



Letter

갑상샘기능저하증에 따른 생식샘기능저하증 모델 정립을 위한 제언

윤상필¹, 김정우², ✉

¹제주대학교 의과대학 해부학교실, ²원광보건대학교 임상병리학과

How to design male hypothyroid hypogonadism model by Sang-Pil Yoon¹, Jung Woo Kim² (¹Department of Anatomy, School of Medicine, Jeju National University, Jeju-Do, Republic of Korea; ²Department of Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health Science University, Iksan, Republic of Korea)

Abstract Hypogonadism is a clinical syndrome that results in hormone deficiency and can be classified as 1) primary caused by the gonadal failure and 2) secondary by the hypothalamus-pituitary gland dysfunction and/or cardiometabolic complications. Recently the presence of thyroid hormone receptors in different testicular cell types was demonstrated, and thus thyroid dysfunctions would be another cause of secondary hypogonadism. Thus, we investigated the effects of perinatal hypothyroidism on hypogonadism in male Sprague-Dawley rats. Perinatal hypothyroidism was induced by daily administration of 0.05% 6-propyl-2-thiouracil (PTU) by tap water from gestation day 15, which were compared with negative control (PTU (-)) group. At postnatal day 28, hypothyroid pups were divided into 2 groups: PTU (+) group - continued PTU treatment and PTU (+/-) group - stopped PTU until postnatal day 49. Body weights, dehydrotestosterone (DHT), and testosterone levels were checked 2 and 3 weeks after grouping. Body weights were significantly decreased in PTU (+) and PTU (+/-) groups compared with PTU (-) group at postnatal day 28. 3 weeks later, PTU (+/-) group significantly gained weight compared with PTU (+) group. DHT and testosterone levels significantly decreased with PTU treatment, but increased 3 weeks after stopping PTU administration. Perinatal PTU-induced hypothyroid hypogonadism was sustained for 2 weeks after stopping PTU administration, but restored gonadal hormone levels 3 weeks after stopping PTU. These results suggest that researchers should design an experiment on hypothyroid hypogonadism based on the estimated period.

Key words: Hypogonadism, Hypothyroidism, Propylthiouracil, Mouse

서 론

생식샘기능저하증 (성선기능저하증, hypogonadism)은 성 호르몬의 분비가 감소되어 나타나는 일련의 임상적 증후군이다. 생식샘기능저하증은 생식샘 (gonad, 고환과 난소) 자체의

기능저하에 의한 일차성 생식샘기능저하증, 시상하부-뇌하수체 (hypothalamus-hypophysis) 기능 부전에 의한 이차성 생식샘기능저하증으로 분류한다.¹⁾ 남성의 이차성 생식샘기능저하증의 원인으로 고혈압, 2형 당뇨병, 대사증후군, 심혈관질환과 같은 질환군 (cardiometabolic complications)이 제시되기도 하였다.²⁾

생식샘기능저하증에서 변하는 호르몬은 progesterone, dihydrotestosterone (DHT), anti-Mullerian hormone, activin, inhibin 등이 있고, 남성에서는 남성호르몬 (androgen, testosterone)이 낮은 여성호르몬결핍증 (hypoandrogenism)으로 인

Received: April 4, 2019; Revised: April 15, 2019; Accepted: April 16, 2019

✉ Correspondence to: Jung Woo Kim

Department of Clinical laboratory Science, Wonkwang Health Science University, 514 Iksandae-ro, Iksan-Si, Jeollabuk-Do 54538, Republic of Korea

Tel: 82-63-840-1114, FAX: 82-63-840-1566

E-mail: kjungw1024@hanmail.net

해 임상 증상이 나타난다.¹⁾ 고환은 갑상샘호르몬에 반응하지 않는 것으로 보고³⁾되었기 때문에 20세기까지 갑상샘 기능부전이 남성 생식 능력에 미치는 영향은 없는 것으로 간주되었다. 그러나 동물뿐만 아니라 사람에서도 고환 세포에 갑상샘호르몬 수용체가 존재한다는 것이 증명됨에 따라 고환이 갑상샘호르몬의 표적 기관 중 하나임이 밝혀졌다.^{4,5)} 갑상샘호르몬은 버팀세포(supporting cell, Sertoli cell)의 증식을 억제하고,⁶⁾ 분화를 촉진하며,⁷⁾ 버팀세포와 정조세포(spermatogonia) 사이의 치밀이음(tight junction) 합성을 억제한다.⁸⁾ 사춘기 이후 버팀세포는 증식을 멈추고 분화를 시작한다. 이때 triiodothyronine (T3)이 버팀세포의 수를 결정하는데, 이는 성인의 고환 용적 및 정자 수와 비례한다고 보고되었다.⁹⁻¹¹⁾ 갑상샘호르몬은 사이질세포(interstitial cell, Leydig cell)에도 영향을 준다. 생쥐의 경우 T3의 노출 정도에 따라 스테로이드 생합성(steroidogenesis)이 영향을 받았다. T3는 단기적으로 steroidogenic acute regulatory protein 발현을 조절하여 스테로이드 생합성을 증가시키지만, 장기적으로는 억제하였고, 버팀세포 등에는 결분비기전(paracrine mechanism)을 통해 영향을 준다.^{10,12,13)}

갑상샘기능저하증 모델은 methimazole,¹⁴⁻¹⁶⁾ 6-propyl-2-thiouracil (PTU),¹⁷⁻¹⁹⁾ radioactive ¹³¹I²⁰⁾ 등을 이용하여 유도되었다. 시기적으로 갑상샘기능저하증이 생식샘의 성장에 미치는 영향을 확인하기 위해 출생 직후^{14,19)} 또는 임신 중기부터 말기^{15,16,18)}에 갑상샘기능저하증을 유도하였고, 출생 후 30일부터 90일까지 관찰하였다. 임신 중인 태아부터 갑상샘기능저하증을 유도한 모델에서 부고환 중량이 감소하고, 정자의 운동성이 감소하며, 생물학적 활성을 지닌 남성호르몬(테스토스테론, DHT, 17 β -estradiol)과 그 수용체의 활성이 감소하였다. 결과적으로 갑상샘기능저하증 모델에서 혈청 테스토스테론은 유의하게 감소하였고, 사정을 포함한 성행동이 감소하였으며, 정낭(seminal vesicle)과 전립샘(prostate)의 무게가 감소하였다.^{14,20)} 임신성 갑상샘기능저하증은 수컷 새끼들에 정자 활동성 이상, 남성호르몬 생물학적 이용도(bioavailability) 감소, 남성호르몬 수용체 발현 및 기능 감소, 부고환의 분비능 감소와 같은 이상을 초래하였다.^{15,16)}

Chang 등¹⁸⁾은 흰쥐 모델에서 정세관의 성숙과 정자발생이 출생 후 7주면 완성되지만, 주산기 갑상샘기능저하증에서는 출생 후 7주까지 정세관의 성숙이 완성되지 못함을 보고하였다. 더불어 스테로이드 생합성에 관여하는 steroidogenic acute regulatory-related lipid transfer (START) domain-containing 6 (StarD6)가 정상 정세관의 정자발생 세포에 주로 발현되지만, 주산기 갑상샘기능저하증 새끼에서는 사이질세포에서 발현

됨을 보고하여 갑상샘호르몬이 고환세포의 발생에 영향을 준다는 것을 증명하였다. 따라서 본 연구에서 임신 중인 흰쥐에 PTU를 이용하여 주산기 갑상샘기능저하증을 유도한 후 생식샘기능저하증 모델을 정립할 수 있는 근거를 생식샘호르몬 측정을 통해 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

임신 9일 Sprague-Dawley 흰쥐를 다물사이언스(대전, 대한민국)에서 구입하여 사용하였다. 실험동물은 12시간 주기로 명암을 조절한 환경에서 물과 음식을 자유롭게 먹을 수 있게 하였다. 동물 실험에 대한 모든 과정은 제주대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받았다(2010-0037).

갑상샘기능저하증 모델(Fig. 1)

주산기 갑상샘기능저하증 모델은 Chang 등¹⁸⁾의 방법을 따랐다. 즉, 0.05% PTU (Antiroid™, 부광약품, 대한민국)를 음용수에 적용하여 임신 15일째부터 출생 후 49일까지 경구로 투여하였다. PTU를 투여하지 않은 군(PTU(-))을 정상대조군으로 삼았다. 출생 후 28일에 수컷 새끼를 다시 PTU를 지속적으로 투여한 군(PTU(+))과 PTU를 중단한 군(PTU(+/-))으로 구분하였다.

각 군의 새끼(n=9)는 출생 후 28일부터 매주 체중의 변화를 측정하였다. 군을 구분한 후 각각 2주, 3주째 되는 날 각 개체는 마취상태에서 혈액을 채취하여 혈청 DHT 및 테스토스테론 농도를 측정하였다. 혈청 내 스테로이드의 측정은 메탄올로 추출하고 이를 모두 증발시킨 시험관에 gelatin phosphate-buffered saline (GPBS, NaH₂PO₄/L; 2.35 g, Na₂HPO₄/L; 14.54 g, NaCl/L; 8.8 g, Thiomersal/L; 0.1 g, Gelatin/L; 1.0 g, pH 7.4)으로 재조성하여 방사성면역측정법(radioimmunoassay, RIA)을 행하였다. 스테로이드 recovery는 스테로이드 모두에서 85% 이상이었다.

테스토스테론 및 DHT의 RIA²¹⁾는 추적자로 테스토스테론([1,2,6,7-³H]testosterone, 98Ci/mmol) 및 DHT(5- α dihydro [1,2,4,5,6,7-³H]testosterone, 129Ci/mmol)을 Amersham (Buckinghamshire, England)로부터 구입하여 사용하였다. RIA에 사용된 testosterone-3-CMO- BSA과 5 α dihydro-testosterone-1 BSA를 토끼에 면역 주사하여 항혈청을 얻은 것을 사용하였다. 항체 테스토스테론의 교차 반응도는 DHT와 14% 그리고 다른 항체와는 0.01% 이하를 나타냈다.²²⁾

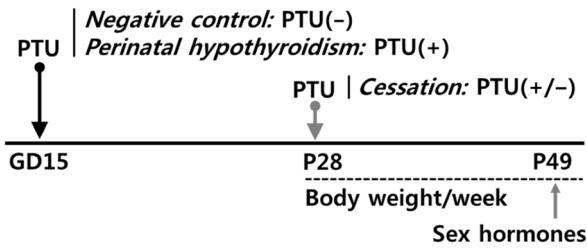


Figure 1. Experimental schema. Perinatal hypothyroidism model was induced by 6-propyl-2-thiouracil (PTU) administration from gestation day (GD) 15 until postnatal day (P) 49 whereas vehicle treated pups were considered as negative control (PTU(-)). At P28, perinatal hypothyroid male pups were divided into two groups: continuation group (PTU(+)) and cessation group (PTU(+/-)). Body weight was estimated per week from P28, and sex hormones were checked at P49.

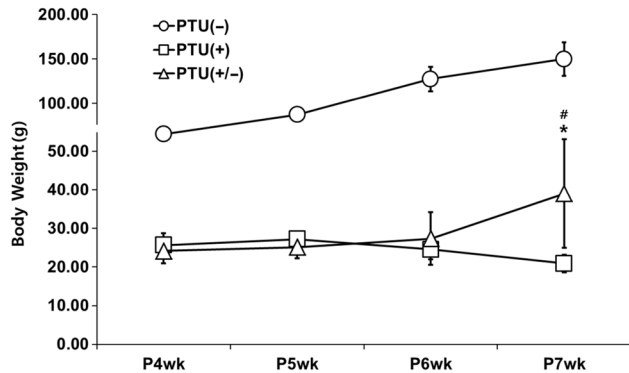


Figure 2. Postnatal weight gain and catch-up growth. When compared with negative control (PTU(-)), 6-propyl-2-thiouracil (PTU)-induced hypothyroid rats were significantly light at postnatal week 4 (P4wk). 3 weeks after cessation of PTU (P7wk), there was a catch-up growth compared with a previous week (P6wk, * $p < 0.05$) and also with continued group at P7wk (# $p < 0.05$).

각 시료의 방사선 양은 Packard Tri-Carb 1500 liquid scintillation analyzer를 사용하여 측정하였으며, 스테로이드 농도는 SecuRIA program (Packard)에 의해 결정하였다. 실험 간 (inter-assay)과 실험 내 (intraassay)의 변이 계수는 P_4 가 각 9.2%와 8.5%, 테스토스테론이 각 9.4%와 7.4%이었고, DHT가 각 8.7%와 6.5%이었으며, 전남대학교 호르몬연구센터에 의뢰하여 측정하였다.

통계처리

결과는 평균±표준편차로 표시하였다. 검사 시간별로 대조군 (PTU(-))과 실험군 (PTU(+), PTU(+/-)) 사이의 통계적 차이는 t 분석법 (t test; Microsoft Excel)으로 유의성을 조사하였다. p 값이 0.05 미만일 때 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

체중의 변화(Fig. 2)

정상 대조군 (PTU(-))의 체중은 출생 후 28일에 약 65 ± 3.3 g이었고, 매주 약 30g이 늘어 출생 후 7주에는 약 149.9 ± 18.9 g을 보였다. 주산기 갑상샘기능저하증 모델에서 출생 후 28일에 측정된 체중은 PTU(+)군에서 약 25.7 ± 3.0 g, PTU(+/-)군에서 24.2 ± 3.3 g으로 정상 대조군에 비해 체중이 적었지만, 두 군에 유의한 차이는 없었다. PTU(+)군은 출생 후 6주까지 큰 변화를 보이지 않았지만, 출생 후 7주에 약 20.9 ± 2.2 g으로 이전 주보다 유의하게 체중이 감소하였다. PTU(+/-)군은 출생 후 6주에 27.4 ± 6.8 g으로 다소 증가하였지만 유의성은 없었고, 출생 후 7주에 39.0 ± 14.1 g으로 출생 6주에 비해 유의하게 체중이 늘었다 ($p < 0.05$). 이 때의 체중은 PTU(+)군에 비해서도 유의한 증가임을 확인하였다 ($p < 0.05$).

DHT의 변화(Fig. 3)

출생 후 6~7주 사이인 PTU(-)군 ($n=4$)에서 DHEA는 1.63 ± 0.19 pg/mL로 측정되었고 이 값을 정상 범위라고 간주하였다. PTU(+)군에서는 출생 후 6주 ($n=4$)에 2.25 ± 0.39 ($p < 0.05$ vs PTU(-)), 출생 후 7주 ($n=2$)에 1.73 ± 0.25 pg/mL를, PTU(+/-)군에서는 출생 후 6주 ($n=2$)에 1.12 ± 0.17 ($p < 0.01$ vs PTU(+)), 출생 후 7주 ($n=2$)에 2.25 ± 0.39 pg/mL를 보였다.

테스토스테론의 변화(Fig. 4)

출생 후 6~7주 사이인 PTU(-)군 ($n=4$)에서 테스토스테론은 78.16 ± 12.52 pg/mL로 측정되었고 이 값을 정상 범위라고 간주하였다. PTU(+)군에서는 출생 후 6주 ($n=4$)에 127.11 ± 58.89 , 출생 후 7주 ($n=2$)에 10.10 ± 2.07 pg/mL ($p < 0.01$ vs PTU(-); $p < 0.05$ vs previous week)를, PTU(+/-)군에서는 출생 후 6주 ($n=2$)에 13.83 ± 1.10 ($p < 0.01$ vs PTU(-); $p < 0.05$ vs previous week), 출생 후 7주 ($n=2$)에 124.43 ± 58.68 pg/mL를 보였다.

고 찰

전통적으로 고환은 갑상샘호르몬에 영향을 받지 않는 것으로 생각하였지만 최근 동물 및 사람 대상 연구에서 갑상샘호르몬 수용체가 고환의 세포에서 증명되었다.^{4,5)} 갑상샘

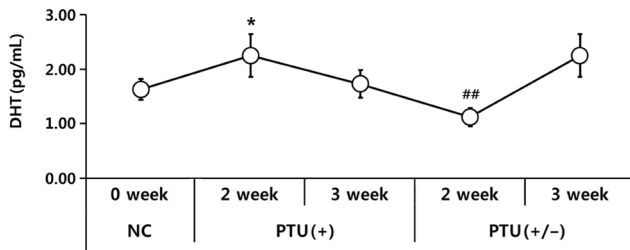


Figure 3. Changes of dihydrotestosterone (DHT) concentration. Negative control (NC) group was not treated with 6-propyl-2-thiouracil (PTU). DHT levels significantly increased 2 weeks after grouping in PTU(+) group (* $p < 0.05$ compared with NC), but significantly decreased 2 weeks after cessation of PTU (PTU (+/-) group, ## $p < 0.01$ compared with PTU (+) group). DHT levels tend to decrease in PTU (+) group and increase in PTU (+/-) group as time goes by.

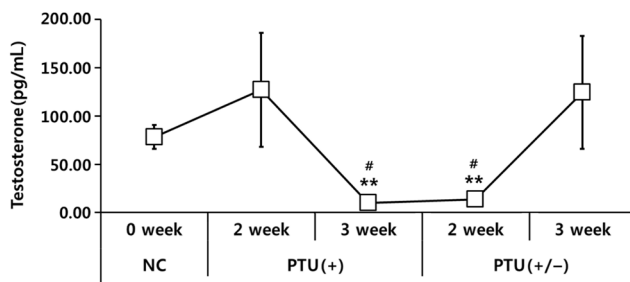


Figure 4. Changes of testosterone concentration. Negative control (NC) group was not treated with 6-propyl-2-thiouracil (PTU). Testosterone levels increased in PTU (+) group, but significantly decreased in PTU (+/-) group compared with NC (** $p < 0.01$) and with PTU (+) group (# $p < 0.05$). At the end of experiment, testosterone significantly decreased in PTU (+) group when compared with NC (** $p < 0.01$) and with a previous week (# $p < 0.05$), but restored in PTU (+/-) group.

호르몬이 고환에서 비생식세포의 증식과 분화, 스테로이드 생합성, 정자 운동성 조절에 관여하기 때문에 갑상선 기능장애, 즉 갑상샘기능항진증 (thyrotoxicosis) 및 갑상샘기능저하증 (hypothyroidism)은 남성 불임의 상당 부분에 해당할 수 있다.²³⁾ 갑상샘기능저하증이 있는 사춘기 이전 환자에서 고환 용적이 증가하였지만 정세관 (seminiferous tubule) 속 성숙 정자는 감소하였다.^{5,24)} 갑상샘기능저하증은 발기력과 사정에 영향을 주었고, 환자는 성적 욕구의 저하를 호소하였다.^{7,25,26)} 사춘기 이전에 발생한 갑상샘기능저하증을 가진 환자는 정세관의 지연 성숙 (delayed maturation) 및 성인형의 퇴축 (involution)이 동반되지만, 성인에서 발생한 갑상샘기능저하증에서는 성인형의 퇴축만 관찰된다는 보고가 있다.²⁷⁾

PTU를 이용한 주산기 갑상샘기능저하증 모델에서 PTU 처리군은 정상 대조군과 비슷한 체중으로 출생하지만, 시간

이 지남에 따라 통계적으로 유의하게 체중이 적은 상태로 성장한다.²⁸⁾ 설치류에서 생식이 가능할 정도로 고환이 성장하는 시기를 출생 후 약 7주로 예상하고 갑상샘기능저하증 실험에 적용하고 있다.¹⁸⁾ 본 실험에서도 주산기 갑상샘기능저하증 모델에서 PTU 처리군은 정상 대조군에 비해 유의하게 체중이 적은 상태였다. PTU 투여를 중단하면 통상 ‘따라잡기 성장 (catch-up growth)’이 관찰된다고 알려졌고,²⁹⁾ 본 실험에서도 PTU를 중단하고 2주까지는 큰 변화가 없었지만 3주째에는 유의한 증가가 관찰되었다 (Fig. 2). 남성 생식샘 호르몬 중 최종 산물인 테스토스테론과 그 대사산물인 DHT는 갑상샘기능저하증 기간이 길어짐에 따라 지속적으로 감소하였다. PTU를 중단한 군에서도 중단하고 2주까지는 감소된 상태가 유지되었지만, 3주째에는 두 호르몬이 모두 유의하게 증가하였다 (Fig. 3 and Fig. 4). 결과적으로 갑상샘기능저하증에 의해 유발된 생식샘기능저하증은 남성호르몬은 PTU를 중단하고도 약 2주간 유지되었지만, 3주가 되면 호르몬 수치도 증가하고 새끼들의 전반적인 상태도 개선된 것으로 판단할 수 있었다.

이 연구는 다음과 같은 한계를 갖는다. 첫째, 주산기 갑상샘기능저하증 흰쥐에서 정상 구조가 완성되는 시점을 제시할 수 없었다. 주산기 갑상샘기능저하증을 유발한 새끼들은 출생 후 4주 이후에 정상적인 체중 증가를 보이지 않았다. 출생 후 7주에도 정상적인 고환 구조가 관찰되지 않았다는 보고¹⁸⁾가 있었기 때문에 더 긴 기간을 관찰하고자 계획하였으나 출생 후 6주부터 사망하는 흰쥐가 나타나 정세관의 정상 구조가 나타나는 기간을 특정할 수 없었다. 이 현상은 출생 후 4주에 PTU 투여를 중단한 군에서도 유사하게 관찰되었다. 특히 따라잡기 성장이 나타나는 출생 후 6주와 7주 사이에 개체간 차이가 심하게 관찰되면서 성장이 늦은 새끼들이 도태되는 양상을 보였다. 둘째, 장기간 관찰이 불가능해지면서 출생 후 7주에 생존한 새끼의 수가 줄어 통계처리에 필요한 최소한의 새끼를 확보하지 못하였다. 따라서 제시된 검사 결과의 경향을 통해 PTU 중단 후 2주까지 생식샘기능저하증이 유지되고, 3주부터는 따라잡기 성장 등 회복이 나타난다고 언급하였다. 이상의 결과는 추가 실험을 통해 충분한 개체 수를 확보하여 통계적 유의성을 다시 확인할 필요가 있다.

이 연구에서 정립되어 있는 주산기 갑상샘기능저하증 모델을 대상으로 생식샘기능저하증이 유발되는지 확인하였다. PTU를 중단하고 약 2주간 남성호르몬이 감소된 상태가 유지되었으므로 갑상샘기능저하증에 의한 생식샘기능저하증 모델을 대상으로 한 실험을 계획할 때는 이 기간을 염두에 두어야 할 것으로 생각하였다.

REFERENCES

1. Richard-Eaglin A. Male and Female Hypogonadism. *Nurs Clin North Am* 2018;53:395-405.
2. Molina-Vega M, Muñoz-Garach A, Damas-Fuentes M, Fernández-García JC, Tinahones FJ. Secondary male hypogonadism: A prevalent but overlooked comorbidity of obesity. *Asian J Androl* 2018;20:531-8.
3. Jannini EA, Crescenzi A, Rucci N, Screponi E, Carosa E, de Matteis A, et al. Ontogenetic pattern of thyroid hormone receptor expression in the human testis. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3453-7.
4. Wagner MS, Wajner SM, Maia AL. The role of thyroid hormone in testicular development and function. *J Endocrinol* 2008;199:351-65.
5. Wagner MS, Wajner SM, Maia AL. Is there a role for thyroid hormone on spermatogenesis? *Microsc Res Tech* 2009;72:796-808.
6. Holsberger DR, Cooke PS. Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. *Cell Tissue Res* 2005;322:133-40.
7. Krassas GE, Poppe K, Glinoe D. Thyroid function and human reproductive health. *Endocr Rev* 2010;31:702-55.
8. Laslett AL, Li LH, Jester WF Jr, Orth JM. Thyroid hormone down-regulates neural cell adhesion molecule expression and affects attachment of gonocytes in Sertoli cell-gonocyte cocultures. *Endocrinology* 2000;141:1633-41.
9. Orth JM, Gunsalus GL, Lamperti AA. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* 1988;122:787-94.
10. Singh R, Hamada AJ, Agarwal A. Thyroid hormones in male reproduction and fertility. *Open Reprod Sci J* 2011;3:98-104.
11. Condorelli R, Calogero AE, La Vignera S. Relationship between testicular volume and conventional or nonconventional sperm parameters. *Int J Endocrinol* 2013;2013:145792.
12. Manna PR, Roy P, Clark BJ, Stocco DM, Huhtaniemi IT. Interaction of thyroid hormone and steroidogenic acute regulatory (StAR) protein in the regulation of murine Leydig cell steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001;76:167-77.
13. Park E, Kim Y, Lee HJ, Lee K. Differential regulation of steroidogenic enzyme genes by TR α signaling in testicular Leydig cells. *Mol Endocrinol* 2014;28:822-33.
14. Maran RR, Aruldas MM. Adverse effects of neonatal hypothyroidism on Wistar rat spermatogenesis. *Endocr Res* 2002;28:141-54.
15. Anbalagan J, Sashi AM, Vengatesh G, Stanley JA, Neelamohan R, Aruldas MM. Mechanism underlying transient gestational-onset hypothyroidism-induced impairment of posttesticular sperm maturation in adult rats. *Fertil Steril* 2010;93:2491-7.
16. Aruldas MM, Ramalingam N, Jaganathan A, John Sashi AM, Stanley JA, Nagappan AS, et al. Gestational and neonatal-onset hypothyroidism alters androgen receptor status in rat prostate glands at adulthood. *Prostate* 2010;70:689-700.
17. Choudhury S, Chainy GB, Mishro MM. Experimentally induced hypo- and hyper-thyroidism influence on the antioxidant defence system in adult rat testis. *Andrologia* 2003;35:131-40.
18. Chang IY, Shin SY, Kim JW, Yu JM, Kim JS, Song PI, et al. The changed immunolocalization of START-domain-containing 6 (StarD6) during the development of testes in rat perinatal hypothyroidism. *Acta Histochem* 2007;109:315-21.
19. Sahoo DK, Roy A, Bhanja S, Chainy GB. Hypothyroidism impairs antioxidant defence system and testicular physiology during development and maturation. *Gen Comp Endocrinol* 2008;156:63-70.
20. Palaoro LA, Rocher AE, Canessa OE, Peressini S, Rosales M, Del Río AG, et al. Epididymal mitochondrial status of hypothyroid rats examined by transmission electron microscopy. *Biotech Histochem* 2013;88:138-44.
21. Kwon HB, Choi HH, Ahn RS, Yoon YD. Steroid production by amphibian (*R. nigromaculata*) ovarian follicles at different developmental stages. *J Exp Zool* 1991;260:66-73.
22. Kwon HB, Ahn RS. Relative roles of theca and granulosa cells in ovarian follicular steroidogenesis in the amphibian, *Rana nigromaculata*. *Gen Comp Endocrinol* 1994;94:207-14.
23. La Vignera S, Vita R, Condorelli RA, Mongioi LM, Presti S, Benavenga S, et al. Impact of thyroid disease on testicular function. *Endocrine* 2017;58:397-407.
24. Komiya A, Watanabe A, Kawachi Y, Takano A, Fuse H. Severe oligozoospermia in a patient with myxedema coma. *Reprod Med Biol* 2012;11:207-11.
25. Griboff SI. Semen analysis in myxedema. *Fertil Steril* 1962;13:436-43.
26. Wortsman J, Rosner W, Dufau ML. Abnormal testicular function in men with primary hypothyroidism. *Am J Med* 1987;82:207-12.
27. De La Balze FA, Arrillaga F, Mancini RE, Janches M, Davidson OW, Gurtman AI. Male hypogonadism in hypothyroidism: a study of six cases. *J Clin Endocrinol Metab* 1962;22:212-22.
28. Chang IY, Ohn T, Ko GS, Yoon Y, Kim JW, Yoon SP. Immunolocalization of steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer (START) domain-containing proteins in the developing cerebellum of normal and hypothyroid rats. *J Chem Neuroanat* 2012;43:28-33.
29. Cooke PS. Thyroid hormones and testis development: a model system for increasing testis growth and sperm production. *Ann N Y Acad Sci* 1991;637:122-32.