



## DENEYSEL OLUŞTURULAN HİPERTİROİDİ RAT MODELİNDE HİPERTİROİDİ'NİN ENDOMETRİYUM DOKUSU ÜZERİNE HİSTOPATOLOJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

### INVESTIGATION OF THE HISTOPATHOLOGICAL EFFECTS OF HYPERTHYROIDISM ON ENDOMETRIAL TISSUE IN AN EXPERIMENTAL HYPERTHYROIDISM RAT MODEL

Dilay KARADEMİR<sup>1\*</sup>, Behzad MOKHTARE<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Sivas, Türkiye

<sup>2</sup>Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

**ORCID iD:** Dilay Karademir: 0000-0002-9813-4255; Behzad Mokhtare: 0000-0002-9075-7239

**\*Sorumlu Yazar / Corresponding Author:** Dilay Karademir, **e-posta / e-mail:** dr.dilaykarademir@gmail.com

**Geliş Tarihi / Received:** 24.03.2022

**Kabul Tarihi / Accepted:** 20.06.2022

**Yayın Tarihi / Published:** 30.09.2022

#### Öz

**Amaç:** Bu çalışmada deneysel olarak dişi ratlarda oluşturulan hipertiroidinin uterus üzerinde meydana getirdiği histopatolojik değişikliklerin incelenmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Ağırlıkları 200-220 gr olan yeni erişkin 16 adet Wistar albino dişi rat kullanıldı. Grup 1'e (Kontrol grubu) 25 gün boyunca 3 mL distile su oral yolla verildi, Grup 2'ye 25 gün boyunca 3 mL distile su içinde çözülmüş 100 µg/gün L-thyroxine oral gavaj yoluyla verildi. Uterus dokusu kesitlerinde apoptotik hücre ölümünü tespit etmek için Caspase 3 primer antikoru ile otofajik hücre ölümünü tespit etmek için ise LC3B primer antikoru ile inkübasyon uygulandı. İmmünopozitiflikler değerlendirildi ve histolojik inceleme yapıldı.

**Bulgular:** Apoptotik hücre ölümü açısından her iki grupta da herhangi bir immunopozitiflik görülmedi. Otofajik hücre ölümü açısından gruplar arasında farklılıklara rastlandı. Epitel hücrelerinde bazı yerlerde hiperplazinin olduğu, hücrelerin dejeneratif değişimlere uğradığı gözlemlendi. Endometriumda ödematöz alanlara ve mononükleer inflamatuvar hücre infiltrasyonlarına rastlandı.

**Sonuç:** Hipertiroidinin erişkin rat endometriyumunda ödematöz ve inflamatuvar değişikliklere sebep olduğunu, otofajiyi artırdığını gözlemledik. Otofajideki artışın artan inflamasyonun ve bozulan homeostazisin etkisinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Hipertiroidinin doku düzeyindeki etkilerinin araştırıldığı detaylı moleküler çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler:** Apoptoz, otofaji, endometriyum, deneysel hipertirodi, rat.

#### Abstract

**Objective:** It was aimed to investigate histopathological changes of rat uterus in experimental hyperthyroidism.

**Methods:** 16 new adult Wistar albino female rats weighing 200-220 g were used. Group 1 (Control group) were given 3 ml distilled water for 25 days, Group 2 was given 100 µg/day of L-thyroxine dissolved in 3 mL distilled water by oral gavage for 25 days. In the uterine tissue sections, incubation was performed with the Caspase 3 primary antibody to detect apoptotic cell death and LC3B primary antibody to detect autophagic cell death. Immunositivities were evaluated and histological examination was performed.

**Results:** In terms of apoptotic cell death, no immunopositivity was observed in both group. Differences were found between the groups in terms of autophagic cell death. It was observed that there is hyperplasia in some places in epithelial cells and the cells undergo degenerative changes. In the endometrium, edematous areas and mononuclear inflammatory cell infiltrations were noted.

**Conclusion:** We have observed that hyperthyroidism causes edematous and inflammatory changes in the endometrium of adult rats, increases autophagy. We believe that the increase in autophagy is due to the effect of increased inflammation and impaired homeostasis. Detailed molecular studies are needed to investigate the effects of hyperthyroidism at the tissue level.

**Keywords:** Apoptosis, autophagy, endometrium, experimental hyperthyroidism, rat.

## Giriş

Tiroid hormonlarının (TH), L-tiroksin (3,5,3',5'-tetraiyodotironin, T4) ve L-triiodotironin (3,5,3'-triiodotironin, T3), serum düzeyindeki artışına hipertiroidizm denir.<sup>1</sup> Hipertiroidinin üreme çağındaki kadınlarda prevalansı %1.3'tür.<sup>2</sup> Dünyada diyabetten sonra en sık görülen ikinci endokrin hastalıktır. Hipertiroidi genellikle otoimmün bir hastalık sonucu ortaya çıkar. Kadınlarda erkeklere göre on kat daha sık görülür.<sup>3</sup> Tiroid hormonlarının, tüm vücut sistemlerinin gelişimi ve işlevi üzerinde önemli etkileri vardır. Büyüme ve gelişmeyi uyarırlar, metabolizmayı etkilerler. Merkezi sinir sistemi, kardiyovasküler sistem ve bağışıklık sisteminin düzgün çalışması için gereklidirler. Ayrıca üreme sistemi üzerinde önemli etkileri vardır. Hipertiroidizm birçok sistemin düzgün çalışmasını engelleyebilir.<sup>4</sup> Hipertiroidili hastalarda en sık görülen komplikasyonlar; çabuk yorulma, uykusuzluk, ekzoftalmi, ürtiker, vitiligo, miyopati, hepatomegali, jinekometri, doğurganlığın azalması ve adet düzensizliğidir.<sup>3</sup> Kadınlarda hipertiroidi en sık amenore, oligomenore, hipomenore, anovülasyon ve kısırlığa sebep olmaktadır.<sup>5</sup> Hipertiroidinin kadınlarda %5.8 oranında birincil ve %2.1 oranında ikincil kısırlığa sahip olduğunu gösterilmiştir.<sup>6</sup>

Normal adet döngüsü ve foliküler gelişim için hipotalamus-hipofiz-yumurtalık eksenini ve hipotalamus-hipofiz-tiroid ekseninde denge gereklidir. Oositler, granüloza ve kümülüs hücrelerinde tiroid hormon reseptörleri bulunmaktadır. Bu da TH'larının bu dokunun fonksiyonu üzerinde etkili olduğunu göstermektedir.<sup>7</sup> Ayrıca TH'larının karaciğerde seks hormonu bağlayıcı globulin (SHBG) denilen bir glikoprotein sentezini uyardığı bilinmektedir. Hipertiroidizmde estradiol artışının, estradiolün SHBG'ye artan bağlanmasına ve metabolik klirens hızının azalmasına bağlı olduğu düşünülmektedir.<sup>5</sup> Hipertiroidili kadınlarda ortalama plazma testosteron ve androstenedion seviyelerinin yükseldiği ve bunların periferik dönüşümle estradiol ve estrona dönüşerek seviyelerini artırdığı bulunmuştur. Zaporoshan ve Mescheryakova dişi ratlar üzerinde oluşturdukları deneysel hipertiroidi modelinde, kontrol grubuna göre hipertiroidili ratlarda estradiol konsantrasyonunu 1,5 kat, progesteron konsantrasyonunu ise 1,7 kat daha yüksek bulmuşlardır.<sup>8</sup>

Rahim hamilelik için hayati öneme sahip organdır. En iç tabaka endometrium fonksiyonalsis ve endometrium bazalisten oluşur. Endometrium fonksiyonalsis döngüsel değişiklikleri gösteren kısımdır ve endometrium bazalissiklik değişikliği olmayan kısımdır. Her döngünün sonunda atılan endometrium fonksiyonalsis, endometrium bazaliss tarafından yeniden düzenlenir. Bu süreç ise hormonların etkisi altındadır.<sup>9</sup> Yumurtalıkların hormon aktivitesi endometriyumu etkilemektedir.<sup>10</sup> Ayrıca tiroid hormon reseptörlerinin insan endometriyumda da bulunduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur.<sup>11</sup> Sonuç olarak hipertiroidi genital sistem organlarını ya doğrudan kendi reseptörleri aracılığı ile ya da dolaylı olarak hipofiz eksenini aracılığı ile etkileyerek menstruasyon düzensizliklerine ve infertiliteye sebep olmaktadır.<sup>3</sup>

Bu çalışmada amacımız hipertiroidi oluşturulan ratlarda hipertiroidinin endometriyum üzerinde meydana getirdiği histopatolojik değişiklikleri ve immünohistokimyasal olarak hücre ölüm mekanizmalarını inceleyerek literatüre katkı sağlamaktır.

## Yöntem

Bu çalışma Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Deneysel Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinde deney hayvanları kullanımına uygun olarak yapılmıştır. Çalışma protokolü için Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylı etik izin belgesi alınmıştır (Tarih: 09.11.2021 Sayı: 482).

Araştırmada deney hayvanı olarak yeni erişkin, 16 haftalık, çiftleştirilmemiş, dişi, 200-220 gr 16 Wistar albino rat kullanıldı. Ratlar hava alan tel bir kafeste iki birey olarak bulunduruldu. Hayvanlar laboratuvarın standart hayvan barındırma koşulları ile 12 saatlik aydınlık-karanlık, 21°C sıcaklık, %50-60 nem ve isteğe bağlı alınabilir şekilde standart pellet rat yemi ve su verilerek tutuldu. Dokular alınmadan 12 saat önce katı besinler ve 2 saat önce su diyetten çıkarıldı. 7 günlük adaptasyon süresi sonrası 16 rat random olarak her grupta 8 rat olacak şekilde 2 gruba ayrıldı: Grup 1 Kontrol grubu, Grup 2 Hipertiroidi grubu.

### 1. Kontrol grubu

Gruptaki tüm ratlara 25 gün boyunca çözücü olarak kullanılan 3 mL distile su oral olarak verildi. Uterus dokusu 26. gün laparotomi yapılarak çıkarıldı. Ardından hayvanlar sakrifiye edilmeden önce 1,5 ml'lik kardiyak kan örneği serum tüplerine Tiroid Uyarıcı Hormon (TSH), Serbest Triiodotironin (sT3) ve Serbest Tiroksin (sT4) ölçümü için alındı. İşlem sonrasında tüm ratlar sakrifiye edildi.

### 2. Hipertiroidi grubu

Gruptaki tüm ratlara 25 gün boyunca 3 mL distile su içinde çözülmüş 100 µg/gün L-thyroxine (L-Thyroxine, Sigma, Amerika) oral gavaj yoluyla verildi. Deneysel hipertiroidi modeli oluşturulan ratlarda L-thyroxine dozunu belirlemede Kaplan S. ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmalardan faydalanılmıştır.<sup>1</sup> Uterus dokusu 26. gün laparotomi yapılarak çıkarıldı. Ardından hayvanlar sakrifiye edilmeden önce 1,5 ml'lik kardiyak kan örneği serum tüplerine Tiroid Uyarıcı Hormon (TSH), Serbest Triiodotironin (sT3) ve Serbest Tiroksin (sT4) ölçümü için alındı. İşlem sonrasında tüm ratlar sakrifiye edildi.

Cerrahi işlem için 10 mg/kg ksilazin (Rompun; Bayer, Türkiye) ve 50 mg/kg ketamin (Ketalar; Parke Davis, Türkiye, İstanbul) intraperitoneal enjeksiyon yapılarak hayvanlara anestezi uygulandı ve spontan nefes almaları sağlandı. Tüm cerrahi işlemler aynı cerrah tarafından yapıldı. Ameliyat, oda havasında doku kurumasının etkisini kontrol etmek için her bir rat için 10 dakika ile sınırlandırıldı. Her bir ratın orta hat alt karın bölgesi traş edilerek, iyot çözeltisi ile dezenfekte edildi. Yaklaşık 3 cm uzunluğunda orta hat vertikal insizyonla batına girildi.

### Kan Tiroid Uyarıcı Hormonun (TSH), Serbest Triiodotironin (sT3) ve Serbest Tiroksin (sT4) Ölçümü

Alınan kan örnekleri 2000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilerek serum kısmı ayrıldı. Analiz gününe kadar -80 °C'lik derin dondurucu da saklandı. Serum TSH, sT3 ve sT4 seviyeleri rat ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ticari kitleri (BT Lab, Shanghai, Çin) ile belirlendi.

### Histopatolojik Yöntem

Ratların nekropsileri yapılarak alınan uterus dokuları %10'luk nötral formalin solüsyonunda tespit edildi. Dokular rutin alkol-ksilol takip işlemlerinden geçirilerek parafin bloklara alındı. Poly-lysinli lamlara alınan 5µ'lik kesitler

hematoksilen-eosin ile boyandı. Ödem, mononükleer infiltrasyonu, epitelyal hiperplazi ve epitelyumdaki hücre infiltrasyonu dejeneratif değişimler yönünden ışık mikroskopunda değerlendirildi.

### İmmunohistokimyasal Yöntem

Polilislinli lamlara alınan 5 µm'lik kesitler ksilol ve alkol serilerinden geçirilecek, PBS ile yıkandıktan sonra %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'de 10 dk. tutularak endojen peroksidaz inaktivasyonu sağlandı. Dokulardaki antijeni açığa çıkarmak için antijen retrieval solüsyonu ile 2x5 dk 500 watt' da muamele edildi. Protein blok uygulandıktan sonra PBS ile yıkanan dokular apoptotik hücre ölümünü tespit etmek için Caspase 3 (Biorbyte, Katalog No. Orb382909) primer antikoru ile otofajik hücre ölümünü tespit etmek için ise LC3B (Abclonal, Katalog no. A7198) primer antikoru ile oda sıcaklığında 45 dk. inkubasyona bırakıldı. Sekonder olarak; Large Volume Detection System: anti-Polyvalent, HRP (Thermofischer, Katalog no: TP-125-HL) üretici firmanın önerdiği şekilde kullanıldı. Kromojen olarak DAB (3,3'-Diaminobenzidine) kullanıldı. Mayer's Hematoksilen ile zıt boya yapıldıktan sonra entellan ile kapatılarak ışık mikroskopunda incelendi. İncelemede dokularındaki immunpozitiflikler yok (-), var (+) şeklinde değerlendirildi.

### İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS 22.0 (SPSS Inc. Chicago, Amerika) programı ile yapıldı. Veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak verildi. Verilerin normal dağılımı Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. Gruplar arası karşılaştırmalar student t-testi ile gerçekleştirildi.  $p < 0,05$  olan farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### Bulgular

#### Deney Öncesi ve Sonrası Hayvanların Ağırlık Değişiklikleri

Deney öncesi ve sonrası hayvanların ağırlıkları karşılaştırıl-

dığında, Tablo 1'de görüldüğü gibi deney öncesi hayvanların ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yokken deney sonrası hipertiroidiye bağlı istatistiksel olarak anlamlı kilo kaybı olduğu belirlenmiştir (Çizelge 1,  $p < 0,001$ ).

#### Kan Tiroid Uyarıcı Hormonun (TSH), Serbest Triiyodotironin (sT3) ve Serbest Tiroksin (sT4) Ölçümü

Tablo 2'de gösterildiği gibi ratların serum TSH seviyelerinde hipertiroidi sonrası istatistiksel olarak anlamlı azalma ve sT3 ve sT4 düzeylerinde ise kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 2,  $p < 0,001$ ).

#### Histopatolojik Bulgular

Yapılan hematoksilen-eosin boyamada kontrol grubu ratların uterusları normal histolojik görünümde iken, hipertiroidili ratlarda histopatolojik farklılıklar belirlendi (Çizelge 3,  $p < 0,001$ ). Epitelyum incelendiğinde bazı yerlerde epitel hücrelerinin hiperplaziye uğradığı, bazı yerlerde ise epitel hücrelerinin uniform yapısını kaybederek dejeneratif değişimlere uğradığı gözlemlendi. İlave olarak endometrium kısmında yer yer ödematöz alanlara ve mononükleer karakterde inflamatuvar hücre infiltrasyonlarına rastlandı (Şekil 1).

#### İmmunohistokimyasal Bulgular

Apoptotik hücre ölümü açısından Caspase 3 ile yapılan boyamalarda hem kontrol grubu hem de hipertiroidili gruptaki ratlarda herhangi bir immunpozitiflik görülmedi (Çizelge 4,  $p < 0,001$ ). Otofajik hücre ölümü açısından LC3B ile yapılan boyamalarda ise kontrol grubunda herhangi bir immunpozitiflik gözlenmezken, hipertiroidili ratların uterus dokularında immunpozitifliklere rastlandı. Hipertiroidili ratlarda gözlenen LC3B immunpozitifliği epitel hücrelerinde bazal yerleşimli olarak tespit edildi. Ayrıca immunpozitifliklere tubular bezlerin epitel hücrelerinde de rastlandı (Şekil 2-3).

Çizelge 1. Deney öncesi ve sonrası ratların ağırlık değişiklikleri

Gruplar	Ağırlık (g) - İlk Tartım	Ağırlık (g) - Son Tartım
Kontrol (n=8)	209,87 ± 7,05	223,62 ± 7,28
Hipertiroidi (n=8)	212,00 ± 7,52	196,37 ± 6,36*

Veriler ortalama ± SD olarak verilmiştir (n=8). \* $p < 0,001$  kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

Çizelge 2. Deney gruplarındaki ratların serum TSH, sT3 ve sT4 değerleri

Gruplar	TSH (µU/ml)	sT3 (pg/ml)	sT4 (pmol/L)
Kontrol (n=8)	1,55 ± 0,94	2,15 ± 0,10	6,45 ± 0,31
Hipertiroidi (n=8)	0,82 ± 0,70*	2,89 ± 0,11*	12,33 ± 0,38*

Veriler ortalama ± SD olarak verilmiştir (n=8). \* $p < 0,001$  kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

Çizelge 3. Deney gruplarındaki ratların uteruslarında görülen histopatolojik değişimler

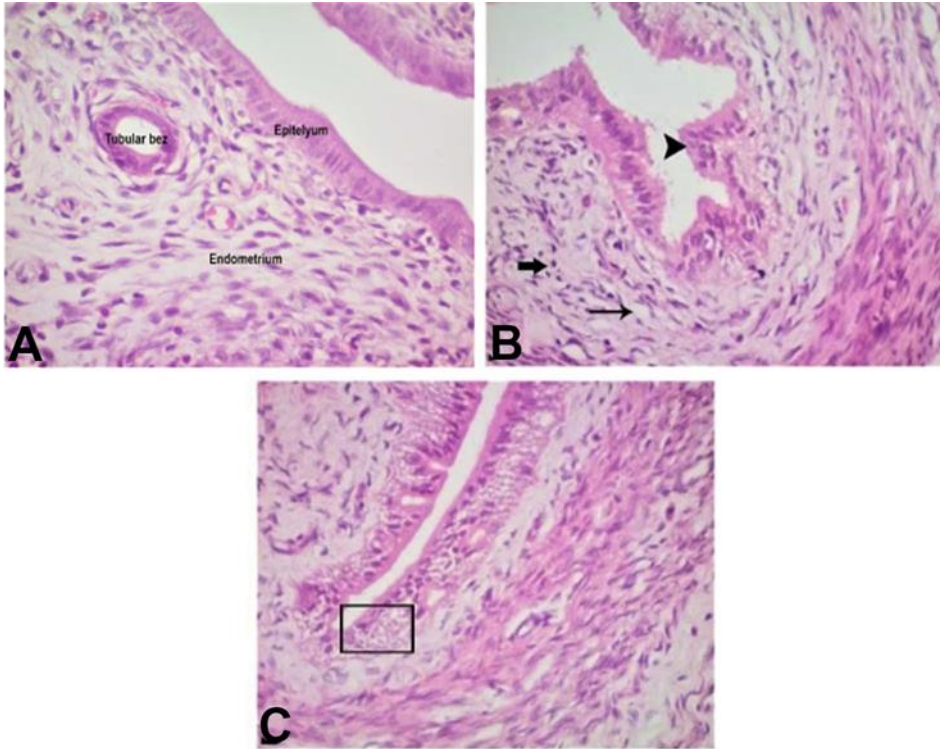
Gruplar	Epitelyumda hiperplazi	Mononükleer hücre infiltrasyonları	Ödem	Epitelyumda dejeneratif değişimler
Kontrol (n=8)	0,16 ± 0,40	0,00 ± 0,00	0,16 ± 0,40	0,16 ± 0,40
Hipertiroidi (n=8)	1,00 ± 0,00*	0,83 ± 0,40*	0,83 ± 0,40*	1,00 ± 0,00*

Veriler ortalama ± SD olarak verilmiştir (n=8). \* $p < 0,001$  kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

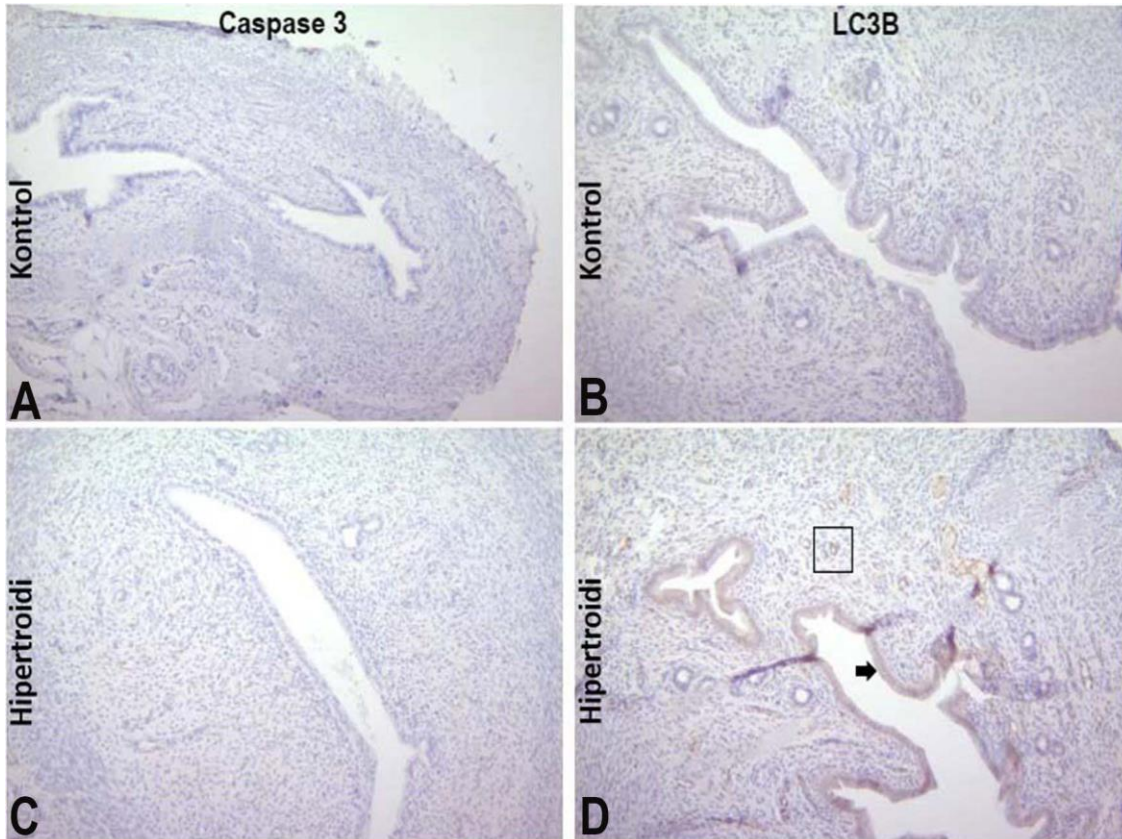
Çizelge 4. Deneysel gruplarındaki ratların uteruslarında Caspase 3 ve LC3B ekspresyon düzeyi.

Gruplar	Caspase 3	LC3B
Kontrol (n=8)	0,00 ± 0,00	0,16 ± 0,40
Hipertroidi (n=8)	0,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00*

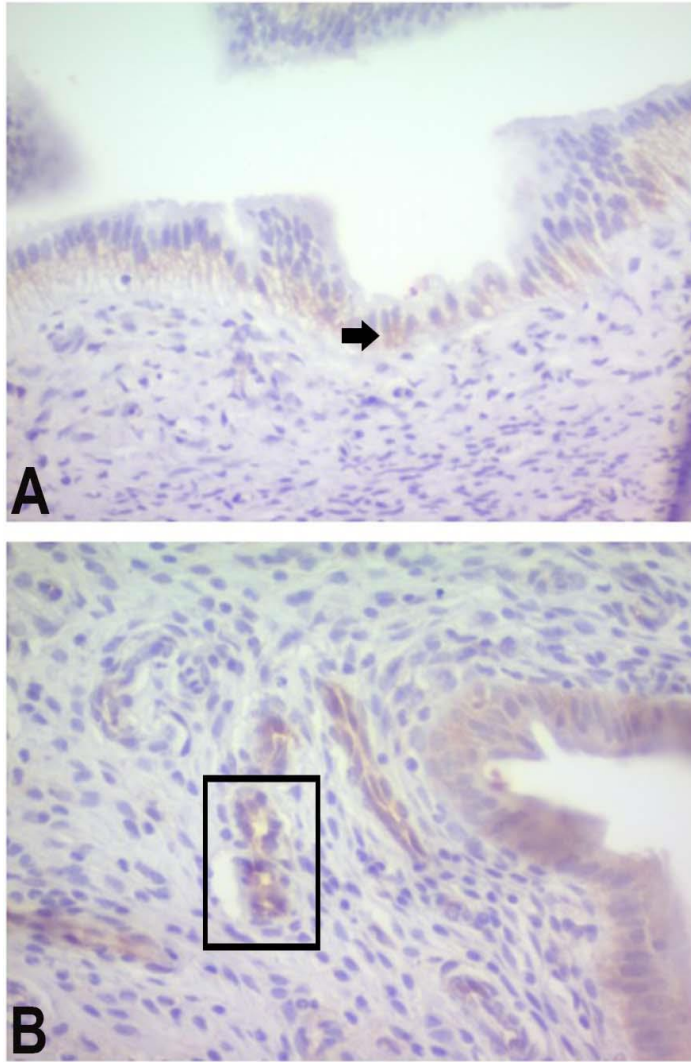
Veriler ortalama ± SD olarak verilmiştir (n=8). \* $p < 0,001$  kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.



Şekil 1. Kontrol grubu: A- Normal histolojik görünüm. Hipertroidi grubu. B- Epitelyumda hiperplazi (okbaşı), mononükleer hücre infiltrasyonları (ok) ve ödem (ince ok), C- Epitelyumda dejeneratif değişimler (□), x40, H-E.



Şekil 2. A- Kontrol grubu: Caspase 3 immunnegatifliği, B- Kontrol grubu. LC3B immunnegatifliği, C- Hipertroidili grup. Caspase 3 immunnegatifliği, D- Hipertroidili grup. Epitel hücrelerinde (ok) ve tubular bezlerde (□) LC3B immunpozitifliği. x10, IHC.



**Şekil 3 Hipertroidili grup:** A- Epitel hücrelerinde LC3B immunpozitifliği (ok), B- Tubular bezlerde LC3B immunpozitifliği (□). x40, IHC.

## Tartışma

Tiroid hormonları normal büyüme, gelişme, üreme sistemi de dahil olmak üzere vücutta tüm sistemlerin gelişiminde önemli bir rol oynar. Hipertiroidizm cinsel olgunlaşmayı da etkileyebilir, menstrüel döngüyü bozabilir, doğurganlığı engelleyebilir ve jinekolojik patolojilere, spontan düşüklere, fetal mortalite oranlarının artmasına neden olabilir. Hipertiroidi, genital sistemlerde ya doğrudan organlardaki kendi reseptörleri aracılığıyla ya da dolaylı olarak hipofiz eksenini üzerinden seks hormonlarında değişiklik yaparak etki edebilir.

Hipertiroidide plazma östrojen, androstenedion ve testosteronun arttığı bilinmektedir.<sup>5,12</sup> Tiroid hormonları, spesifik nükleer reseptörler aracılığıyla uterusu etki gösterir ve bu organların östrojene yanıt vermesini düzenlerler.<sup>2</sup> Innuwa ve Williams hipotiroidide azalan TH'larının etkisiyle uterus hücrelerinde östrojene tepkinin azaldığı, epitelyal ve stromal hücrelerin proliferasyon oranının azaldığını ancak L-tiroksin ile tedavi edildiğinde endometriyum epitelinde kalınlaşma olduğunu bildirmiştir.<sup>13</sup> Çalışmamızda epiltelyumda epitel hücrelerinin hiperplaziye uğradığı, bazı yerlerde ise epitel hücrelerinin uniform yapısını kaybederek dejeneratif değişimlere uğradığını gözlemledik. Bu duruma; hipertiroidizmin hipofiz gonodotropinlerinin seviyesinde artışa neden olarak over stimülasyonunu etkilemesinin ve artan seks steroidleri ile reseptör düzeyinde östrojene artan yanıtın sebep olduğunu

düşünüyoruz. Yapılan çalışmalarda tiroid hormon seviyesinin artması durumunda Fsh ve Lh seviyelerinin de arttığı gösterilmiştir. Ancak bu durumun mekanizması net olarak aydınlatılamamıştır.<sup>5</sup> Stromal östrojen reseptör  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), otokrin ve parakrin mitojenik faktörlerin salgılanmasını uyararak epitelyal proliferasyona neden olmaktadır.<sup>14</sup>

Zaporozhan ve Mescheryakova ratlarda yaptıkları deneysel hipertiroidi çalışmasında dişi ratların endometriyumunu incelediklerinde orta derecede interstisyel ödem, lenfositler, histiyositler tarafından mukozanın orta derecede fokal interstisyel infiltrasyonu, mukozal ve submukozal tabakaların yaygın eozinofilik infiltrasyonunu izlemişlerdir.<sup>8</sup> De vito ve ark. ise tiroid hormonlarının immün yanıtı düzenlediğini, lenfosit seviyelerini artırdığını, lökositlerin kemotaksis, fagositoz ve sitokin sentezi gibi bazı fonksiyonlarını uyardığı bildirmişlerdir.<sup>15</sup> Çalışmamızda endometriyumda yer yer ödematöz alanlara ve mononükleer karakterde inflamatuvar hücre infiltrasyonlarına rastladık. Bu bulgular TH'larının inflamatuvar yanıt üzerindeki etkinliğini desteklemektedir.

Menstrüel döngüde ve gebelikte uterustaki değişikliklerin apoptozisin etkisiyle olduğu ve bunu da steroid hormonlarının düzenlediği bilinmektedir. Morsy ve ark. östrojenin inflamasyonu artırdığını ve apoptozisi baskıladığını söylemişlerdir. Artan estradiolün apoptozisi, özellikle Caspase 3'ü baskıladığını bu yüzden endometriyal hiperplazi ve endometriyum kanserine neden olabileceğinin

göstermişlerdir.<sup>16</sup> Hipertiroidinin apopitozis ve hücre çoğalması aşaması üzerine yapılan bir çalışmada ise hipertiroidinin doğum sonrası rat uteruslarında Caspase 3 aktivitesini baskıladığı görülmüştür. Aktif Caspase 3, apopitotik süreçte ana düzenleyici olarak bilinir.<sup>17</sup> Çalışmamızda uterusu apopitotik hücre ölümünü araştırmak için baktığımız Caspase 3 boyamalarında kontrol grubu ile hipertiroidi grubu arasında anlamlı bir fark izlemedik. Bu duruma hipertiroidi durumunda artan estrogenin neden olduğunu düşüsek de çalışmamızda estrogen değerlerini çalışıp bu durumu ispatlamak daha doğru olurdu. Bu açıdan daha geniş bütçeli çalışmalara ihtiyacımız vardır.

Hücre proliferasyonu ve apopitozis ile yakın ilişkili olan otofaji, menstrüel döngüde, gebelikte desidua oluşumu gibi fizyolojik süreçte, endometriozis, endometriyal karsinom gibi patofizyolojik süreçlerde etkili olmaktadır.<sup>18</sup> Otofaji, homeostazın sağlanması için hücre içi bir öz sindirim yoludur. Tüm ökaryotik hücrelerde bazal düzeyde bulunur. Ancak beslenme bozukluklarında, enfeksiyonda, hormonların etkisiyle, oksidatif stres varlığında daha da aktif hale getirilebilir.<sup>19</sup> Choi ve ark. fare endometriyumda östrojen ve progesteronun otofojiyi negatif yönde düzenlediğini belirtmişlerdir.<sup>20</sup> Zhou ve ark. yaptığı çalışmada ise postmenapozal uterin epitelyal hücrelerde otofajinin premenapozal uterin epitelledeki otofajiye kıyasla daha fazla görüldüğünü bulmuşlardır.<sup>21</sup> Bu çalışmada ise literatürden farklı olarak otofajik hücre ölümü açısından LC3B immünpozitifliğinin, hipertroidili ratlarda kontrol grubuna kıyasla epitel hücrelerinde bazal yerleşimli olarak daha fazla bulunduğunu tespit ettik. Tiroid hormonlarının immün sistem aktivasyonu ve oksidatif denge üzerinde düzenleyici etkisinin olduğu birçok çalışma tarafından ispatlanmıştır.<sup>15,22</sup> Bozulan homeostatik dengenin ve artan stresin hipertiroidik ratlarda uterin epitelyal otofajik hücre ölümünün fazla görülmesinde etkili olduğunu düşünmekteyiz.

Apoptosis ve otofaji sonrası endometrial dokuda meydana gelen hasarlanma menstrüel döngüde düzensizliklere ve infertiliteye sebep olabilmektedir. İnfertil hastaların ve adet düzensizliklerinin değerlendirilmesinde endokrinolojik hastalıkların kesinlikle gözardı edilmemesi gerektiği kanaatindeyiz. Tiroid hormonları ile endometriyal fonksiyonlar arasındaki yakın ilişkinin fizyolojik olarak uyumu, menstrüel döngüde düzensizliğin önlenmesi yanı sıra sağlıklı bir gebeliğin başlaması ve devam etmesi açısından da çok önemlidir.

Gebelik planlaması döneminde yapılacak rutin biyokimyasal testler ile tiroid fonksiyon bozukluklarının tespit ve tedavi edilmesi, tekrarlayan gebelik kayıplarının ve infertilitenin önlenmesi açısından anlamlı sonuçlar doğuracaktır.

## Sonuç

Deneysel olarak oluşturulan hipertiroidi modelinde ratların endometriyumunda otofajinin arttığını, apopitozis açısından farklılık olmadığını belirledik. Ayrıca epitelyumda hiperplazi, interstisyel ödem ve inflamasyon olduğunu bulduk. Otofajik hücre ölümü artışı literatürdeki benzer çalışmalara ait bulgulardan farklıydı. Hipertiroidi, Hipotalamus- Hipofiz- Over aksına etki ederek hormonal düzeyde sistemik değişikliklere sebep olabildiği gibi lokal olarak da reseptör düzeyinde homeostazisde değişikliklere neden olabilmektedir. Çalışmamızdaki otofajik hücre ölümü artışının, hipertiroidinin neden olduğu homeostazisteki dengesizliğe bağlı olduğunu ve hipertiroidinin henüz açıklanmamış birçok rolünün olduğunu düşünüyoruz. Bununla birlikte literatürdeki birçok çalışma hipertiroidinin

sistemik etkileri üzerinde durduğundan, hipertiroidinin doku düzeyindeki etkilerini araştıran detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır. Çalışmamız bu çalışmalara yol gösterici nitelikte olacaktır.

## Çıkar Çatışması Beyanı

Yazarlar arasında çıkar çatışması tarif eden herhangi bir kişi bulunmamaktadır.

## Etik Onay

Bu çalışma Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Deneysel Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinde deney hayvanları kullanımı etik kurallarına uygun olarak yapılmıştır. Çalışma protokolü için Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylı etik izin belgesi alınmıştır (Tarih: 09.11.2021 Sayı: 482).

## Maddi Destek

Çalışmayı maddi olarak destekleyen kişi/kuruluş yoktur.

## Yazar Katkıları

DK, BM: Fikir; DK, BM: Tasarım; DK, BMN: Veri toplama; DK: Kaynak tarama; DK: Analiz ve/veya yorum; DK: Makale yazımı; DK: Eleştirel İnceleme; DK: Yayınlama süreci

## Kaynaklar

1. Kaplan S, Türk A, Aydın H, Erten M, Kırıcı P. Vitamin D improves oxidative stress and histopathological damage in rat ovaries caused by hyperthyroidism. *J Obstet Gynaecol Res.* 2021;47(10):3551-3560. doi:10.1111/jog.14948.
2. Silva JF, Ocarino M. Thyroid hormones and female reproduction. *Biology of Reproduction.* 2018;99(May):907-921. doi:10.1093/biolre/iy0115.
3. Bozoglu H, Karaca T. Oestrogen Receptor Alpha and Progesterone Receptor in Uterus and Ovaries on Different Days of The Oestrus Cycle in Hyperthyroid Rats. *Asian J Med Sci.* 2015;6(4):14-20. doi:10.3126/ajms.v6i4.11816.
4. Kowalczyk-Zieba, I.; Staszkiwicz-Chodor, J.; Boruszewska, D.; Lukaszuk, K.; Jaworska, J.; Woclawek-Potocka, I. Hypothyroidism Affects Uterine Function via the Modulation of Prostaglandin Signaling. *Animals.* 2021; 11, 2636. doi:10.3390/ani11092636.
5. GE Krassas, K Poppe, D Glinoe. Thyroid Function and Human Reproductive Health. *Endocrine Reviews.* 2010; 31(5) 702-755. doi:10.1210/er.2009-0041.
6. Poppe K, Glinoe D, Steirteghem AV, Tournaye H, Devroey P, Schiettecatte J, et al. Thyroid Dysfunction and Autoimmunity in Infertile Women. *Thyroid.* 2002;12(11):997-1001. doi:10.1089/105072502320908330.
7. Mahmud T, Khan QU, Saad S. The Interplay Between Hyperthyroidism and Ovarian Cytoarchitecture in Albino Rats. *Cureus.* 2021;13(4). doi:10.7759/cureus.14517.
8. Zaporozhan V, Mescheryakova N. Histopathological Changes In Testicles And Uterus Of Rats With Hyperthyroidism And Hypothyroidism. *Scripta Scientifica Medica.* 2013;45(4):77-83. doi:10.14748/ssm.v45i4.239.
9. Maruyama T, Masuda H, Ono M, Kajitani T, Yoshimura Y. Human uterine stem/progenitor cells: their possible role in uterine physiology and pathology. *Reproduction.* 2010; 140:11-22. doi:10.1530/REP-09-0438.
10. Lutsyk A, Sogomonian E. Structural, functional, and lectin histochemical characteristics of rat ovaries and endometrium in experimental hyper- and hypothyroidism. *Folia Histochem Cytobiol.* 2012; 50(3):331-339. doi: 10.5603/19742 .
11. Aghajanova L, Stavreus-Evers A, Lindeberg M, Landgren BM, Sparre LS, Hovatta O. Thyroid-stimulating hormone receptor and thyroid hormone receptors are involved in human

- endometrial physiology. *Fertil Steril*. 2011; 95(1): 230-237. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.06.079.
12. Choksi NY, Jahnke GD, Hilaire CS, Shelby M. Role of Thyroid Hormones in Human and Laboratory Animal Reproductive Health. *Birth Defect Res B*. 2003; 68(6):479-491. doi:10.1002/bdrb.10045.
  13. Inuwa IM, Williams MA. A morphometric study on the endometrium of rat uterus in hypothyroid and thyroxine treated hypothyroid rats. *Ups J Med Sci*. 2006;111(2):215-226. doi:10.3109/2000-1967-042.
  14. Wipawee W, Hewitt SC, Orvis GD, Behringer RR, Korach KS. Uterine epithelial estrogen receptor  $\alpha$  is dispensable for proliferation but essential for complete biological and biochemical responses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(45):19272-19277. doi:10.1073/pnas.1013226107.
  15. De Vito P, Incerpi S, Pedersen JZ, Luly P, Davis FB, Davis PJ. Thyroid hormones as modulators of immune activities at the cellular level. *Thyroid*. 2011;21(8):879-890. doi:10.1089/thy.2010.0429.
  16. Morsy MA, Abdelraheem WM, El-Hussieny M, Refaie MMM. Protective effects of irbesartan, an angiotensin receptor blocker with PPAR $\gamma$  agonistic activity, against estradiol benzoate-induced endometrial hyperplasia and atypia in female rats via modulation of TNF $\alpha$ /survivin pathway. *Pharmaceuticals*. 2021;14(7). doi:10.3390/ph14070649.
  17. Freitas ES, Leite ED, Souza CA, Ocarino NM, Ferreira E, Cassali GD, Gomes MG, Serakides R. Histomorphometry and expression of Cdc47 and caspase-3 in hyperthyroid rat uteri and placentas during gestation and postpartum associated with fetal development. *Reprod Fertil Dev*. 2007;19(3):498-509. doi: 10.1071/rd06086.
  18. Yang S, Wang H, Li D, Li M. Role of endometrial autophagy in physiological and pathophysiological processes. *J Cancer*. 2019;10(15):3459-3471. doi:10.7150/jca.31742.
  19. Shen HH, Zhang T, Yang HL, Lai ZZ, Zhou WJ, Mei J, et al. Ovarian hormones-autophagy-immunity axis in menstruation and endometriosis. *Theranostics*. 2021;11(7):3512-3526. doi:10.7150/THNO.55241.
  20. Choi S, Shin H, Song H, Lim HJ. Suppression of autophagic activation in the mouse uterus by estrogen and progesterone. *J Endocrinol*. 2014;221(1):39-50. doi:10.1530/JOE-13-0449.
  21. Zhou S, Zhao L, Yi T, Wei Y, Zhao X. Menopause-induced uterine epithelium atrophy results from arachidonic acid/prostaglandin E2 axis inhibition-mediated autophagic cell death. *Sci Rep*. 2016;6(August 2015):1-14. doi:10.1038/srep31408.
  22. Mancini A, Di Segni C, Raimondo S, et al. Thyroid Hormones, Oxidative Stress, and Inflammation. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:6757154. doi:10.1155/2016/6757154.