

# Rat Penil Erektile Dokusunda Medikal ve Cerrahi Kastrasyonun Neden Olduğu Apoptozun Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi

## Comparative Evaluation of Medical versus Surgical Castration on Rat Penile Erectile Tissue Apoptosis

Dr. Seyit Erkan Eyyüpoğlu / Amasya Devlet Hastanesi Üroloji Kliniği, Amasya

Dr. Orhun Sinanoğlu / Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı Maltepe/İstanbul

Dr. Sinan Ekici / Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı Maltepe/İstanbul

Dr. Memduh Aydın / Taksim Eğitim Araştırma Hastanesi, Üroloji Kliniği, Taksim/İstanbul

Dr. Mete Çek / Trakya Üniversitesi, Üroloji Anabilim Dalı, Edirne

### ÖZET

**Amaç:** Siproteron asetat (CPA) ve cerrahi orşiektominin rat penil erektil dokusundaki apoptotik etkisini Bax proteinine bağlı olarak değerlendirmek.

**Yöntem:** Postpubertal Wistar Albino ratlar üç gruba ayrıldı. İlk gruba (A) bilateral orşiektomi (n=10), ikinci gruba (B) haftada bir 14 gün süreyle 15 mg intramusküler CPA uygulaması (n=10) yapıldı. Üçüncü grup (C; sham opere) kontrol grubu (n=10) olarak alındı. Tüm ratlar postoperatif 14. günde sakrifiye edilip penil kavernoöz cisimleri blok olarak alındı, Bax proteinine karşı oluşturulmuş anti-mouse IgG içerikli miyarla immünohistokimyasal olarak boyandı ve kavernoöz alanlar değişik büyütmeyle mikroskop altında incelendi. Gruplar arasındaki Bax ekspresyonundaki farklılıklar one way ANOVA ile değerlendirildi.

**Bulgular:** Proksimal, mid ve distal penil kesitler arasında apoptosis bakımından fark olmadığı görüldü. Cerrahi kastrasyon grubunun penil apoptotik derecesi CPA grubunununkinden yüksek bulundu (p<0.001). Her iki gruptaki apoptoz derecesi kontrol grubunununkinden yüksek idi (p<0.001).

**Sonuç:** Medikal androjen deprivasyonunun da penil erektil dokuda apoptoza yol açtığı ancak bu etkinin cerrahi kastrasyona göre düşük olduğu gözlenmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Apoptoz, penil, kavernoöz, erektil doku, cerrahi kastrasyon, siproteron asetat

### ABSTRACT

**Aim:** To evaluate the apoptotic effect of Ciproterone acetate(CPA) and surgical orchidectomy on rat penile erectile tissue on the basis of Bax protein.

**Methods:** Postpubertal Wistar Albino rats were divided in three groups: First group (A) underwent bilateral orchidectomy (n=10), second group (B) received 15 mg intramuscular CPA (n=10) every two weeks for 14 days. Third group (C; sham operated) was taken as control (n=10). All rats were sacrificed at 14<sup>th</sup> day, their cavernous bodies were taken en bloc, stained immunohistochemically with a reagent containing anti-mouse IgG against Bax protein and, cavernous sections were evaluated under microscope with different magnifications. Bax expression differences among groups were analysed with one way ANOVA.

**Results:** No apoptotic difference among proximal, mid and distal penile sections was found. The apoptotic index in surgically castrated group was superior compared to CPA treated group (p<0.001). Apoptotic indices in both groups were superior compared to control group (p<0.001).

**Conclusion:** Although medical androgen deprivation also causes apoptosis on penile erectile tissue, its effect appears to be inferior compared to surgical castration.

**Key words:** Apoptosis, penile, cavernous, erectile tissue, surgical castration, ciproterone acetate

## GİRİŞ

1941 yılında Huggins ve Hodges'un metastatik prostat kanserli hastalarda orşiektomi ve östrojenlerle hastalığın gerilemesini ve hatta yok olmasını göstermelerinden bu yana, medikal ve cerrahi kastrasyon, erkeklerdeki en sık malignite olan prostat kanserlerin tedavisinde yer bulmaktadır (1-3). Yapılan çalışmalarda kastrasyon sonrası daha önce potent olanların % 47 - % 100'ünde erektil disfonksiyon (ED) geliştiği saptanmıştır (4-7). Cerrahi kastrasyona alternatif bir tedavi olarak kullanılan siproteron asetat (CPA) sonrası, daha önce potent olan erkeklerin 2 yıl içinde % 92'sinde spontan ereksiyon kaybı, % 88'inde de seksüel aktivite kaybı oluşmuştur (8). CPA'nın pedofil veya parafil gibi seks suçlularında kullanımı da ereksiyon üzerindeki negatif etkisinin diğer bir göstergesi olmalıdır (9,10). Penil erektil dokudaki apoptoz konusunda, literatürdeki çalışmalarda, genellikle ratların kastrasyon ve denervasyonu kullanılmıştır (11-17).

Bu çalışmada, CPA ile oluşturulan androjen deprivasyonunun ve cerrahi orşiektominin rat penil erektil dokusu üzerindeki apoptotik etkilerini, proapoptotik Bax proteininin imünohistokimyasal boyanması ile belirlemek ve her iki kastrasyon yöntemini kıyaslamak amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışmada ortalama ağırlıkları 200 gr (180-220 gr) olan 12'şer haftalık 30 adet erişkin Wistar Albino cinsi erkek rat kullanılmıştır. Ratlar onarlık üç gruba ayrıldı; A grubuna orşiektomi, B grubuna CPA ve C grubuna kontrol (Sham opere) ratları dahil edildi. Gruplara dahil edilen ratların yaş, ağırlık, cins gibi fizik özelliklerinin yanı sıra suları, beslenmeleri, saklanmaları ve bakımları açısından fark yoktu. A grubuna Halotanla indüksiyon yapıldıktan sonra, insan dozunun 25 mg/kg'lık tiyopental sodyum verilerek anestezi yapıldı ve rafeden yapılan tek bir skrotal insizyonla bilateral orşiektomi yapıldı. B grubuna orşiektomi yapılan gruba aynı gün ve bir hafta tamamlanınca yeniden olmak üzere, 15 mg siproteron asetat IM enjekte edildi. C grubuna (Kontrol) sham operasyonu yapıldı (anestezi altında yalnızca skrotal insizyon). İki hafta sonunda, hayvanlar 75 mg/kg tiyopental ile öldürülüp sakrifiye edildiler, penisler en blok alındı.

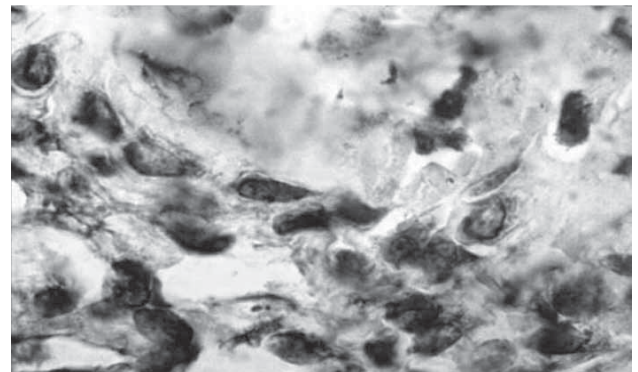
**İmmünohistokimyasal boyama;** Doku kesitleri parafinden arındırıldı. Hidrojen peroksidad çözeltisinde 15 dakika inkübe edilip, TBS ile 2 kez yıkandı. Mikrodalga fırında sitrat tampon yapıp oda ısısında 20 dakika soğutuldu, TBS ile 4 kez yıkandı. Özgül olmayan zemin boyanmasını önlemek amacıyla 5 dakika oda ısısında Ultra V Blok (Protein Blokajı) uygulaması yapıldı. Yıkama yapılmadan sadece lam üzerindeki Ultra V Bloğu akıtıldı, Bax antikoru dokuyu kaplayacak biçimde üzerlerine damlatıldı ve 1 saat inkübe edildi. Sulandırma 1/100 oranında yapıldı. TBS ile 4 kez yıkandı. "Biotinylated Goat antipolyvalent Solution" serumu damlatılıp 20 dakika bekletildikten sonra TBS ile 4

kez yıkanıp, AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) kromojen ile renk alıncaya kadar inkübe edildi (AEC hazırlanışı; 1 ml substrat içerisine 1 damla kromojen konuldu ve distile suyla yıkandı). Daha sonra Mayer hematoksileni ile - burada en fazla 1 dakika bekletilerek - zıt boyama yapıp distile suyla yıkandı ve Ultramount ile kapatıldı. Preparatlar, ışık mikroskopunda ve fotomikrograf altında incelendi. Her bir rata ait proksimal, distal ve mid shaft penil spesmenlerinde, kavernöz dokulara uyan bölgelerdeki 100 hücre sayıldı ve pozitif boyanan hücreler % değer olarak belirtildi. Pozitif boyanan hücrelerin gruplardaki ve kesitlerdeki sayısal % değerleri, tek yönlü varyans analizi (One way ANOVA)'nda LSD (Least Significant Difference) çoklu karşılaştırma yöntemi ile değerlendirildi. Prensipten dolayı; temelde apoptoza giden hücrelerdeki Bcl-2 ile Bax arasındaki dengeyi ikincisi lehine olan kayma neticesinde intrasellüler Bax proteininin artmış ekspresyonu vardır. Miyar (Reagent) içinde bu antijenle reaksiyona girecek anti-mouse immünglobulini, bax geninin spesifik bir bölümü için sentezlenen proteinin immünojen olarak keçiye verilmesi ile elde edilmiş bir immünglobulin G'dir. Bu antikor, ratdaki intrasellüler Bax proteinini bağlamakta ve intrasitoplazmik granüller tarzda boyanarak artmış bir kırmızı renk teşekkül etmektedir (18).

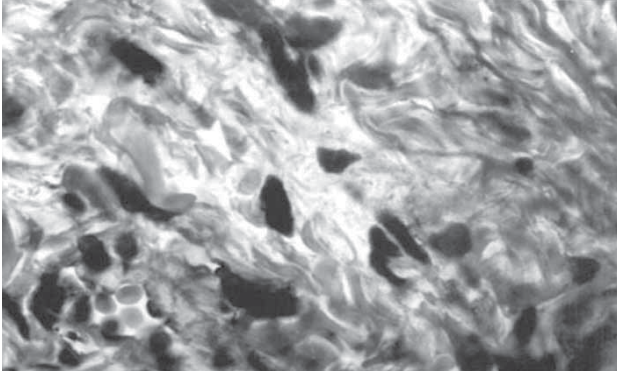
**Histopatoloji;** Piyesler formalinde fikse edildikten sonra parafine gömülüp proksimal, distal ve mid shaftta ait penil kesitler alındı. Tüm lamalar rastlantısal olarak enflamatuvar infiltrat, ödem, fibroz, bazal hücre dejenerasyonu, hiperplazi, endotel hücre hacim yoğunluğu açısından araştırıldı.

## BULGULAR

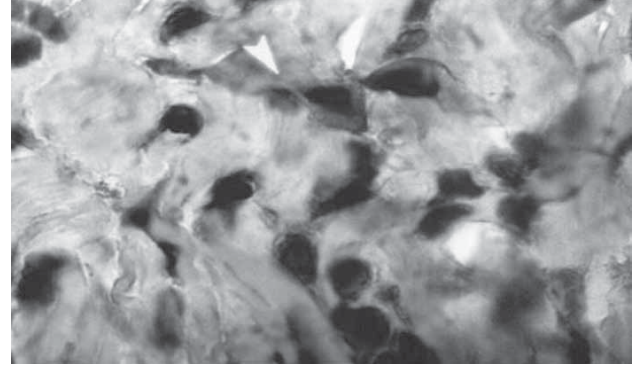
Kontrol grubunun ratlarına ait penil doku kesitlerinde nadir görülen Bax(+) boyanma (şekil 1), androjen deprivasyonu yapılan grupta (B) orta derecede artma gösterirken (Şekil 2) orşiektomi yapılan grupta bu artma daha da kuvvetli idi (Şekil 3). Aynı penise ait kesitler arasında da bariz olmamakla birlikte homojen olmayan farklılıklar vardı. Dolayısıyla, böyle bir ön incelemeden sonra, her 3 grubun ratlarına ait penil kesitler, rastlantısal olarak bulunan bir büyük



**Şekil 1.** Kontrol grubu(C) ratların kavernöz düz kas hücrelerinde normal Bax pozitif boyanma (x 100)



**Şekil 2.** Cerrahi kastrasyon grubu (A) ratların kavernöz düz kas hücrelerinde kuvvetli Bax pozitif boyanma (x 100)



**Şekil 3.** Medikal kastrasyon grubundaki (B), ratların kavernöz düz kas hücrelerinde orta derecede Bax boyanma (x 100, C grubu)

büyütme alanında yeniden değerlendirildi. Merkezden etrafa doğru yan yana bulunan 100 hücre, pozitif boyanan ve boyanmayan olarak sayıldı. Her bir ratın proksimal, mid ve distal kesitlerine ait değerler tablo 1 de özetlenmiştir. Kontrol grubunun proksimal penil kesitlerinde, 100 hücre içerisinde Bax(+) boyanan hücre sayısının 10 ratdaki ortalamasının, 13.0; mid şaft kesitlerde 14.2 ve distal şafta ait kesitlerde 11.8 olduğunu saptadık. Benzer şekilde, cerrahi orşiektomi yapılan ratların proksimal, mid ve distal şaft kesitlerinde bu oranların ortalaması, sırasıyla, 29.8, 30.1 ve 29.7 idi. CPA verilen grupta ise, yine aynı sırayla, bu değerler 19.5, 19.0 ve 19.2 idi. Sayısal verilere dökülen kesitsel ve grup tabanlı verileri, tek yönlü varyans analizinde LSD, çoklu karşılaştırma yöntemi kullanılarak analiz edildi (One Way ANOVA). İlk olarak grupların içerisindeki kesitler karşılaştırıldı. Buna göre, her 3 grubun kendi aralarında proksimal, mid ve distal şafttaki (+) boyanan hücre sayıları arasındaki farklılık, istatistiksel analiz sonucuna göre anlamlı değildi. Bax(+) boyanan % hücre sayısının ortalama ve standart sapma (SD) değerleri, kontrol grubu için  $13.00 \pm 5.91$ , orşiektomi yapılan grup için  $29.87 \pm 10.17$  ve CPA uygulanan grup için  $19.23 \pm 9.23$  olarak bulundu. Kontrol – cer-

rahi kastrasyon, kontrol – CPA, cerrahi kastrasyon – CPA gruplarının istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olduğu görüldü ( $p < 0.001$ ,  $F = 29.238$ ,  $SD = 2;87$ ).

### TARTIŞMA

Apoptoz, değişik dış etkenlere (hipoksi, travma, toksinlere) sekonder gelişen nekrozdan farklı olarak, embriyogenez ve gelişim, tümörigenez ve, sellüler homeostazla birlikte olan ayrı bir morfolojik antite olarak ilk kez 1972'de tanımlanmıştır (19). Apoptoza giden hücreler dehidratasyon ve büzülme gösterirler ve bu yüzden ilk tanımlandığında büzülme nekrozu diye adlandırılmıştır (20). Apoptozun genetik temelinde bulunan Bax, prototipik apoptotik genidir ve Bcl-2 ise, prototipik anti apoptoz genidir (21). Bu 2 gen arasındaki koordinasyon, p53 geni ile sağlanmaktadır (22). p53, apoptoza neden olan gen olarak da düşünülebilir; bu etkisini Bax kopyalamasını artırarak yaptığı görünmektedir (23). Penil dokuda cerrahi kastrasyon veya denervasyona bağlı olarak gelişen apoptoz ve diyabete sekonder gelişen apoptoz önceki çalışmalarda gösterilmiştir (11-17). Testosteron üzerine bilinen etkisinden dolayı teorik olarak cerrahi kastrasyonla aynı sonucu vereceği tahmin edilen CPA'nın

	KONTROL			SİPROTERON			ORŞIEKTOMİ		
	proksimal	mid	distal	proksimal	mid	distal	proksimal	mid	Distal
Rat 1	18	17	18	15	18	19	25	26	29
Rat 2	2	2	2	32	46	37	10	20	20
Rat 3	20	17	20	12	11	20	20	20	20
Rat 4	12	12	12	35	17	24	42	31	30
Rat 5	14	10	10	20	10	16	50	55	51
Rat 6	18	18	11	5	18	12	36	25	30
Rat 7	16	10	14	12	19	19	26	25	30
Rat 8	9	20	9	34	12	19	29	29	30
Rat 9	19	20	17	18	20	18	42	35	29
Rat 10	2	16	5	12	19	8	18	35	28
<b>Ortalama</b>	13	14.2	11.8	19.5	19	19.2	29.8	30.1	29.7

**Tablo 1:** Kontrol, medikal kastrasyon ve cerrahi kastrasyon gruplarındaki 10'ar ratın proksimal, mid ve distal penil erektil doku kesitlerinde Bax antikoruna ile pozitif boyanan hücre sayıları

da apoptotik sürece etkisi buradaki çalışmamızda araştırılmıştır. Siproteron asetatın neden olduğu apoptotik artış cerrahi kastrasyon grubundakine göre daha düşük bulunmuştur, buradaki sonuç testosteronla penis arasında ve testosteronla erektil fonksiyon arasında ilgi kuran çalışmalara katkıda bulunabilir (24-28). Öte yandan, yaşlanma ile erektil fonksiyondaki bozulma yalnız kavernoöz dokudaki apoptoza bağlanamaz, yaşlanan kavernoöz dokuda artmış kollajen ve kollajendeki yapısal değişikliklerin mevcudiyeti de akılda tutulmalıdır (29). Buna ek olarak, penil erektil dokudaki apoptoz yalnız antiandrojen veya androjen yoksunluğu etkisi ile görülmez, penil denervasyon sonucunda oluşur. Radikal prostatektomi sonrası gözlenen ED ve penis küçülmesi yakınmalarından yola çıkarak ratlarda yapılan kavernoözal nörotomi çalışmaları penil denervasyon sonrası apoptozun, postoperatif erken günlerde olduğunu göstermektedir (13,17). Bilateral olarak denerve edilen rat penislerindeki penil ağırlık ve majör moleküler karakteristiklerdeki değişikliğin ve apoptotik değişikliklerin derece ve zamanlamasını karakterize etmek ve saptamak için yapılan çalışmalarda penil denervasyon sonrası apoptozun, 1. ve 2. günlerde yükselmekte, 14, 28, ve 60. günlere doğru çok azalmakla birlikte devam etmekte olduğu bildirilmiştir (15-17).

### SONUÇ

Bu çalışmada, rat penil erektil dokusunun, medikal androjen deprivasyonu ve cerrahi orşiektomiye cevap olarak verdiği sellüler dejeneratif kapasitenin yani apoptozun, Bax proteini temelinde immünohistokimyasal incelemesi yapılmıştır. Bulgularımızda cerrahi kastrasyonun erektil dokudaki apoptoza etkisi medikal kastrasyona göre yüksek bulunmuştur. Bu sonuç cerrahi kastrasyonun erektil disfonksiyona negatif etkisinin medikal kastrasyona göre daha ciddi olabileceğini düşündürmektedir.

### KAYNAKLAR

- Huggins C, Hodges CV: Studies on prostate cancer: effect of castration, oestrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Res* 1941; 293-297.
- Narayan P.: Neoplasms of prostate gland: Smith's General Urology. Tanagho, E.A., McAninch, J.W. (eds), Practise-Hall international Inc.17th edition 2008; pp: 348-353.
- Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW and Peters CA, eds. Campbell Walsh-Urology, 9th Edition. Philadelphia, WB Saunders Elsevier 2007; sect VI, pp. 718-738.
- Iversen P, Tyrrell CJ, Kaisary AV, Anderson JB, van Poppel H, Tammela TLJ et al. Bicalutamide monotherapy compared with castration in patients with nonmetastatic locally advanced prostate cancer: 6,3 years of follow-up. *J Urol* 2000 Vol.164, 1579-1582.
- A; Plymate SR; Katz PG. Visually stimulated erection in castrated men *J Urol* 1995; 153(3 Pt 1): 650-652.
- Rousseau L; Dupont A; Labrie F; Couture M. Sexuality changes in prostate cancer patients receiving anti hormonal therapy combining the antiandrogen flutamide with medical (LHRH agonist) or surgical castration. *Arch Sex Behav* 1988; 17(1): 87-98.
- Clark JA; Wray NP; Ashton CM. Living with treatment decisions: regrets and quality of life among men treated for metastatic prostate cancer [In Process Citation] *J Clin Oncol* 2001; 19(1): 72-80.
- Schroeder FH; Collette L; de Reijke TM; Whelan P. Prostate cancer treated by anti-androgens: is sexual function preserved? EORTC Genitourinary Group. European Organization for Research and Treatment of Cancer. *Br J Cancer* 2000; 82(2): 283-290.
- Cooper AJ; Cernovovsky Z. The effects of cyproterone acetate on sleeping and waking penile erections in paedophiles: possible implications for treatment. *Can J Psychiatry* 1992; 37(1): 33-39.
- Bradford JM; Pawlak A. Double-blind placebo crossover study of cyproterone acetate in the treatment of the paraphilias. *Arch Sex Behav* 1993; 22(5): 383-402
- Zhang XH; Hu LQ; Zheng XM; Li SW. Apoptosis in rat erectile tissue induced by castration. *Asian J Androl* 1999; 1(4): 181-185.
- Seftel AD; Maclennan GT; Chen ZJ; Liu S; Ferguson K; Deoreo G; et al: Loss of TGF beta, apoptosis, and bcl-2 in erectile dysfunction and upregulation of p53 and HIF-1alpha in diabetes-associated erectile dysfunction. *Mol Urol* 1999; 3(2): 103-107.
- Klein LT, Miller MI, Buttyan R, Raffo AJ, Burchard M, Devris G, et al Apoptosis in the rat penis after penile denervation. *J Urol* Vol 158, 1997; 626-630.
- Sabsigh R, Raymond JF, Olsson CA, O'toole K, Buttyan R: Androgen induction of DNA synthesis in the rat penis. *Urol* 52(4), 1988 p: 723-728.
- Alicı B, Gümüştas MK, Özkara H, Akkuş E, Demirel G, Yencilek F, et al. Apoptosis in the erectile tissues of diabetic and healthy rats. *BJU Int* 2000; 85, 326-329.
- Cartledge J. Correspondence to Apoptosis in the erectile tissues of diabetic and healthy rats. *BJU Int* 2000; 85, 563-564.
- Herbert M User, John C Hairston, Kevin E McKenna, Carol A Podlasek, David J Zelnor, Kevin T McVary. Decreased weight, protein content and apoptosis in denervated rat penis. *J Urol* 2001; Vol.165, No.5 supp
- Anti-Mouse, HRP/AEC Ultravision detection system. Labvision Corp., Fremont, U.S.A.
- Kerr JF; Wyllie AH; Currie AR: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-246.
- Kerr JF: Shrinkage necrosis: a distinct mode of cell death. *J Pathol* 1971; 105: 13-20.
- Korsmeyer SJ; Shutter JR; Veis DJ; Merry DE; Oltva-

- i ZN: Bcl-2/bax: A rheostat that regulates anti-oxidant pathway and cell death. *Sem Cancer Biol* 1993; 4:327-332.
22. Bates S. Vousden KH: p53 in signaling checkpoint arrest or apoptosis. *Curr Opin Genetics Develop* 1996; 6:12-18.
  23. Miyashita T; Krajewski S; Krajewska M; Wang HG; Lin HK; Liebermann DA et al: Tumour suppressor p53 is a regular bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 1994; 9:1799-1805.
  24. Baskin LS; Sutherland RS; Di Sandro MJ; Hayward SW; Lipschutz J; Cunha GR. The effect of testosterone on androgen receptors and human penile growth. *J Urol* 1997; 158(3 Pt 2): 1113-1118.
  25. Shabsigh R. The effects of testosterone on the cavernous tissue and erectile function. *World J Urol* 1997; 15(1): 21-26.
  26. Penson DF; Ng C; Rajfer J; Gonzalez-Cadavid NF. Adrenal control of erectile function and nitric oxide synthase in the rat penis. *Endocrinology* 1997; 138(9): 3925-3932.
  27. Baba K; Yajima M; Carrier S; Akkus E; Reman J; Nunes L et al: Effect of testosterone on the number of NADPH diaphorase-staining nerve fibres in the rat corpus cavernosum and dorsal nerve. *Urology* 2000; 1;56(3):533-538.
  28. Lugg JA, Rajfer J, and Gonzales- Cadavid NF: Dihydro-testosterone is the active androgen in the maintenance of nitric oxide-mediated penile erection in the rat. *Endocrinology* 1995; 136:1495-1501.
  29. Bakircioglu ME; Sievert KD; Nunes L; Lau A; Lin CS; Lue TF: Decreased trabecular smooth muscle and caveolin-1 expression in the penile tissue of aged rats. *J Urol* 2001; 166(2): 734-738.