

# Deneyisel postnatal hipotiroidinin larenkse etkisi: Tiroid hormon reseptörleri değişiyor mu?

## Laryngeal effect of experimental postnatal hypothyroidism: do thyroid hormone receptors change?

Dr. Aylin Eryılmaz,<sup>1</sup> Dr. Ceren Günel,<sup>1</sup> Dr. Nuket Eliyatkin,<sup>2</sup> Dr. Gökhan Cesur,<sup>3</sup>  
Dr. Mevlüt Türe,<sup>4</sup> Dr. Yeşim Başal<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

<sup>2</sup>Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

<sup>3</sup>Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

<sup>4</sup>Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

### ÖZ

**Amaç:** Bu çalışmada deneyisel olarak oluşturulan postnatal hipotiroidik sıçanlarda larenksteki histopatolojik değişiklikler ve tiroid hormon reseptörleri.

**Gereç ve Yöntemler:** Bu randomize prospektif çalışmada gebe Wistar albino sıçanları takibe alınarak, yenidoğan 20 Wistar albino sıçan yavrusu çalışma için alındı. Yavrular rasgele iki gruba ayrıldı: Grup 1'deki (metimazol (MMI) ile indüklenen hipotiroidi grubu) yavrular 19-22 gün anne sütü ile beslendikleri için, anne ve yavrulara 90. güne kadar MMI ilaveli su verildi. Grup 2'de (kontrol grup), anne ve yavrular 90. güne kadar MMI içermeyen su ile beslendi. Yavrular 90 günlük olunca dekapite edilerek, larenksleri çıkarıldı. Larenksleri ödem, enflamasyon, goblet hücreler ve tiroid hormon reseptörleri (TR- $\alpha$ , TR- $\beta$ ) açısından değerlendirildi.

**Bulgular:** Grup 1 için dokuz, grup 2 için sekiz larenks örnekleri çalışıldı. Hipotiroidi grubunda enflamasyon açısından hafif düzeyde daha düşük anlamlı bir fark gözlemlendi ( $p=0.009$ ). Hipotiroidi grubunda TR- $\alpha$ , TR- $\beta$  ve ödem anlamlı düzeyde daha fazla idi ( $p=0.002$ ,  $p=0.029$ ,  $p=0.029$ ). Goblet hücreleri açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı ( $p=0.637$ ).

**Sonuç:** Hipotiroidide oluşan ses değişikliği mekanizmasına ışık tutar nitelikte histopatolojik olarak larenkste ödem artışı ve tiroid hormon reseptörlerinde artış bulundu.

**Anahtar Sözcükler:** Hipotiroidizm; larenks; tiroid hormon reseptörü.

### ABSTRACT

**Objectives:** In this study, we aimed to investigate the laryngeal histopathological alterations and thyroid hormone receptors in rats with experimentally-induced postnatal hypothyroidism.

**Materials and Methods:** In this prospective, randomized study, pregnant Wistar albino rats were followed and newborn 20 Wistar albino rat pups were included in the study. The pups were randomly divided into two groups: In group 1 (methimazole (MMI)-induced hypothyroidism group), the mothers and pups were given MMI added water up to 90<sup>th</sup> day, as the pups were fed with breast milk for 19 to 22 days. In group 2 (control group), the mothers and pups were fed with MMI-free water up to 90<sup>th</sup> days. When the pups were 90 days of age, they were decapitated and their larynx was removed. Their larynx was evaluated for edema, inflammation, goblet cells, and thyroid hormone receptors (TR  $\alpha$ , TR  $\beta$ ).

**Results:** Nine larynx samples for group 1 and eight for group 2 were studied. There was a significant difference in inflammation between the groups with slightly lower in the hypothyroidism group ( $p=0.009$ ). The TR- $\alpha$ , TR- $\beta$ , and edema were significantly higher in the hypothyroidism group ( $p=0.002$ ,  $p=0.029$ ,  $p=0.029$ ). There was no significant difference in the Goblet cells between the groups ( $p=0.637$ ).

**Conclusion:** Histopathologically increased laryngeal edema and increased thyroid hormone receptors were found, shedding light on the mechanism of voice changes in hypothyroidism.

**Keywords:** Hypothyroidism; larynx; thyroid hormone receptor.



Hipotiroidinin etkilerinden biri de vokal kordları etkileyerek ses değişikliklerine neden olmasındır.<sup>[1-3]</sup> Seste kabalaşma progresif seyrederek konuşmada çabuk yorulma dikkat çeker.<sup>[4]</sup> Hafif hipotiroidide tanı daha zor olup bazen ses değişiklikleri tek semptom olabilir.<sup>[5]</sup> Hipotiroidili hastaların ses analizlerinin yapıldığı bir çalışmada ses değişikliği ve kekemelik saptanmıştır.<sup>[1]</sup> Ayrıca doğuştan hipotiroidili yenidoğanların ağlama seslerinin analizi ses kalitesinin etkilendiğini ortaya koymuştur.<sup>[2]</sup> Hipotiroidinin hangi mekanizmalar ile ses değişikliğine neden olduğunu araştıran çalışmaların sayısı yetersizdir.<sup>[3,6,7]</sup> Bu çalışmalarda öne sürülen mekanizmalar; vokal kordlarda miksödematöz kalınlaşma, krikotiroid kasın ödemi ve vagus sinirinin ambiguous çekirdeğinin ödemidir.<sup>[6,7]</sup> Larenkste tiroid hormon reseptörlerinin araştırıldığı tek çalışma bulunmaktadır.<sup>[3]</sup> Bu çalışmada iki insan kadavrasının larenkslerinde tiroid hormon reseptörleri saptanmıştır.<sup>[3]</sup> Ritter<sup>[8]</sup> 1967 yılında sıçanlarda hipotiroidi oluşturarak larenksteki histopatoloji etkilerini koloidal demir boyanma açısından araştırmıştır. Bizler bu çalışmada, deneysel postnatal dönemde oluşturulan hipotiroidi modelinde larenkste ödem, enflamasyon gibi histopatolojik değişiklikleri ve tiroid hormon reseptörlerinin durumunu araştırmayı amaçladık.

### GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma için ağırlıkları 250-300 g arasında değişen altı aylık dişi Wistar albino sıçanlar gebelik açısından takibe alındı. Sıçanların gebelik kararı vajinal smearla meni tespiti ile konuldu. Yirmi yenidoğan Wistar albino sıçan yavrusu prospektif randomize olarak seçildi ve iki eşit gruba ayrıldı. Hipotiroidi grubu (n=10); Metimazol (MMI) (MMISC-205747A, SantaCruzBiotechnology, Inc., Dallas, TX) (0.025% wt/vol) ile indüklenmekteydi. Sıçan yavruları 19-22 gün anne sütü ile beslendikleri için hem anne hem de yavrular 90. güne kadar aynı MMI ekli günlük su içti. Kontrol grubu (n=10); Bu grupta hem anne hem de yavrular MMI içermeyen su ile beslendi. Her iki gruptaki yavrular 90 günlük olunca dekapite edilerek larenksleri çıkarıldı.

Histopatolojik incelemede doku örnekleri hematoksilen eozin ile boyandı ve tüm alanlar dikkate alınarak larenks yüzey epitelinde goblet hücrelerinin durumu, submukozal ödem ve enflamasyon değerlendirildi. Goblet hücre-

lerinde azalma; var yok şeklinde değerlendirildi. Submukozal ödem ve enflamasyon; dört dereceli subjektif skorlama ile tanımlandı. Buna göre; derece 0 normal, derece 1 hafif, derece 2 orta, derece 3 şiddetli olarak kabul edildi. Daha sonra bu skorlamalar; derece 0 ve 1 bir grubu (yok-hafif), derece 2 ve 3 diğer grubu (orta-şiddetli) oluşturacak şekilde iki alt gruba ayrılarak değerlendirildi. İstatistiksel değerlendirmede bu alt gruplar kullanıldı.

Tiroid hormon reseptörleri (TR-alfa (TR- $\alpha$ ) ve TR-beta (TR- $\beta$ ); 1/300; mouse monoclonal; sc-56873, SantaCruzBiotechnology) immunohistokimyasal boyama ile değerlendirildi. İmmünohistokimyasal boyama için lisizli lamalara kesitler alındı. Uygulama işlemi manuel olarak streptavidin-biotinperoksidaz yöntemi ile yapıldı. Boyalı preparatlar ışık mikroskopisi ile değerlendirildi. Tüm alanlardaki boyanma için hafif, orta ve şiddetli şeklinde subjektif bir skorlama yapıldı. Nükleer boyanmanın yoğun olduğu alanlarda sitoplazmik boyanma da değerlendirildi. Bazı örneklerde larenkse komşu alanlarda tiroid dokusu vardı ve bu tiroid dokusu da internal kontrol olarak kullanıldı.

### İstatistiksel değerlendirme

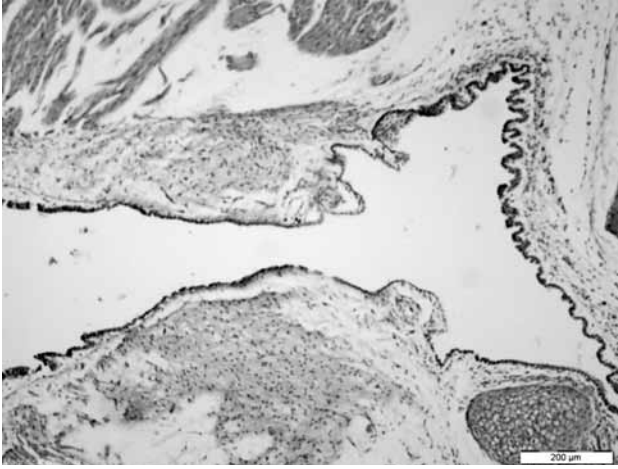
İstatistiksel analizler Windows için IBM SPSS 19.0 versiyon yazılım programı (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) kullanılarak yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler sıçan sayısı 50'nin altında olduğu için sayı olarak verildi. Gruplara göre karşılaştırmada Fisher'in ki-kare testi kullanıldı.

Çalışmanın etik onayı Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan (64583101/2014/136) alınmıştır. Çalışma Helsinki Deklarasyonu ilkeleri uyarınca gerçekleştirildi.

### BULGULAR

Hipotiroidi grubu için dokuz, kontrol grubu için sekiz sıçandan alınan larenks örnekleri çalışıldı. Her iki gruptan toplam üç örnek, doku hasarı nedeniyle çalışılmadı.

Hipotiroidi grubundaki tüm örneklerde enflamasyon, yok-hafif iken, kontrol grubunda sekiz örneğin üçünde yok-hafif, beşinde orta-şiddetli olarak saptandı. Enflamasyon açısından gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı (p=0.009) (Şekil 1).

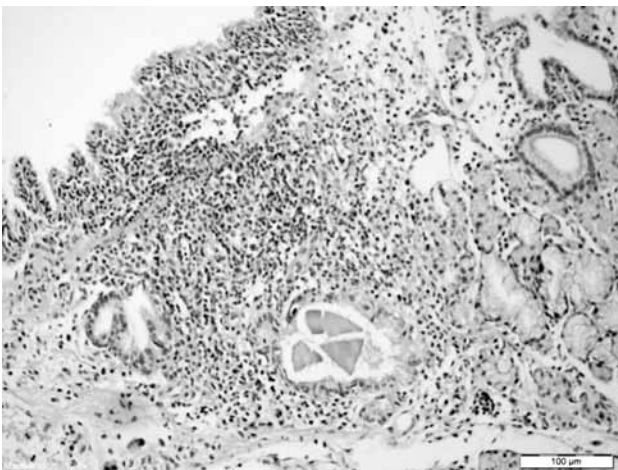


**Şekil 1.** Kontrol grubunda hem epitelde hem de epitel altı dokuda yoğun enflamasyon görülmekte (H-E x 200).

Ödem hipotiroidi grubundaki sıçanların beşinde orta-şiddetli, dördünde yok-hafif iken kontrol grubunda tümünde yok-hafif olarak saptandı. Ödem açısından gruplar arasında farklılık istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p=0.029$ ) (Şekil 2).

Goblet hücreleri hipotiroidi grubunda örneklerin dördünde normal, beşinde azalmış, kontrol grubunda beşinde normal, üçünde azalmış bulundu. Goblet hücreleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı ( $p=0.637$ ).

TR- $\alpha$ ; hipotiroidi grubunda ikisinde yok-hafif, yedisinde orta-şiddetli iken kontrol grubunda tamamında yok-hafif olarak saptandı. TR- $\alpha$  açısından gruplar arasındaki farklılık istatistiksel anlamlıydı ( $p=0.002$ ), (Şekil 3).

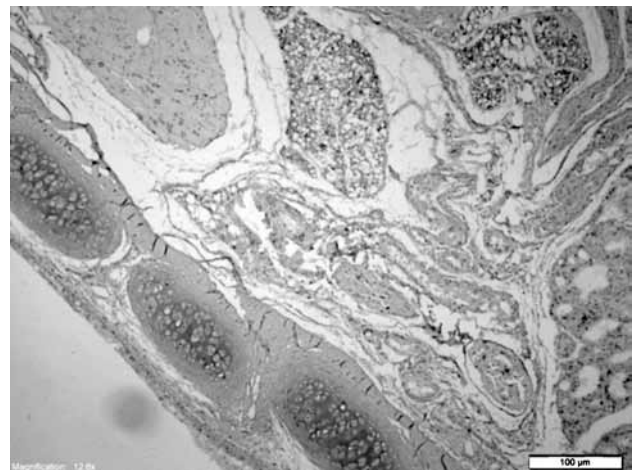


**Şekil 2.** Hipotiroidi grubunda epitel altında ödem ve fibromiksoid materyal birikimi izlenmekte (H-E x 100).

TR- $\beta$ ; hipotiroidi grubunda dördünde yok-hafif, beşinde orta-şiddetli iken kontrol grubunda tamamında yok-hafif olarak saptandı. TR- $\beta$  açısından gruplar arasındaki farklılık istatistiksel anlamlıydı ( $p=0.029$ ).

## TARTIŞMA

Hipotiroidinin klinik bulgularından biri ses karakteristiklerinde değişiklikler ortaya çıkarılmasıdır. Tiroid hormon replasmanının hipotiroidisi olan hastalarda ses karakteristiklerini olumlu yönde değiştirdiği saptanmıştır.<sup>[9]</sup> Hipotiroidideki ses karakteristiklerinde değişikliklere neden olan patofizyolojik mekanizmalar tartışmalıdır ve ortaya konabilen kesin bulgular yoktur. Öne sürülen olası mekanizmalardan bazıları; hipotiroidide vokal kordlarda miksomatöz materyalin birikimi, kriko-tiroid kasta ödem ve vagus sinirinin ambiguous çekirdeğinde ödem gelişimidir.<sup>[6,7]</sup> Vokal kordun lamina propria tabakasında mukopolisakkarit artışı ile beraber sıvı içeriği artarak vokal kord kütlesi artmaktadır. Reinke alanında ödem ve vokal kas gücü kaybına bağlı seste yorgunluk ve kabalaşma oluşabilmektedir.<sup>[6,7]</sup> Ancak bu değişikliklere neden olabilecek patofizyolojik çalışmalar kısıtlıdır. Literatürde tiroid hormon reseptörlerinin ses kısıklığı ile ilişkisini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Biz bu çalışmada larenkste enflamasyon, ödem ve goblet hücrelerinin yanı sıra patofizyolojide rol oynayabileceğini düşündüğümüz, tiroid hormon reseptörlerindeki değişikliği araştırdık.



**Şekil 3.** Hipotiroidi grubunda TR $\alpha$ 1 immüin boyaması ile yoğun boyanma izlenmekte (TR $\alpha$ 1 x100).

Tiroid hormonu T<sub>3</sub>, etkisini hücre çekirdeğinde bulunan tiroid hormon reseptörlerine bağlanarak gösterir. Bu nükleer reseptörler, tiroid hormonlarının fizyolojik aktivitelerinde önemli bir mediatördür.<sup>[10]</sup> Tiroid hormon reseptörleri için insanda alfa ve beta olmak üzere iki adet genin varlığı saptanmıştır. İki insan kadavrasının larenksinde tiroid hormon reseptörleri ile ilgili yapılan bir çalışmada TR- $\alpha$  ve TR- $\beta$  araştırılmış ve laminapropria, kartilaj ve glandüler dokularda TR- $\alpha$ 'nın yoğun olduğu bulunmuştur.<sup>[3]</sup> Tiroid beta reseptörü de lamina propriada yoğun bulunmuştur.<sup>[3]</sup> Tiroid beta reseptörü daha çok beyin, kalp, karaciğer, böbrek, hipofiz ve hipotalamik dokuda saptanmıştır.<sup>[10]</sup> Hipotiroidisi olan sıçanların hipofiz bezlerinde tiroid hormon reseptörlerinin ötiroid olanlara göre arttığı saptanmıştır.<sup>[11]</sup> Hipotiroidi oluşturulan sıçanların beyinlerinde de tiroid hormon reseptörlerinde artış saptanmıştır.<sup>[12]</sup> Hipotiroidisi olan sıçanların epididimlerinde TR- $\alpha$  ve TR- $\beta$  reseptörlerinin arttığı saptanmıştır.<sup>[13]</sup> Biz de çalışmamızda benzer şekilde hipotiroidi oluşturulan sıçanların larenkslerinde hem TR- $\alpha$ 'da hem de TR- $\beta$ 'da normal gruba göre artış saptadık. Hem bizim bulgularımız hem literatürdeki çalışmalar hipotiroidinin, tiroid reseptörlerinde bir artışa neden olduğunu ortaya koymaktadır. Ancak reseptörlerdeki bu artışın ses karakteristiklerindeki değişiklikler gibi klinik bulgulara hangi mekanizmaların yol açtığı hala açık değildir ve araştırılması gerekmektedir. Diğer bulgularımızla birlikte ele aldığımızda bizim öngörümüz bu reseptör artışının ödem oluşumunda enflamasyondan farklı bir mekanizmayı tetiklediğidir.

Çalışmamızda enflamasyon açısından hipotiroidi grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık saptandı. Sonuçlarımıza göre hipotiroidik grupta enflamasyon kontrol grubuna kıyasla belirgin olarak baskılanmıştı. Billon ve ark.<sup>[14]</sup> hipotiroidi ve ateroskleroz ilişkisi ile ilgili deneysel çalışmasının sonuçları bu konuya açıklık getirmektedir. Yazarlar bu çalışmada TR- $\alpha$ 'nın antienflamatuvar etkisini ortaya koymuşlardır.<sup>[14]</sup> Çalışmamızda da hipotiroidi grubundaki tiroid reseptörlerindeki artışın bu gruptaki enflamasyon azalmasına neden olabileceği düşünüldü. Ancak bu parametreler arasındaki ilişki sayı yetersizliği nedeniyle istatistiksel olarak araştırılmadı.

Hipotiroidik hastaların özellikle reinke ödemi ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir.<sup>[15]</sup> Çalışmamızda ödem açısından hipotiroidi gru-

bunda kontrol grubuna kıyasla belirgin artış görüldü. Diğer bulgular ile birlikte değerlendirildiğinde goblet hücrelerinde farklılık olmaması, ödemin goblet hücrelerinin salgılarına bağlı gelişmediğini düşündürdü. Yine hipotiroidik grupta enflamasyonun azalmış olması da enflamasyon dışında bir mekanizma ile ödemin arttığını düşündürdü.

Larenkste tiroid hormon reseptörlerinin saptanmasının klinik açıdan önemli sonuçlar doğurabileceğini düşünmekteyiz. Özellikle hastaların tedaviden fayda görme oranlarının bu reseptör yanıtı ile ilişkili olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu klinik faydayı destekleyen çalışmalardan biri, hipotiroidik sıçanların ciltlerindeki TR- $\alpha$  ve TR- $\beta$  farklılıklarına göre retinoid tedavisine yanıtın değiştiğinin saptanmasıdır.<sup>[16]</sup> Aynı çalışmada TR- $\alpha$  ve TR- $\beta$  farklılıklarına göre cilt proliferasyon, diferansiyasyon ve enflamasyon yanıtlarının değiştiği gösterilmiştir.<sup>[16]</sup>

Larenkste tiroid hormon reseptörlerinin bulunması, tiroid hormonunun larenks gelişiminde, fizyolojisinde ve fonksiyonunda rol alma olasılığını bize düşündürdü.

Bu bulgular ışığında hipotiroidik hastaların ses problemlerinde, larenkste tiroid hormon reseptör yanıtlarının da göz önünde bulundurulabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, hipotiroidide oluşan ses kısıklığının mekanizmasına ve ilerideki tedavilere ışık tutacak şekilde, hipotiroidik sıçanların larenkslerinde artmış ödem bulguları ve tiroid hormon reseptörlerinde artış saptanmıştır.

#### Teşekkür

Annan Menderes Üniversitesi KBB Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Sema Başak'a yazının yazılması ve düzeltilmesi konusundaki önemli katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

#### Çıkar çakışması beyanı

Yazarlar bu yazının hazırlanması ve yayınlanması aşamasında herhangi bir çıkar çakışması olmadığını beyan etmişlerdir.

#### Finansman

Yazarlar bu yazının araştırma ve yazarlık sürecinde herhangi bir finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

#### KAYNAKLAR

1. Mohammadzadeh A, Heydari E, Azizi F. Speech impairment in primary hypothyroidism. J Endocrinol Invest 2011;34:431-3.

2. Boero DL, Weber G, Vigone MC, Lenti C. Crying abnormalities in congenital hypothyroidism: preliminary spectrographic study. *J Child Neurol* 2000;15:603-8.
3. Altman KW, Haines GK, Vakkalanka SK, Keni SP, Kopp PA, Radosevich JA. Identification of thyroid hormone receptors in the human larynx. *Laryngoscope* 2003;113:1931-4.
4. Djrolo F, Houngré F, Attolou V, Hountondji B, Quenum K, Hountondji A. Hypothyroidism: clinical and etiological aspects in Cotonou (Republic of Benin). *Sante* 2001;11:245-9. [Abstract]
5. Bicknell PG. Mild hypothyroidism and its effects on the larynx. *J Laryngol Otol* 1973;87:123-7.
6. Ficarra BJ. Myxedematous hoarseness. *Arch Otolaryngol* 1960;72:75-6.
7. Gupta OP, Bhatia PL, Agarwal MK, Mehrotra ML, Mishr SK. Nasal, pharyngeal, and laryngeal manifestations of hypothyroidism. *Ear Nose Throat J* 1975;56:349-56.
8. Ritter FN. The effects of hypothyroidism upon the ear, nose and throat. A clinical and experimental study. *Laryngoscope* 1967;77:1427-79.
9. Birkent H, Karacalioglu O, Merati AL, Akcam T, Gerek M. Prospective study of the impact of thyroid hormone replacement on objective voice parameters. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2008;117:523-7.
10. Yen PM. Genomic and nongenomic actions of thyroid hormones. In: Braverman LE, Utiger RD, editors. *The Thyroid: Fundamental and Clinical Text*. 9th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p. 135.
11. Li M, Boyages SC. Expression of beta2-thyroid hormone receptor in euthyroid and hypothyroid rat pituitary gland: an in situ hybridization and immunocytochemical study. *Brain Res* 1997;773:125-31.
12. Chattopadhyay N, Kher R, Virmani J, Godbole MM. Differential expression of alpha- and beta-thyroid hormone receptor genes in the developing rat brain under hypothyroidism. *Biol Neonate* 1995;67:64-71.
13. De Paul AL, Mukdsi JH, Pellizas CG, Montesinos M, Gutiérrez S, Susperreguy S, et al. Thyroid hormone receptor alpha 1-beta 1 expression in epididymal epithelium from euthyroid and hypothyroid rats. *Histochem Cell Biol* 2008;129:631-42.
14. Billon C, Canaple L, Fleury S, Deloire A, Beylot M, Dombrowicz D, et al. TR $\alpha$  protects against atherosclerosis in male mice: identification of a novel anti-inflammatory property for TR $\alpha$  in mice. *Endocrinology* 2014;155:2735-45.
15. Benfari G, Carluccio F, Murgiano S, Lentini A. Thyroid gland stimulation test in Reinke's edema. A study of 28 patients. *An Otorrinolaringol Ibero Am* 1992;19:485-91. [Abstract]
16. García-Serrano L, Gomez-Ferrería MA, Contreras-Jurado C, Segrelles C, Paramio JM, Aranda A. The thyroid hormone receptors modulate the skin response to retinoids. *PLoS One* 2011;6:23825.