ ). Kuyruk suspansiyon testinde hipotiroid grubun hareketsiz kaldığı süre, ötiroid gruba göre anlamlı olarak daha uzun bulunmuştur ( $186,2 \pm 19,5$  sn vs.  $110,3 \pm 26,2$  sn;  $p = 0,043$ ). Histopatolojik incelemede, hipotiroid grubunda kolloid vakuolizasyonu izlenmiş, ancak serum serbest T4 ve TSH düzeylerinde gruplar arasında fark görülmemiştir. Sonuç olarak, sıçanda metimazol hipotiroidi modeli öğrenme ve bellekte bozulma oluşturmaksızın, anksiyeteyi azaltıp depresyona eğilimi artırmaktadır. Bu zeminde, hipotiroidi ve kognitif fonksiyon ilişkisini aydınlatmaya yönelik ileri çalışmalar planlanmalıdır.

**Anahtar Kelimeler:** Hipotiroidizm. Kognitif fonksiyon. Sıçan. Metimazol.

## Evaluation of Cognitive Functions, Anxiety- and Depression-Like Behaviours in Methimazole-Induced Rat Hypothyroidism Model: A Pilot Study

### ABSTRACT

Methimazole, a widely used agent in the treatment of hyperthyroidism, is also used to induce hypothyroidism in experimental studies. In this study, we aimed to evaluate cognitive functions and anxiety- and depression-like behaviours in a methimazole-induced rat hypothyroidism model. Twelve adult female/male Wistar rats (250-300 g) were randomly divided into two groups, one of which was given 0.02% methimazole in drinking water for 4 weeks, as the other group was given normal water. After 4 weeks, Morris water maze, elevated plus maze, tail suspension test, passive avoidance test was applied. Serum free T4 and TSH levels were measured 8 weeks after discontinuation of methimazole, and thyroid tissue was evaluated histopathologically. In the Morris water maze test, a significant difference was observed between the groups only on the 1st day ( $p < 0.001$ ). There was no significant difference between the groups in the passive avoidance test ( $p = 0.477$ ). In the elevated plus maze, hypothyroid rats spent more time in the open-field ( $123.5 \pm 35.5$  sec vs.  $12.5 \pm 7.9$  sec;  $p = 0.012$ ); made more entries into the open and middle area ( $3.0 \pm 0.4$  vs.  $0.7 \pm 0.5$ ;  $p = 0.006$  and  $6.2 \pm 1.2$  vs.  $2.8 \pm 0.7$ ;  $p = 0.042$ , respectively). In the tail suspension test, the duration of immobility was significantly longer in the hypothyroid group ( $186.2 \pm 19.5$  sec vs.  $110.3 \pm 26.2$  sec;  $p = 0.043$ ). In the histopathological examination, colloid vacuolization was observed in the hypothyroid group, but serum free T4 and TSH levels did not show difference between the groups. In conclusion, methimazole-induced hypothyroidism decreases anxiety and increases tendency to depression without impairing learning and memory. On this basis, further studies should be planned to elucidate the relationship between hypothyroidism and cognitive functions.

**Key Words:** Hypothyroidism. Cognitive Function. Rat. Methimazole.

**Geliş Tarihi:** 02.Mart.2022

**Kabul Tarihi:** 23.Haziran.2022

Dr. Oğuzhan Ekin EFE  
Baskent Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Ankara  
Tel: 0312 246 66 79 80  
E-posta: oeeefe@baskent.edu.tr

**Yazarların ORCID Bilgileri:**

Oğuzhan Ekin EFE: 0000-0002-3243-7843

Selda EMRE AYDINGÖZ: 0000-0001-7823-7620

Karl Michael LUX: 0000-0002-5203-8161

Eda ÖZER : 0000-0001-6543-4043

Ayşegül SÜZER: 0000-0002-0899-6258

Meral TUNCER: 0000-0003-3360-5092

Tiroid hormonları (T3, T4) hücrelerin büyümesi, homeostazı, farklılaşması ve metabolizması üzerine genomik ve genom dışı etkileri olan önemli hormonlardır. Fetal ve postnatal dönemde normal beyin gelişiminin ve fonksiyonlarının sağlanmasında önemli rol oynamaları yanında, normal erişkin beyin fonksiyonları için de kritik öneme sahiptirler<sup>1</sup>. Hipotiroidi, doku düzeyinde tiroid hormon eksikliği veya etkisizliği sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır. Tiroid hormon eksikliği olan yetişkinlerde hipokampal nöroenez olumsuz etkilenmekte, hipokampus volümü azalmakta ve nörolojik ve kognitif problemler oluşmaktadır<sup>2</sup>. Ayrıca erişkin dönemdeki hipotiroidizmin, anksiyete ve depresyon gibi önemli davranışsal sonuçları olabildiği de bilinmektedir<sup>3-5</sup>. Hipotiroidili hastaların %20-%30'unda anksiyete bozukluğu, %30-%40'ında ise major depresyon olduğu bildirilmiştir<sup>3-5</sup>. Aşık hipotiroidi yanında subklinik hipotiroidi de nöropsikolojik değişiklikler oluşturabilmektedir<sup>3-5</sup>.

Tiroid hormonlarında azalmanın artmış oksidatif strese yol açtığı, buna bağlı değişen mitokondriyal aktivite sonucu hücre hasarı oluştuğu düşünülmektedir<sup>6-8</sup>. Ayrıca hipotiroidizmin süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitesinde ve hidroksil radikallerinin seviyesinde artışa, glutatyon ve mitokondriyal sitokrom c oksidaz aktivitesinde ise düşüşe yol açtığına dair kanıtlar da vardır<sup>9,10</sup>. Hipotiroidizm ile ilişkili nörolojik ve davranışsal bozulmalarda, tiroid hormonlarının hücre devamlılığı için bu önemli fonksiyonlarının ve eksikliklerinde görülen moleküler değişimlerin etkili olması muhtemeldir<sup>6-10</sup>.

Hipotiroidi prevalansı yaşla birlikte artış gösterir ve her yaş grubunda kadınlarda erkeklerden daha sıktır. Toplum genelinde aşık hipotiroidi prevalansı %0,1-%2, subklinik hipotiroidi prevalansı %4-%8,5 olup, 60 yaş üzeri kadınlarda bu oran %14-%20'ye çıkmaktadır<sup>2</sup>. Toplumdaki yaygınlığı dikkate alındığında hipotiroidiye bağlı nörolojik ve davranışsal sorunların önemli olduğu görülmektedir.

Hipertiroidizm tedavisinde yaygın olarak kullanılan metimazol, deneysel çalışmalarda da hipotiroidizm modeli oluşturmak için kullanılmaktadır<sup>11,12</sup>. Hipotiroidizm ile ilişkili kognitif fonksiyonlarda bozulmanın mekanizmasının aydınlatılması ve bu bozulmalara karşı etkili ilaçların geliştirilebilmesi için geçerli ve güvenilir deneysel modellerin oluşturulması önem taşımaktadır. Literatürde hipotiroidizm ile ilişkili kognitif fonksiyonlarda bozulma, anksiyete ve depresyon benzeri davranışların değerlendirilmesi için metimazol modeli kullanılan çalışmalarda çelişkili sonuçlar bildirilmiştir<sup>13-17</sup>.

Çalışmamızda metimazol ile oluşturulan sıçan hipotiroidi modelinde kognitif fonksiyonların, anksiyete ve depresyon benzeri davranışların değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

### *Hayvanlar ve deneysel tasarım*

Deneysel işlemler güncel Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı Kılavuzu'na (2011, Ulusal Sağlık Enstitüsü, ABD) uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma protokolü Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu ile Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (DA 21/04; 29/03/2021).

Çalışma için 250-300 g ağırlığında erişkin 12 adet dişi/erkek Wistar sıçan kullanılmıştır. Hayvanlar Başkent Üniversitesi Deneysel Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edilmiş ve standart bakım koşullarında 1 hafta bekletildikten sonra iki gruba randomize edilmiştir. Randomizasyon işlemi hayvanların ağırlığı, yaşı ve bekleme süresi sonrası yapılan Barnes-Maze testi ile temel öğrenme-uzamsal bellek performanslarına göre gruplar benzer özellikte olacak şekilde yapılmıştır. Deneysel gruplarından birinde hipotiroidizm oluşturulması için 4 hafta süresince içme suyu içinde %0,02 metimazol verilmiştir<sup>11,12</sup>. Ötiroid kontrol grubu bu süre içinde normal içme suyu almıştır.

Hayvanların kognitif fonksiyonlarını değerlendirmek için 4 hafta sonunda davranış deneyleri yapılmıştır. Metimazol kesildikten 8 hafta sonra hayvanlar sakrifiye edilerek, serum FT4 ve TSH düzeyleri belirlenip, ötiroid grubu ile karşılaştırılarak hipotiroidizm grubunun tiroid fonksiyonlarında geri dönüş olup olmadığı değerlendirilmiştir. Ayrıca tiroid dokusu çıkarılarak histopatolojik değerlendirme yapılmıştır.

### *Davranış deneyleri*

#### Morris su labirenti testi

Mekansal (spatial) belleği ve öğrenmeyi incelemek için yaygın olarak kullanılan bir testtir<sup>18</sup>. Test, oda sıcaklığında su içeren 1,5 m çapında daire şeklindeki siyah bir su tankı ve su yüzeyinin 2 cm altına yerleştirilmiş bir kaçış platformundan oluşan düzende yapılmıştır. Havuzun duvarlarına, hayvanlar tarafından görülebilen üç ipucu yerleştirilmiştir: bir üçgen, bir üçlü daire ve bir bayrak. Her bir hayvan, su tankının dört tarafından (kuzey, güney, doğu ve batı) suya bırakılıp, platformu bulması için 120 saniye beklenmiştir. Kaçış platformunu bulma zamanı (latans) kaydedilerek her bir hayvan için dört yönün ortalaması alınmıştır. Hayvan, sürenin sonunda platformu bulamazsa, yavaşça platforma yönlendirilip 15 saniye platformda tutulmuştur. Deneysel art arda dört gün boyunca tekrarlanmış ve her bir hayvanın öğrenme performansı, latans süresindeki azalmaya göre değerlendirilmiştir. Beşinci günde platform kaldırılarak, her hayvan için tankın platformun bulunduğu çeyrek bölümünde geçirilen zaman kaydedilmiştir (Prob testi).

## Hipotiroidizmde Kognitif Fonksiyonlar

### Yükseltilmiş artı labirent testi

Hayvanların anksiyete düzeylerini değerlendirmek için kullanılan bir testtir<sup>19</sup>. Yükseltilmiş artı labirent, 50 cm uzunluğunda, 10 cm genişliğinde, yerden 50 cm yüksekte olan bir artı işareti şeklindedir ve iki açık ve iki kapalı koldan meydana gelir. Test için her sıçan kapalı kollardan birinin girişine dönük olarak bırakılmış, 420 saniye boyunca gözlenerek açık ve kapalı kollarda geçirilen süre, kollara giriş sayısı ve kavşaktan geçiş sayısı kaydedilmiştir.

### Kuyruk süspansiyon testi

Hayvanların depresyon düzeyini belirlemek için kullanılmaktadır<sup>20</sup>. Hayvanlar, yapışkan bant kullanılarak yerden 30 cm yukarıda yerleşik yatay bir çubuğa kuyruklarından asılarak, 360 saniye izlenmiştir. Her bir hayvan için toplam hareketsizlik süresi saniye cinsinden kaydedilmiştir.

### Pasif sakinme testi

Pasif sakinme testi öğrenmeyi ve hafızayı değerlendirmek için kullanılan bir testtir<sup>21</sup>. Bu testte kullanılan düzenek iki bölmelidir. Bölmelerden biri büyük, karanlık ve hayvana elektrik şoku uygulanan bölme; diğeri küçük, aydınlık ve hayvanın elektrik şoku almadığı bölmedir. Küçük ve aydınlık bölmeye konulan hayvanın karanlık bölmeye geçmesi için geçen süre kaydedilmiş, 30 sn sonra aynı işlem tekrarlanmıştır. İkinci kez aydınlık bölmeye konulan hayvan karanlık bölmeye geçmez ise elektrik şoku alacağını öğrenmiş kabul edilmiştir.

### Biyokimyasal ölçümler

Metimazol uygulaması kesildikten 8 hafta sonra sakrifiye edilen hayvanlardan intrakardiyak olarak alınan kan örnekleri 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş, serumlar biyokimyasal analiz yapılabildiği kadar -80 °C'de saklanmıştır. Serum TSH ve ft4 seviyeleri, Enzim Bağlantılı İmmüno-Sorbent Testi (ELISA) kitleri (sırasıyla E0180Ra ve E0735Ra; BT LAB, Zheijang, Çin) kullanılarak ölçülmüştür. Sağlanan mikrotitre şeritlerinin oyukları üzerine spesifik bir monoklonal antikor kaplanmıştır. Standartlar ve numuneler kuyulara pipetlenerek testler üretici firma tarafından verilen talimatlara göre yapılmıştır. Optik yoğunluk değerleri, bir mikropilaka okuyucu (Bio-Tek Instruments, INC.ELX 800, ABD) ile 450 nm'de elde edilmiştir. Numunelerin konsantrasyonları, ikinci dereceden bir kalibrasyon eğrisi ile hesaplanarak bilinmeyen serum konsantrasyonları, TSH için mIU/ml ve ft4 için pmol/L olarak ifade edilmiştir.

### Histopatolojik değerlendirme

Tiroid doku örnekleri %10 tamponlu formaldehit içerisinde 3 gün boyunca fikse edilmiştir. Rutin doku takibinde dehidratasyon aşamasında dokular artan alkol serilerinden geçirilerek şeffaflandırma yapılmıştır. Dokular parafin bloklara etiketleme yapılarak gömülmüştür. Her örnekten 4 mikron kalınlığında kesitler alınmıştır (Leica SM2000R).

Alınan kesitler hematoksilin-eozin ile boyanmış ve ışık mikroskopunda (LeicaDM3000) 20'lik ve 40'lık büyütmelemlerde incelenmiştir. Kesitler fotoğraflanarak; organ kapsülü, interfoliküler alan, tiroid folikül hücre morfolojisi ve kolloid yapısı histokimyasal açıdan değerlendirilmiştir.

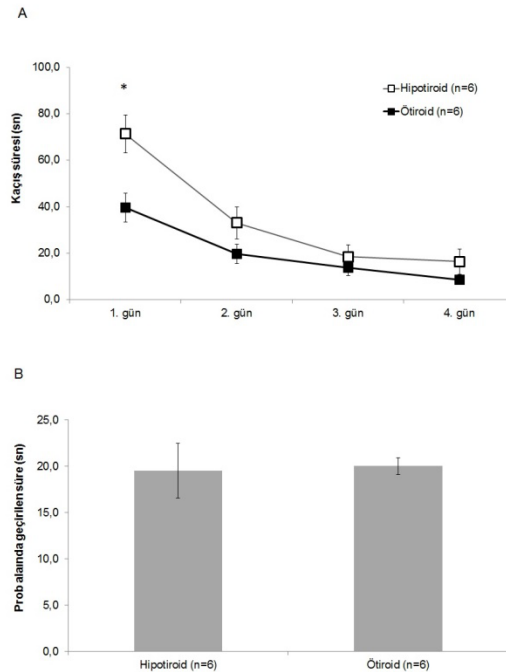
### İstatistiksel analiz

Elde edilen tüm veriler tanımlayıcı istatistikler (ortalama ve ortalamanın standart hatası) ile özetlenmiştir. Deneysel verilerin gruplararası anlamlılığının değerlendirilmesi için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Kognitif test sonuçlarının zamana bağlı değişimi üzerine grupların etkisi iki yönlü varyans analizi ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizler, GraphPad Prism (versiyon 5.0, ABD) programında yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı  $p < 0,05$  olarak belirlenmiştir.

## Bulgular

### Morris su labirenti testi

Morris su labirenti testinde sadece 1. günde hipotiroid sıçanların platformu bulma süresi, ötiroid sıçanlara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha uzun bulunmuştur ( $71,4 \pm 8,2$  sn vs.  $39,6 \pm 15,2$  sn;  $p < 0,001$ ). Prob testinde ise gruplar arasında anlamlı fark izlenmemiştir ( $p = 0,87$ ) (Şekil 1).



### **Şekil 1.**

*Morris su labirenti testinde ötiroid ve hipotiroid sıçanların platforma ortalama çıkış süreleri (A) ve kaçış platformunun olduğu alanda geçirdikleri ortalama süreler (B) (n=6). Dikey sapmalar ortalamanın standart hatasını göstermektedir (\*  $p < 0,001$ ).*

### Yükseltilmiş artı labirent testi

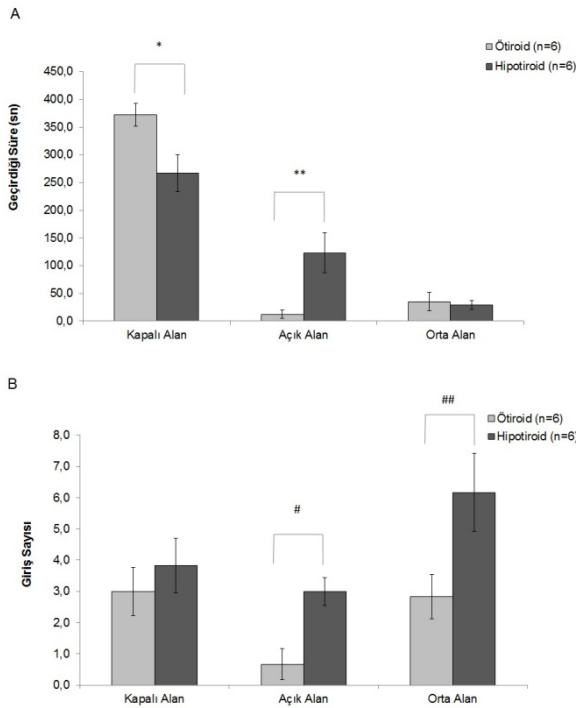
Yükseltilmiş artı labirent testinde hipotiroid sıçanlar, ötiroidlere göre anlamlı olarak açık alanda daha fazla ( $123,5 \pm 35,5$  sn vs.  $12,5 \pm 7,9$  sn;  $p = 0,012$ ) ve kapalı alanda ise daha az süre geçirmişlerdir ( $267,2 \pm 33,6$  sn vs.  $372,3 \pm 20,9$  sn;  $p = 0,024$ ). Ayrıca hipotiroid sıçanların açık alana giriş ve orta alandan geçiş sayısı ötiroid sıçanlara göre anlamlı olarak daha fazla olmuştur (sırasıyla,  $3,0 \pm 0,4$  vs.  $0,7 \pm 0,5$ ;  $p = 0,006$ ,  $6,2 \pm 1,2$  vs.  $2,8 \pm 0,7$ ;  $p = 0,042$ ) (Şekil 2).

### Kuyruk süspansiyon testi

Kuyruk süspansiyon testinde, hipotiroid sıçanlar ötiroid sıçanlara göre anlamlı olarak daha uzun süre hareketsiz kalmıştır ( $186,2 \pm 19,5$  sn vs.  $110,3 \pm 26,2$  sn;  $p = 0,043$ ) (Şekil 3A).

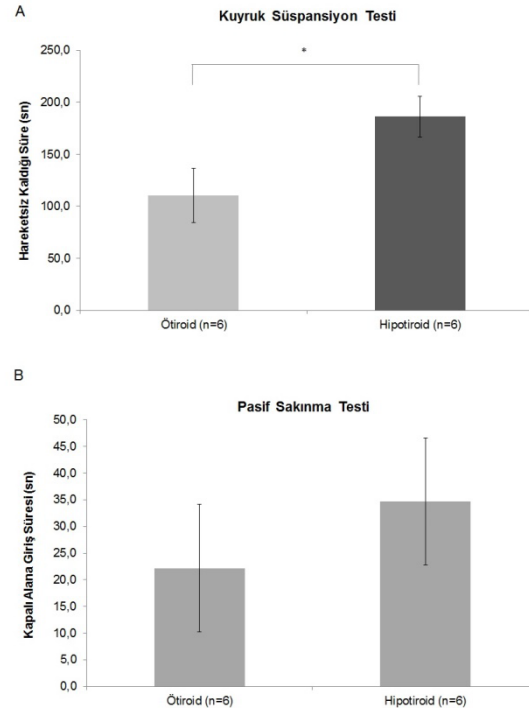
### Pasif sakinma testi

Pasif sakinma testinde, ötiroid ve hipotiroid sıçanlar arasında kapalı alana geçiş sürelerinin ortalama değerleri istatistiksel olarak anlamlı fark göstermemiştir ( $22,2 \pm 12,0$  sn vs.  $34,7 \pm 11,9$  sn;  $p = 0,477$ ) (Şekil 3B).



### Şekil 2.

Yükseltilmiş artı labirent testinde ötiroid ve hipotiroid sıçanların kapalı alan, açık alan ve orta alanda geçirdikleri ortalama süreler (A) ve kapalı alan, açık alan ve orta alandan ortalama geçiş sayıları (B) ( $n=6$ ). Dikey sapmalar ortalamasının standart hatasını göstermektedir ( $p = 0,024$ ,  $**p = 0,012$ ,  $#p = 0,006$ ,  $##p = 0,042$ ).



### Şekil 3.

Ötiroid ve hipotiroid sıçanların kuyruk süspansiyon testinde hareketsiz kaldıkları ortalama süre (A) ve pasif sakinma testinde kapalı alana ortalama geçiş süresi (B) ( $n=6$ ). Dikey sapmalar ortalamasının standart hatasını göstermektedir ( $p = 0,043$ ).

### Biyokimyasal ölçümler

Metimazol kesildikten 8 hafta sonra serum serbest T4 (fT4) ve TSH seviyeleri açısından ötiroid ve hipotiroid gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ( $p = 0,39$  ve  $p = 0,09$ ) (Tablo I).

**Tablo I.** Ötiroid ve hipotiroid gruplarında fT4 ve TSH düzeyleri

	Ötiroid sıçanlar (n=6)	Hipotiroid sıçanlar (n=6)	p değeri
fT4 (pmol/L)	$13,67 \pm 2,12$	$13,28 \pm 2,65$	0,39
TSH (mU/mL)	$2,98 \pm 0,18$	$2,79 \pm 0,26$	0,09

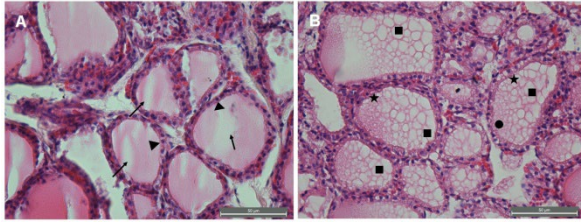
Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. fT4: serbest T4; TSH: tiroid stimüle edici hormon.

### Tiroid histopatolojisi

Ötiroid ve hipotiroid grubundaki hayvanlardan alınan tiroid dokusunun histopatolojik değerlendirilmesinde, ötiroid grupta normal tiroid dokusu gözlenmiş, hipotiroid gruptan alınan tiroid örneklerinde ise tiroid foliküllerinde yer yer bozulma dikkati çekmiştir (Şekil 4). Ötiroid grubunda kapsül ve interfoliküler alan normal histolojik yapısını korumuştur. Tiroid folikülleri geniş, düzgün sınırlı ve yuvarlak görünümde izlenmiş, folikül epitel hücrelerin

## Hipotiroidizmde Kognitif Fonksiyonlar

çoğunlukla alçak kübik ya da kübik görünümde olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu tiroidin hormon sentezi açısından aktif olduğu yönünde değerlendirilmiştir. Folikül hücre sınırları bütünlüğünü korumuştur. Sitoplazma diffüz ve asidofilik görünümüne sahiptir. Folikül hücre çekirdekleri epitel hücre şekli ile uyumlu olarak yuvarlak ve yassı şekillerde gözlenmiştir. Çekirdekçik bazı hücrelerde izlenmiştir. Foliküller asidofilik kolloidle doludur. Folikül içi kolloidde yer yer gözlenen kesintili görünümün kesit alma aşamasından kaynaklı olduğu düşünülmüştür (Şekil 4A).



**Şekil 4.**

*Ötiroid (A) ve hipotiroid (B) gruplarındaki sıçanlardan alınan tiroid kesitlerinde ışık mikroskopu ile alınan histopatolojik görüntü örnekleri. Ötiroid grubunda (A) folikül epitel hücrelerinin sınırlarının belirgin olduğu, hücrelerin kübik görünüm gösterdiği ve çekirdeklerin hücrelerle uyumlu şekilde yuvarlak görünümde olduğu değerlendirildi (▲). Kolloidde yer yer gözlenen kesintili görünüm kesit alma aşamasıyla ilişkilendirildi (↗). Hipotiroidi grubundan (B) alınan tiroid örneklerinin değerlendirilmesinde apikal hücre bütünlüğünün bozulduğu (●) ve kolloid içerisinde vakuolizasyon olan (■) alanlar görüldü. Folikül hücrelerinin apikal membranlarında yer yer mikrovillus benzeri bir görünüm izlendi (★). Hematoksilen-eozin, ×400.*

Hipotiroidi grubunda kapsül ve interfoliküler alan doğal görünümde izlenmiştir. Tiroid folikülleri bazı preparatlarda küçülmüş ve düzensiz şekillerde gözlenmiştir. Folikül hücrelerine bakıldığında epitel boyu hormon aktif diyebileceğimiz kübik görünümde olsa da apikal hücre membranının yer yer bütünlüğünü kaybettiği ve bu alanda yoğun vakuolizasyon olduğu gözlenmiştir. Apikal membranlarda mikrovillus benzeri bir görünüme rastlanmıştır. Çekirdek şekilleri epitel hücre şekilleriyle uyumludur. Bu grupta folikül içi kolloid yer yer belirgin bir vakuolizasyon göstermektedir. Kolloidin diffüz asidofilik yapısı çoğunlukla izlenememiştir (Şekil 4B).

## Tartışma ve Sonuç

Bu deneysel çalışmada sıçanlarda metamazol ile oluşturulan hipotiroid modelinin spatial öğrenme ve bellekte bozulma veya anksiyete oluşturmaksızın,

depresyona eğilimi artırdığı görülmüştür. Çalışmamız, metamazol ile oluşturulan sıçan hipotiroidi modelinde kognitif fonksiyonları ve anksiyete ve depresyon benzeri davranışları göstermesi nedeniyle bilimsel açıdan orjinal değere sahiptir.

Literatürde metamazol ile indüklenen sıçan hipotiroidi modeli yaygın kullanılan ve kabul edilen bir modeldir<sup>22,23</sup>. Çalışmamızda uyguladığımız metamazol dozu, hipotiroidi oluşturduğu bildirilen doz aralığında seçilmiştir<sup>11,12,22</sup>. Elde ettiğimiz histopatolojik ve biyokimyasal bulgulara göre, metamazolün hipotiroidi oluşturma etkisinin geçici olduğu, tiroid dokusunda yer yer tiroid foliküllerinde bozulma izlenmekle birlikte uzun dönemde tiroid fonksiyonlarının normale döndüğü sonucuna varılmıştır.

Spatial öğrenme ve belleğin değerlendirildiği Morris su labirenti testinde, ilk gün dışında gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiş, testin ilk gününde hipotiroidi grubunun platformu bulma süresinin uzun olmasının, hipotiroidi ile ilişkili mobilite azalmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür. Bunun dışında uyguladığımız modelde hipotiroidinin spatial öğrenme ve bellek üzerine anlamlı bir etkisi olmadığı görülmüştür. Bu bulgularımızdan farklı olarak Hosseini ve ark., metamazol ile hipotiroidi oluşturulan sıçanların Morris su labirentinde geçirdikleri süre ve yüzme rotaları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hipotiroid sıçanların istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha uzun süre suda kaldıklarını ve daha uzun mesafe kat ettiklerini bildirmişler<sup>24</sup>. Yine aynı çalışmada, platformun yer aldığı alanda hayvanların geçirdikleri süre metamazol grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur<sup>24</sup>. Bir diğer çalışmada ise Wijk ve ark. Morris su labirenti testinde hipotiroid sıçanlar ile kontrol ve hipo-normal sıçanların yüzme hızlarında bir fark tespit etmezken, tüm hipotiroid sıçanların ve hipo-normal dişi sıçan grubunun anlamlı olarak daha fazla artmış arama hatasına sahip olduklarını ve dolayısıyla da öğrenmelerinin daha geç meydana geldiğini göstermişler<sup>25</sup>.

Öğrenme ve bellek fonksiyonlarını değerlendirmek için uyguladığımız bir diğer test olan pasif sakınma testinde, kapalı alana geçiş süresi açısından ötiroid ve hipotiroid sıçanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir. Benzer şekilde Xu ve ark. farelerde hipotiroidinin pasif sakınma testinde kapalı alana geçiş süresi üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir<sup>26</sup>. Pasif sakınma testi ve Morris su labirenti testinde elde ettiğimiz bulgular beraber değerlendirildiğinde, metamazol ile oluşturulan hipotiroidinin öğrenme ve bellek üzerinde etkisi olmadığı düşünülmektedir.

Çalışmamızda hayvanların anksiyete düzeylerini belirlemek için kullandığımız yükseltilmiş artı labirent testinde, kapalı alanda ötiroid sıçanlar anlamlı olarak daha fazla zaman geçirirken, hipotiroid sıçanlar açık

alandan daha fazla süre geçirmiştir. Bu sonuçlar hipotiroid sıçanların beklenmedik şekilde daha düşük anksiyeteye sahip olduklarını düşündürmektedir. Öte yandan ötiroid ve hipotiroid sıçanlar kollardan geçiş sayısı açısından karşılaştırıldığında, hipotiroid sıçanların açık alan ve orta alana anlamlı olarak daha fazla sayıda giriş yaptığı tespit edilmiştir. Bu da hipotiroid sıçanların daha düşük anksiyete seviyesine sahip olmasını destekler niteliktedir, ancak Morris su labirentinde ilk gün performansının hipotiroidi grubunda düşük olması bu veri ile çelişki göstermektedir. Chaalal ve ark., yükseltilmiş artı labirent testinde, açık kollarda geçirilen zaman veya açık kollara giriş sayısı açısından kontrol ve hipotiroidi sıçanları arasında fark gözlememiş, buna dayanarak hipotiroidizmin anksiyete üzerinde etkisinin olmadığını düşünmüşlerdir<sup>27</sup>. Öte yandan bizim çalışmamıza benzer olarak, Lu ve ark. iyot kullanarak oluşturdukları hipotiroidi modelinde yükseltilmiş artı labirent testinde sıçanların azalmış anksiyete benzeri davranış gösterdiklerini rapor etmişlerdir<sup>28</sup>. Tiroid hormonları ile anksiyete ilişkisi ileri çalışmalarda incelenmelidir.

Çalışmamızda depresyon düzeyini belirlemek için uyguladığımız kuyruk süspansiyon testinde, hipotiroid grubun hareketsiz kaldığı ortalama süre, ötiroid gruba göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde daha uzun bulunmuştur. Bu sonuç hipotiroid sıçanların depresyona olan eğilimlerini göstermektedir. Morris su labirentinde ilk gün performansının hipotiroidi grubunda düşük olması da düşük mobiliteyi işaret ederek bu bulgu ile uyumlu kabul edilebilir. Bizim çalışmamıza benzer şekilde Jin ve ark., propiltiourasil ile oluşturdukları hipotiroidizm modelinde sıçanların kuyruk süspansiyon testinde ortalama hareketsiz kalma sürelerinin kontrole göre anlamlı şekilde yüksek olduğunu tespit etmişlerdir<sup>29</sup>. Bu da hipotiroidinin depresyon-benzeri davranışları tetiklediği şeklinde yorumlanmıştır<sup>29</sup>.

Metimazol uygulamasının sonlanmasından 8 hafta sonra sakrifiye edilen hayvanlardan çıkarılan tiroid dokusunun histopatolojik incelemesinde, tiroidin hipofonksiyonunun temel göstergelerinden biri olan epitel boyunun hipoaktiviteye bağlı olarak yassı şekle dönmesi her iki grupta da izlenmemiştir. Ancak hipotiroid grubunda belirgin kolloid vakuolizasyonu dikkat çekmiştir. Vakuolizasyon kolloid içindeki tiroglobulin multimerlerinin ışık mikroskopik düzeyde yansımalarıdır. Bu bulgu bazı çalışmalarda tiroglobulin multimerlerinin sıklıkla düşük fonksiyon gösteren foliküllerde gözlemlendiği şeklinde rapor edilmiştir<sup>30</sup>. Bu bilgi ışığında hipotiroidi grubunda bazı deneğin morfolojik olarak hipotiroidi karakteristiği gösterdiği düşünülebilir. Öte yandan metimazol ile indüklenmiş bir hipotiroidi modelinde serum TSH seviyelerinin artması ve organı hormon sentezlemek yönünde indüklemesi beklenen bir süreçtir<sup>31</sup>. Tiroid hormon

sentezi sürecinde tiroglobulin monomerlerinin endositozla folikül hücrelerine alınma basamağı düşünüldüğünde hipotiroidi grubunda gözlenen folikül hücresi apikal membranında artmış vakuolizasyon da TSH uyarısına bağlı artmış endositotik veziküler trafik yönünde değerlendirilebilir. Bu histolojik görüntü de organın hipofonksiyonunun işareti olabilir. Diğer taraftan biyokimyasal olarak TSH ve ft4 düzeylerinin normal olması, hipotiroidi grubunda metimazol uygulaması sonlandıktan sonra uzun dönemde tiroid fonksiyonlarının geri döndüğü, ancak histolojik olarak metimazolün etkisinin hala izlenebildiği şeklinde yorumlanmıştır. Histopatolojik değerlendirme için denek sayısının artırılması, hipoaktif foliküller için periodik asid shiff (PAS) histokimya tekniğinin kullanılması ileri çalışmalarda daha net veriler elde etmek için faydalı olacaktır.

Çalışmamızın dikkat çekilmesi gereken başlıca kısıtlılıkları, kanda tiroid fonksiyonlarının erken dönemde ölçülmemiş olması ve buna bağlı olarak da erken-geç dönem tiroid fonksiyon testi sonuçlarının karşılaştırılmamış olmasıdır. Ayrıca davranış testlerinin metimazol kesildikten sonra ileri dönemde gerçekleştirilmemesi sebebiyle erken-geç dönem kognitif fonksiyon kıyaslaması da yapılamamıştır. Bu kısıtlılıklara rağmen çalışmamızda elde edilen bulgular, metimazol ile oluşturulan hipotiroidi modelinde kognitif fonksiyonları göstermesi ve metimazol uygulaması sonrası uzun dönemde tiroid fonksiyonlarını belirlemesi nedeniyle önem taşımaktadır.

Sonuç olarak metimazol ile oluşturulan sıçan hipotiroidi modelinin öğrenme ve bellekte bozulma oluşturmaksızın, anksiyeteyi azaltıp depresyona eğilimi artırdığı; ayrıca metimazolün hipotiroidi oluşturma etkisinin geçici olduğu görülmüştür. Sunduğumuz çalışma bir ön çalışma olarak değerlendirilerek, elde ettiğimiz bulgulara dayanarak, metimazol ile oluşturulan hipotiroid modelinin, hipotiroidi ve kognitif fonksiyon ilişkisini değerlendirmek için uygunluğunu ve tiroid hormonlarında azalmanın nörokognitif etkisinin mekanizmasını aydınlatmaya yönelik ileri çalışmalar planlanmalıdır. Ayrıca, geç dönem kognitif fonksiyonların değerlendirildiği, farklı farmakolojik etken maddelerin bu fonksiyonlar üzerine etkisinin araştırılacağı uzun izlem süreli deneysel çalışmalar, kronik hipotiroidi hastalarına yaklaşımda yön gösterici olacaktır.

#### **Etik Kurul Onay Bilgisi:**

Onaylayan Kurul: Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu  
Onay Tarihi: 29/03/2021  
Karar No: DA 21/04

#### **Araştırmacı Katkı Beyanı:**

Fikir ve tasarım: O.E.E., S.E.A., M.T.; Veri toplama ve işleme: O.E.E., S.E.A., M.T., K.M.L.; Analiz ve verilerin yorumlanması:

## Hipotiroidizmde Kognitif Fonksiyonlar

O.E.E., S.E.A., M.T., E.Ö., A.S.; Makalenin önemli bölümlerinin yazılması: O.E.E., S.E.A., M.T.

### Destek ve Teşekkür Beyanı:

Bu makalede yer alan çalışmalar DA 21/04 (29/03/2021) nolu proje kapsamında BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ Araştırma Fonunca desteklenmiştir. Sinan KARAÇOCUK'a biyokimyasal analizlere verdiği destek için teşekkür ederiz. Araş. Gör. Ekin EFE'ye histolojik boyama ve analizlere verdiği destek için teşekkür ederiz.

### Çıkar Çatışması Beyanı:

Makale yazarlarının çıkar çatışması beyanı yoktur.

## Kaynaklar

- Vallortigara J, Alfos S, Micheau J et al. T3 administration in adult hypothyroid mice modulates expression of proteins involved in striatal synaptic plasticity and improves motor behavior. *Neurobiol Dis.* 2008;31(3):378-85.
- Boelaert K, Franklyn JA. Thyroid hormone in health and disease. *J Endocrinol.* 2005;187(1):1-15.
- Constant EL, Adam S, Seron X, et al. Anxiety and depression, attention, and executive functions in hypothyroidism. *J Int Neuropsychol Soc.* 2005;11(5):535-44.
- Gulseren S, Gulseren L, Hekimsoy Z, et al. Depression, anxiety, health-related quality of life, and disability in patients with overt and subclinical thyroid dysfunction. *Arch Med Res.* 2006;37(1):133-9.
- Miller KJ, Parsons TD, Whybrow PC, van Herle K, Rasgon N, van Herle A, Martinez D, Silverman DH, Bauer M. Memory improvement with treatment of hypothyroidism. *Int J Neurosci.* 2006;116(8):895-906.
- Oziol L, Faure P, Bertrand N, et al. Inhibition of in vitro macrophage-induced low density lipoprotein oxidation by thyroid compounds. *J Endocrinol.* 2003;177(1):137-46.
- Torun AN, Kulaksizoglu S, Kulaksizoglu M, et al. Serum total antioxidant status and lipid peroxidation marker malondialdehyde levels in overt and subclinical hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2009;70(3):469-74.
- Psarra AM, Solakidi S, Sekeris CE. The mitochondrion as a primary site of action of steroid and thyroid hormones: presence and action of steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2006;246(1-2):21-33.
- Rahaman SO, Ghosh S, Mohanakumar KP, et al. Hypothyroidism in the developing rat brain is associated with marked oxidative stress and aberrant intraneuronal accumulation of neurofilaments. *Neurosci Res.* 2001;40(3):273-9.
- Pérez-Severiano F, Escalante B, Vergara P, Rios C, Segovia J. Age-dependent changes in nitric oxide synthase activity and protein expression in striata of mice transgenic for the Huntington's disease mutation. *Brain Res.* 2002;951(1):36-42.
- Işman CA, Yeğen BC, Alican I. Methimazole-induced hypothyroidism in rats ameliorates oxidative injury in experimental colitis. *J Endocrinol.* 2003;177(3):471-6.
- Hayat NQ, Tahir M, Munir B, et al. Effect of methimazole-induced hypothyroidism on histological characteristics of parotid gland of albino rat. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 2010;22(3):22-7.
- Desouza LA, Ladiwala U, Daniel SM, Agashe S, Vaidya RA, Vaidya VA. Thyroid hormone regulates hippocampal neurogenesis in the adult rat brain. *Mol Cell Neurosci.* 2005;29(3):414-26.
- Cortés C, Eugenin E, Aliaga E, et al. Hypothyroidism in the adult rat causes incremental changes in brain-derived neurotrophic factor, neuronal and astrocyte apoptosis, gliosis, and deterioration of postsynaptic density. *Thyroid.* 2012;22(9):951-63.
- Salas-Lucia F, Pacheco-Torres J, González-Granero S, García-Verdugo JM, Berbel P. Transient hypothyroidism during lactation alters the development of the corpus callosum in rats. an *in vivo* magnetic resonance image and electron microscopy study. *Front Neuroanat.* 2020;14:33.
- Mishra J, Vishwakarma J, Malik R, et al. Hypothyroidism induces interleukin-1-dependent autophagy mechanism as a key mediator of hippocampal neuronal apoptosis and cognitive decline in postnatal rats. *Mol Neurobiol.* 2021;58(3):1196-211.
- O'Hare E, Kim EM, Page D, Reid R. Effects of thyroxine treatment on histology and behavior using the methimazole model of congenital hypothyroidism in the rat. *Neuroscience.* 2015;285:128-38.
- Nunez J. Morris water maze experiment. *J Vis Exp.* 2008;(19):897.
- Komada M, Takao K, Miyakawa T. Elevated plus maze for mice. *J Vis Exp.* 2008;(22):1088.
- Steru L, Chermat R, Thierry B, et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 1985;85(3):367-70.
- Rodriguez A, Zhang H, Klaminder J, et al. ToxTrac: a fast and robust software for tracking organisms. *Met Ecol Evol.* 2018;9:460-4.
- Zhou XL, Han Y, Mail WJ, Liu J, Wang H, Feng L, Gao L, Zhao JJ. Different doses and routes of administration of methimazole affect thyroid status in methimazole-induced hypothyroidism in rats. *West Indian Med J.* 2015;7:65(1):93-97.
- Cakic-Milosevic M, Korac A, Davidovic V. Methimazole-induced hypothyroidism in rats: Effects on body weight and histological characteristics of thyroid gland. *Jugoslavenska Medicinska Biohemija.* 2004; 23: 143-147.
- Hosseini M, Dastghaib SS, Rafatpanah H, Hadjzadeh MA, Nahrevanian H, Farrokhi I. Nitric oxide contributes to learning and memory deficits observed in hypothyroid rats during neonatal and juvenile growth. *Clinics (Sao Paulo).* 2010;65(11):1175-81.
- van Wijk N, Rijntjes E, van de Heijning BJ. Perinatal and chronic hypothyroidism impair behavioural development in male and female rats. *Exp Physiol.* 2008;93(11):1199-209.
- Xu YX, Sun Y, Cheng J, et al. Genetic difference of hypothyroidism-induced cognitive dysfunction in C57BL/6j and 129/Sv mice. *Neurochem Res.* 2019;44(8):1999-2006.
- Chaalal A, Poirier R, Blum D, et al. PTU-induced hypothyroidism in rats leads to several early neuropathological signs of Alzheimer's disease in the hippocampus and spatial memory impairments. *Hippocampus.* 2014;24(11):1381-93.
- Yu D, Zhou H, Yang Y, et al. The bidirectional effects of hypothyroidism and hyperthyroidism on anxiety- and depression-like behaviors in rats. *Horm Behav.* 2015;69:106-15.
- Jin Z, Ling J, Yu J, He M, Ni P, Zhang F, Wang Y. Serotonin 2A receptor function and depression-like behavior in rats model of hypothyroidism. *Exp Brain Res.* 2021;239(8):2435-444.
- Lee J, Yi S, Kang YE, et al. Morphological and functional changes in the thyroid follicles of the aged murine and humans. *J Pathol Transl Med.* 2016;50(6):426-35.
- Gérard AC, Denef JF, Colin IM, van den Hove MF. Evidence for processing of compact insoluble thyroglobulin globules in relation with follicular cell functional activity in the human and the mouse thyroid. *Eur J Endocrinol.* 2004;150(1):73-80.

