

# Hipospadiaslı hastaların sünnet derilerinde tiroid hormonu reseptörü gen mutasyonu var mıdır?

Ali Onur ERDEM<sup>1</sup>, Sezen ÖZKISACIK<sup>1</sup>, Metin ÇALIŞKAN<sup>2</sup>, Nil ÇULHACI<sup>3</sup>, Mesut YAZICI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

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

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

## Öz

**Amaç:** Hipospadias, eksternal üretral meatus penisin ön yüzü orta hatta, anüs ile glans tepesi arasında herhangi bir yerden açıldığı doğumsal bir anomalidir. Epidermal Growth Factor (EGF) insanlarda birçok dokuda bulunur. Hücrelerin çoğunda EGF'ye ait reseptör vardır ve en fazla epitelium hücrelerinde bulunur. EGF salınımını tiroid hormonlarının arttırmasına yönelik çeşitli çalışmalar mevcuttur (1;2). Hipospadiaslı hastaların sünnet derisinde EGF düzeyindeki düşüklüğün, bu dokunun tiroid hormonu ile yeterince uyarılmamasından kaynaklanabileceğini düşündük. Tiroid hormonunun bu dokudaki reseptöründeki herhangi bir mutasyonuna bağlı olarak etkinliğini gösteremediğini varsayarak bu çalışmayı planladık.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmamıza kliniğimizde distal hipospadias nedeniyle opere edilen ve sünnet istemiyle gelen hastalar dâhil edilmiştir. Toplam 40 adet normal ve 40 adet distal hipospadias nedeniyle opere edilen hastalardan alınan sünnet derisi kullanılmıştır. Yerel Etik Kurul onamı alındıktan sonra hastaların tamamının ailelerden çalışma için onam alınmıştır. Her iki dokunun bir kısmı patolojik inceleme için kalan kısmı da dokularda tiroid hormon gen mutasyonu bakılmak üzere genetik laboratuvarına gönderilmiştir. Tüm doku örnekleri tiroglobulin varlığı ve enflamasyon kriterleri açısından değerlendirildi. Tüm sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** Hastaların tümünde yaş aralığı 10 ay-10 yaş (ort. 4.75 yaş) idi. Hipospadias grubundaki hastaların tamamı distal hipospadiaslı hastalardı. Patolojik bulgular değerlendirildiğinde gruplar arasında fark saptanmadı ( $p>0.05$ ). Yine her iki gruptan elde edilen prepsiyum örneklerinde bakılan genetik analiz sonucunda genetik mutasyon saptanmadı.

**Sonuç:** Hipospadias etiolojisinde birçok faktör rol oynamaktadır. Bunlardan bir tanesi tiroid hormonu ve buna dokunun verdiği yanıtı yeterlilik mi yoksa dokuya ulaşan hormon miktarının yetersizliğinin mi daha önemli olduğu hâlâ bilinmemektedir. Biz de doku yanıtının önemli bir parçası olabileceğini düşündüğümüz prepsiyumdaki tiroid hormon reseptör gen mutasyonunun varlığına baktık. Baktığımız temel genetik analizde gen mutasyonu saptanmamış olsa bile spesifik genom alt tiplerindeki mutasyonlarının daha ileri çalışmalarla aranması ve bu veriler ışığında çalışmamızın yine değerlendirilebileceğini düşünmekteyiz.

**Anahtar kelimeler:** Hipospadias, tiroid hormonu, gene mutasyonu

## Abstract

**Is there thyroid hormone receptor gene mutation in foreskins of hypospadias patients?**

**Aim:** Hypospadias is an anomaly which the urethral meatus opens at any place in the midline on the ventral aspect of the penis, between anus, and tip of the glans penis. Epidermal Growth Factor (EGF) is found in many tissues in humans. Majority of cells have EGF receptors and they are found mostly in epithelial cells. There are various studies indicating that thyroid hormones increase the release of EGF. We thought that decrease in EGF levels in the foreskin of hypospadias patients may stem from inadequate stimulation of foreskin with thyroid hormones. We planned this study assuming that thyroid hormones can not demonstrate their effectiveness due to any mutation in the receptor present in this tissue.

**Material and Methods:** The patients who applied for circumcision to our polyclinic, and underwent distal hypospadias repair were included in our study. The preputial tissues of 40 normal individuals, and 40 patients who underwent hypospadias repair surgery were used. After approval of the local ethics committee was obtained, the consent of the families of all was acquired. Half of both tissues was sent to the pathology laboratory for pathological examination and remaining part of the tissues was sent to the genetics laboratory to examine the thyroid hormone gene mutation in the tissue receptors. All tissue samples were evaluated as for presence of thyroglobulin, and criteria of inflammation pathology and genetic analysis results of both groups were compared and evaluated statistically.

**Results:** Ages of the patients ranged between 10 months, and 10 years (median, 4.75 years) idi. All patients in the hypospadias group had distal hypospadias ( $p>0.05$ ). Tissue samples from both groups were examined pathologically and any intergroup difference. Any genetic mutation was not detected as a result of the genetic analysis of foreskin samples obtained from both groups ( $p>0.05$ ).

**Conclusion:** Many factors play a role in the etiology of hypospadias including thyroid hormone and the tissue response to this hormone. It is still not known whether the inadequacy of response given by this tissue or the inadequacy of the amount of hormone reaching tissue is important in this interaction. Thus, we looked at the presence of the thyroid hormone receptor gene mutation in the foreskin that we thought could be an important part of the tissue response. We thought that even if gene mutation is not detected in basic genetic analysis further studies have to be performed to find out the mutations in specific genomic subtypes, while our study is worth evaluating in the light of these studies.

**Keywords:** Hypospadias, thyroid hormone, gene mutation

**Alındığı tarih:** 21.02.2018

**Kabul tarihi:** 20.07.2018

**Yazışma adresi:** Yrd. Doç. Dr. Ali Onur Erdem, Adnan Menderes Üniversitesi Hastanesi Çocuk Cerrahisi Bilim Dalı, 09100 Aydın - Türkiye

**e-mail:** aoerdem@adu.edu.tr

**Yazarların ORCID IDs bilgileri:**

A.O.E. 0000-0002-9584-4200

S.Ö. 0000-0003-3302-727X

M.Ç. 0000-0002-9243-4943

N.Ç. 0000-0001-7181-4675

M.Y. 0000-0003-1960-7825

## Giriş

Hipospadias, üretral meanın penisin ön yüzünde ve daha proksimalde lokalize olduğu bir anomalidir. Üç-yüz erkek çocuktan birinde görülen bu anomalinin nedeni tam olarak bilinmemektedir ve tedavisi cerrahidir<sup>(3)</sup>. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) insanlarda bir çok dokuda bulunmaktadır ve en fazla epitel hücrelerinde görülür. EGF'nin angiogenezis ve kollagenaz aktivitesini uyarıcı etkisi ile yara iyileşmesi üzerinde olumlu etkileri vardır<sup>(4)</sup>.

Hipospadias cerrahisinden sonra stenoz, fistül, yarının tamamen açılması gibi birçok sorun yaşanabilmektedir. Tüm bu sorunlar yara iyileşmesi süreci ile yakın ilişkili görünmektedir. Bu sorunlarla başa çıkabilmek için hipospadiastaki yara iyileşmesine yönelik çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalardan bazılarında hipospadiaslı hastaların sünnet derilerinde yara iyileşmesi üzerine olumlu etkileri olan EGF düzeyine bakılmış ve normal sünnet derileriyle kıyaslandığında hipospadiaslı hastaların sünnet derilerinde düşük olarak saptanmıştır. Bunun da yara iyileşme sürecini olumsuz yönde etkilediği düşünülmüştür<sup>(5)</sup>.

Bu sürece başka açıdan bakıldığında, EGF salınımını tiroid hormonlarının arttırdığına yönelik çeşitli çalışmalar vardır<sup>(1,2)</sup>. Bu çalışmalar ışığında hipospadiaslı hastaların sünnet derilerinde yara iyileşmesi üzerine oldukça etkili olan EGF düzeylerinin düşük olma nedeninin tiroid hormonunun bu bölgeyi yeterince uyarılamamasından kaynaklanabileceğini düşündük. Tiroid hormonlarının tüm hipospadias hastalarında düşük olamayacağını ön görerek, reseptörlerindeki gen mutasyonuna bağlı olarak tiroid hormonunun bu dokuya etkili olamamasından kaynaklanabileceği hipoteziyle bu çalışmayı planladık.

## Gereç ve Yöntem

Çalışmamız Yerel Etik Kurulu onayı alındıktan sonra planlanmıştır. Çalışmamıza sünnet istemi ile başvuran 40 ve distal hipospadiaslı 40 hasta dâhil edildi. Hipospadias grubundaki hastaların en küçüğü 10 aylık, en büyüğü 10 yaşında olup, ortanca yaşları 4.75 idi. Normal sünnet grubunda ise hastaların yaş ortalaması 4.3 idi. Her iki grupta da fizik muayenede herhangi bir ek anomali belirlenmedi. Hastaların tamamı ayrıntılı anamnez, fizik muayene ve tiroid fonksiyon bozuklu-

ğu açısından değerlendirildi. Hiçbir hastada anamnez ve fizik muayene sonunda hipotiroidi düşünülmüdü. Konjenital hipotiroidisi olup, ağır hipospadiaslı 2 olgu çalışmaya dâhil edilmedi. Hastaların tamamının ailesine çalışma hakkında bilgi verildi ve yazılı onamları alındı. Her iki grupta operasyon sırasında alınan sünnet derileri her biri ikiye ayrılıp bir parçası formol içerisinde patoloji laboratuvarına diğer parça ise genetik analiz için genetik laboratuvarına gönderildi. Patolojik olarak sünnet derileri öncelikle makroskopik olarak incelendi, daha sonra histolojik kesitlerde dokudaki tiroglobulin varlığına ve enflamasyon kriterlerine bakıldı. Genetik olarak ise tiroid hormon reseptörlerinde gen mutasyonu varlığına bakıldı.

## Patolojik inceleme

Tüm doku örnekleri %10'luk tamponlanmış formalin solüsyonunda fikse edildi. Rutin doku takibi sonrasında parafine gömüldü. Hazırlanan parafin bloklardan 4 mikronluk kesitler hazırlanıp bir lam genel histopatolojik değerlendirme için hematoksilin-eozin boyası ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi. Bu kesitlerde dokulardaki enflamasyon ve konjesyon semikantitatif olarak değerlendirilip skorlandı. Diğer bir kesit ise lizimli lama alınıp tiroglobulin ile boyandı ve tiroglobulin varlığı pozitif/negatif olarak sonuçlandırıldı.

## Genetik inceleme

Genetik analizde DNA izolasyonu ve genotiplendirme yöntemleri ile dokular değerlendirildi. Bu yöntemler;

## DNA izolasyonu

Dokulardan genomik DNA ekstraksiyonu üretici talimatlarına uygun olarak gerçekleştirildi. DNA konsantrasyonu ve saflığı NanoDrop 2000 Spektrofotometre (Thermo Scientific) kullanılarak, absorbans metodolojisi ile değerlendirildi.

## Genotiplendirme

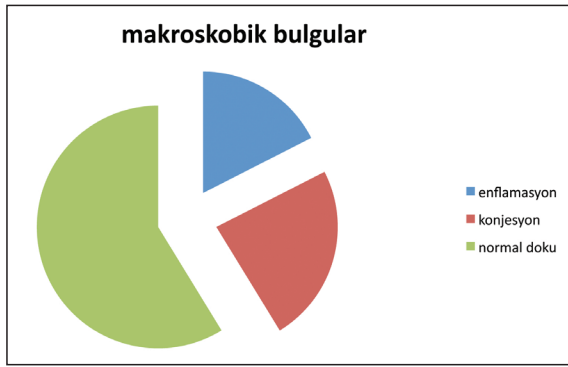
SNP, TIB-MolBiol (SimpleProbe® temelli assay)'ün LightSNiP paneli kullanılarak gerçek zamanlı PZR ile belirlendi. LightSNP testinde bulunan SimpleProbe® tekli baz uyumsuzluklarını tespit ederek, polimorfizmlerin analizini mümkün kılmaktadır. THRB geni P453T polimorfizmi, LightCycler 1.5 (Roche) gerçek zamanlı PZR cihazı kullanılarak erime ısısı analizi ile belirlendi.

Bütün veriler ortalama ve  $\pm$  standart hata şeklinde he-

saplandı. Gruplar t testi genel lineer modeli ve Anova Tukey's multiple comparison test kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Sonuçlar p değerinin 0.05'den küçük olması durumunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## Bulgular

Patolojik olarak dokularda, makroskopik incelemede (Şekil 1) ve tiroglobulin seviyesinde gruplar arasında herhangi bir fark saptanmadı ve istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p>0.05$ ).



Şekil 1.

Genetik olarak dokular A260/A280 aralığında absorban değerlerine bakıldı ve tüm örnekler yabancı tip yani sitozin bazı çıktı. Hiçbir dokuda tiroid hormon gen mutasyonuna rastlanmadı.

## Tartışma

Hipospadias üretral meatusun penis ön yüzünde normalden daha proksimale açılmasıdır. Hipospadias etyolojisine yönelik birçok hipotez ortaya atılmıştır. Çevresel ve genetik bir çok farklı nedenin değişik oranlarda hipospadias gelişiminde etkili olduğu bilinmektedir. Bunlar arasında maternal hormonal durum, cinsiyet steroid metabolizması ve genetik faktörler ön plana çıkmaktadır<sup>(6)</sup>.

Fetal gelişim evrelerinde erkek dış genital sisteminin farklılaşması SRY, SOX9, WT1, SRD5A2 ve AR gibi çeşitli genomların önemli etkisi altındadır. Bu genlerde meydana gelecek olan mutasyonlar hipospadias gelişimini de tetikleyebilir. Çin'de yapılan iki çalışma ile SRD5A2, AR ve WT1'deki mutasyonların hipospadias ile ilişkili olduğu gösterilmiştir<sup>(7,8)</sup>. Ancak bu

mutasyon analizlerinde elde edilen sonuçların yalnızca hipospadias spesifik olmadığı, tüm genital sistemi etkilediği görülmüştür<sup>(5,6)</sup>.

Dış genitalyanın gelişiminde rolü olan genetik mutasyon dizilimlerinden bazıları SRY (erkek gonadal farklılaşması), SOX9 (sertoli hücre farklılaşması), GATA4, FOG2 (erkek gonadogenezisi), WNT4 (müllerien kanal oluşumu), DAX1 (dişi gonadogenezisi), SHH (genital tüberkül gelişimi)'dir. CHARGE sendromu, CHODGE sendromu, Denys-Drash sendromu ve Frasier sendromu gibi genetik sendromlarda gen mutasyonları saptanmış ve dış genitalyada gelişim anomalileri gösterilmiştir<sup>(9)</sup>. Tüm bu genetik mutasyonlarda hipospadias ile ilişkili anomaliler saptanmasına rağmen, spesifik tanısal bir mutasyon saptanmış değildir ve bu konudaki arayış hâlen devam etmektedir. Bu çalışmamızda ise spesifik bir gen mutasyonu saptamadık.

Yapılan bazı çalışmalarda, hipospadiaslı hastaların sünnet derilerindeki EGF düzeyinin normal sünnet derisindeki EGF düzeyinden daha düşük olduğu saptanmıştır<sup>(5)</sup>. Düşük EGF düzeyinin de yara iyileşmesini olumsuz etkilediği bilinmektedir. Tiroid hormonlarının ise EGF salınımını arttırdığını gösteren çeşitli çalışmalar vardır<sup>(1,5)</sup>.

Tiroid hormonunun üretimi, tiroid hormon reseptörü ile beraber geri beslemeli (negatif feedback) olan bir mekanizma ile yürür. Bu mekanizma; dolaşımdaki yüksek seviyedeki tiroid hormonlarına yanıt olarak hipotalamusta ve hipofiz bezinde tiroptin salıcı hormon ve tirotropin (TSH) üretimini düşürür. Konjenital hipotiroidisi olan iki hastamızda ağır hipospadias olması nedeniyle tiroid hormonunun hipospadiasla yakından ilişkili olduğunu düşündük. Ancak hipospadiaslı olguların tamamında hipotiroidi olmadığı göz önünde bulundurulduğunda bu durumu açıklayabilecek başka bir hipotez geliştirdik. Tiroid hormonunun doku düzeyinde etkinliğinin yeterince olmayıp, EGF seviyesinde azalmaya ve yine dokuda androjen reseptör seviyesinin düşmesine sekonder olarak hipospadias neden olabileceğini düşündük. Bu durumu da açıklayabilecek olan dokudaki tiroid hormon reseptörlerinde mutasyon varlığı hipotezini geliştirdik. Bu güne kadar tiroid hormon reseptöründe yaklaşık 150 farklı mutasyon saptanmıştır<sup>(10)</sup>. Ancak bunlardan hiç birinde hipospadias ile bağlantılı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda, genetik olarak dokular

A260/A280 aralığında absorbanans değerlerine bakıldı ve tüm örnekler yabancı tip yani sitozin bazı çıktı. Bir transversiyon yani adenin veya guanine dönüşüm (substitution) olsaydı anlamlı bir sonuç bulmuş olacaktık. Ancak sonuç olarak tüm grup ve kategoriler için anlamlı sonuç elde edememiş olduk. Bu veriler ışığında genetik analizde mutasyon saptayamamış olsak da farklı gen allelerine yönelik yapılacak çalışmalarla spesifik gen mutasyonları saptanabileceğini düşünmekteyiz. Son yıllarda bazı çalışmalar Avrupa ülkelerinde hipospadias görülme oranında artış olduğunu bildirmektedir. Bunun için özellikle in vitro fertilizasyon veya gebeliği kolaylaştırmak için kullanılan progesteron/östrojen ilaç tedavileri suçlanmıştır. Ancak yine de hipospadiasın asıl etyolojik zemini belirsizliğini korumaktadır. Ailesel vakalar hipospadias vakalarının önemli bir yüzdesini oluşturur ve bu durum etiolojide genetik faktörlerin rol aldığını göstermektedir<sup>(11)</sup>. Yine bir başka çalışmada, androjen reseptör kusuru olan genetik sendromlarda ağır hipospadias olgularının olduğu bildirilmektedir<sup>(12)</sup>. Biz de çalışmamızda, bu faktörlerden birisi olabilecek olan, dokuda tiroid hormon gen mutasyonu varlığını aradık ancak bulamadık.

Tiroglobulin yalnızca tiroid dokusundan salınabilen ve dolaşımdaki TSH seviyesinden direkt etkilenen bir parametredir. Eğer dokuda reseptör mutasyonu mevcut ise tiroid hormon seviyesi yükselecek ve bu da TSH seviyesinde azalmaya dolayısıyla dokuda da tiroglobulin seviyesinde azalmaya neden olacaktır<sup>(13)</sup>. Çalışmamızda da tüm dokularda bakılan tiroglobulin negatif olarak saptanmıştır. Normal sünnet derisinde de dokuda tiroglobulin saptanmamış olması dokuda bakılacak tiroglobulin seviyesinin hipospadias tanısında anlamlı olmayacağını düşündürmektedir.

Hipospadiaslı hastaların sünnet derilerindeki EGF düzeyinin normal sünnet derisindekinden daha düşük olduğu göz önüne alındığında<sup>(5)</sup>, hipospadiaslı hastaların sünnet derilerinde düşük EGF düzeyinin EGF salınımını esas olarak uyaran tiroid hormonunun bu dokuda etkili olamamasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Bunun da nedeninin tiroid hormonu reseptöründeki düşüklükten ya da reseptörlerdeki gen mutasyonuna bağlı olarak tiroid hormonunun bu dokuya etkili olamamasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda, genetik mutasyon saptanmamış olsa bile tiroid hormon gen mutasyonun

farklı genomlarındaki varlığının daha ileri çalışmalarla araştırılması, yapısal farklılıkların olup olmadığının değerlendirilmesi ile elde edilen veriler daha anlamlı bir yapı kazanacaktır.

## Kaynaklar

1. Brzezinski J, Lewinski A. Increased plasma concentration of epidermal growth factor in female patients with non-toxic nodular goitre. *Eur J Endocrinol*. 1998;138:388-93. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1380388>
2. Yoshida K, Aiyama S, Uchida M, Kurabuchi S. Role of thyroid hormone in the initiation of EGF (epidermal growth factor) expression in the sublingual gland of the postnatal mouse. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2005;284:585-93. <https://doi.org/10.1002/ar.a.20197>
3. Snodgrass W, Macedo A, Hoebeke P, Mouriquand PD. Hypospadias dilemmas: a round table. *J Pediatr Urol*. 2011;7:145-57. <https://doi.org/10.1016/j.jpuro.2010.11.009>
4. Lin J, Xie C, Chen R, Li D. Effect of epidermal growth factor and testosterone on androgen receptor activation in urethral plate fibroblasts in hypospadias. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2016;41:507-12.
5. El-Galley RE, Smith E, Cohen C, Petros JA, Woodard J, Galloway NT. Epidermal growth factor (EGF) and EGF receptor in hypospadias. *Br J Urol*. 1997;79:116-9. <https://doi.org/10.1046/j.1464-410X.1997.22624.x>
6. Baskin LS, Himes K, Colborn T. Hypospadias and endocrine disruption: is there a connection? *Environ Health Perspect*. 2001;109:1175-83. <https://doi.org/10.1289/ehp.011091175>
7. Wang R, Dong Z, Wang W, Xiao Y, Ni J, Wang D. Mutation analysis of the SRD5A2, AR and SF-1 genes in 52 Chinese boys with hypospadias. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2013;26:887-93. <https://doi.org/10.1515/jpem-2012-0316>
8. Wang Y, Li Q, Xu J, Liu Q, Wang W, Lin Y, Ma F, Chen T, Li S, Shen Y. Mutation analysis of five candidate genes in Chinese patients with hypospadias. *Eur J Hum Genet*. 2004;12:706-12. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201232>
9. Blaschko SD, Cunha GR, Baskin LS. Molecular mechanisms of external genitalia development. *Differentiation*. 2012;84:261-8. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2012.06.003>
10. Kassak F, Hana V, Saudek V, Kostrouchova M. No-

- vel mutation (T273R) in thyroid hormone receptor beta gene provides further insight into cryptic negative regulation by thyroid hormone. *Folia Biol (Praha)*. 2017;63:60-6.
11. Caione P. Prevalence of hypospadias in European countries: is it increasing? *Eur Urol*. 2009;55:1027-9. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2009.01.051>
  12. Holmes NM, Miller WL, Baskin LS. Lack of defects in androgen production in children with hypospadias. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:2811-6. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-032098>
  13. Medeiros-Neto G, Targovnik HM, Vassart G. Defective thyroglobulin synthesis and secretion causing goiter and hypothyroidism. *Endocr Rev*. 1993;14:165-83. <https://doi.org/10.1210/edrv-14-2-165>