

Çocukların ürogenital sisteminde androjen, östrojen ve progesteron hormon reseptörlerinin mevcudiyeti: Hedef prepisyum

Sinan CELAYİR*, Ayşenur CERRAH CELAYİR**, Serdar MORALIOĞLU**, Handan ÇETİNER***, Gözde KIR****

*İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, **Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Cerrahisi Kliniği, ***Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Patoloji Kliniği, ****Ümraniye Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Patoloji Kliniği, İstanbul

Özet

Amaç: Androjen, östrojen ve progesteron hormonlarının penis gelişiminde rolleri hâlen araştırma konusudur. Bu çalışmada normal yapılı prepisyumda bu hormon reseptörlerinin araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Geleneksel veya dini amaçlı cerrahi sünnet yapılan normal penis ve prepisyumlu çocukların, eksize edilen prepisyum dokularının frenulum bölgesinden 3 mm'lik biyopsi örnekleri elde edildi. Avidin-biotin horseradish peroxidase tekniği ile immunhistokimyasal boyama sonrası ışık mikroskopu altında seks hormon reseptörlerinin varlığı araştırıldı. Her bir androjen, östrojen ve progesteron reseptörleri için kahverenginde nükleer boyanmanın varlığı pozitif, kahverengi nükleer boyanmanın yokluğu ise negatif olarak kabul edildi.

Bulgular: Ortalama yaşları 4.8 yaş (4 ay - 10 yıl) olan normal penis ve tam prepisyumlu 12 çocukta, sünnet cerrahisi sonrası eksize edilen prepisyumun frenulum bölgesinden 3 mm'lik biyopsi materyalleri hazırlandı. İmmunhistokimyasal boyama sonrası, tüm örneklemelerde progesteron reseptörleri negatif, androjen ve östrojen reseptörleri pozitif bulundu.

Sonuç: Prepisyum dokusunda araştırılan progesteron reseptörlerinin tüm örneklemelerde negatif, buna karşın androjen ve östrojen reseptörlerinin pozitif bulunması prepisyumun bütün ve eksiksiz olarak gelişiminde progesterondan daha çok özellikle androjen ve östrojen reseptörlerinin birlikte önemli rol oynadığını düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Prepisyum, hipospadias, hormon, reseptör, östrojen, androjen, progesteron, penis

Summary

Expression of estrogen, progesterone and androgen hormone receptors in the urogenital track of children: Target preputium

Aim: The role of androgen, estrogen and progesterone hormones in penile development is still investigated. The purpose of this study is to investigate these hormone receptors in the intact preputium.

Material and Methods: Three-millimetre long biopsy samples were obtained from frenulum of excised preputial tissues of children with intact preputium and penis after the circumcision surgery for the religious/traditional purposes. The presence of androgen, estrogen, and progesterone sex hormone receptors were investigated immunohistochemically with avidin-biotin horseradish peroxidase staining technique, then all specimens were examined under light microscope. Reactions were interpreted as positive, and negative based on the presence, and absence of brown colored nuclear staining.

Results: Preputial biopsy samples measuring 3 mm in length were prepared from excised material after the circumcision surgery performed on 12 children with intact preputium and normal penis. The mean age of the patients was 4.8 years (4 months-10 years). Estrogen and androgen receptors were found in all preputial specimens while progesterone receptors were absent.

Conclusions: Progesterone receptors were absent while estrogen and androgen receptors were found in all preputial tissue specimen suggest that rather than progesterone receptors, androgen and estrogen receptors play an important role in the development of an intact preputium.

Key words: Preputium, hypospadias, hormone, receptor, estrogen, androgen, progesterone, penis

Adres: Prof. Dr. Sinan Celayir, Şakacı Sok. No:61, D:8, Mehmet Sayman Apt. Kazasker, 34736 Kadıköy / İstanbul
Alındığı tarih: 04.11.2015
Kabul tarihi: 25.11.2015

Giriş

Penil dokularda androjen, östrojen ve progesteron reseptörlerinin varlığı önceki çalışmalarda gösterilmiş olmasına karşın⁽¹⁻⁶⁾, ürogenital sistemin gelişiminde, hipospadias etyopatogenezinde androjen, östrojen ve progesteron hormonlarının ve reseptörlerin rolleri hâlen araştırma ve tartışma konusudur⁽⁷⁻¹¹⁾. Özellikle hipospadiaslı olguların birçoğunda mevcut olmayan ventral prepusyumun yokluğu nedeniyle penil ve prepusyal cilt gelişiminde bu hormonların ve reseptörlerinin etkisi olup olmadığına dair bir öngörü getirilebilmek gereklidir. Bu nedenle yapılacak ileri çalışmalara temel olması ve karşılaştırma yapılabilmesi için, bu çalışmada normal yapılı penisli çocukların tam gelişmiş prepusyumlarında androjen, östrojen ve progesteron hormon reseptörlerinin varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma, normal penis ve prepusyumlu sünnet yapılan çocukların eksize edilen prepusyum dokularında yapıldı. Hastane Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı (12.10.2012/30) sonrası, üç aylık sürede kliniğimizde aile istemi ile geleneksel/dini amaçlı sünnet cerrahisi yapılan çocukların, eksize edilen prepusyum materyallerinde çalışıldı. Tüm olgularda eksize edilen prepusyum dokusunun frenulum bölgesinde en önde ve üstteki prepusyum cildinden 3x3 mm boyutunda biyopsi örnekleri alındı (Resim 1). Her bir biyopsi örneği üç parçaya ayrıldı, her bir parça ayrı ayrı androjen, östrojen ve progesteron hormon reseptörlerinin



Resim 1. Cerrahi sünnet sırasında, eksize edilen prepusyumun iç yüzü en ön ve üst kısmından biyopsi örneği alınmaktadır. Biyopsi alınan bölge okla gösterilmiştir.

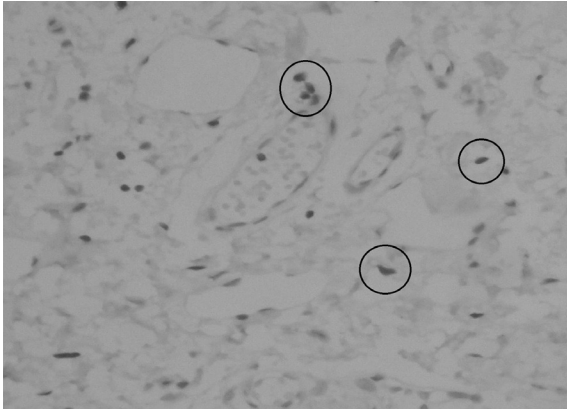
varlığı açısından immun histokimyasal olarak avidin-biotin horseradish peroxidase tekniği ile boyama yapılması sonrası ışık mikroskopu altında araştırıldı. Androjen, östrojen ve progesteron reseptör ekspresyonu, Avidin-biotin horseradish peroksidaz tekniği kullanılarak gösterilmiştir (Östrojen reseptör (SP1) (DACO), Progesteron reseptör (SP2) (DACO), Androjen (SP107) (Cell Marque) antikorları). Beş mikron kalınlığındaki kesitlere, alkolde deparafinizasyon, dehidratasyon işlemlerinden sonra endojen peroksiti bloke etmek için metanol içerisinde %2 hidrojen peroksit ile muamele edilmiştir. Kesitlere 850 watt ev tipi mikrodalga fırında, 0,01M sitrat bafır (Ph 6.0) içinde 5 dk. önışlem uygulanmıştır. Kesitler normal at serumu ile (Vector laboratories, Burlingham, CA, USA) 30 dk. inkübe edildikten sonra primer antikorlarla bir gece, 4°C'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün kesitler; 20 mM fosfat bafırlı salinde yıkanmış ve sonra 1:200 biotin ile at antifare sekonder antikorla 30 dk. inkübe edilmiştir. Yıkama basamağından sonra kesitler avidin-biotin peroksit complex ELİTE system (Vector Laboratories Inc., Burlingham, Ca, USA) ile 30 dk. ve ondan hemen sonra 3.3-diaminobenzidin (Vector Laboratories Inc., Burlingham, Ca, USA) ile 10 dk. inkübe edilmiştir. Kesitler musluk suyu ile yıkanıp, hematoksilin ile zıt boyama yapılmış, dereceli alkollerde dehidrate edildikten sonra ksilen ile beraklaştırılmıştır.

Kesitler ışık mikroskopunda incelenmiştir. Androjen östrojen ve progesteron reseptörleri, nükleer boyanma olduğunda pozitif, olmadığına ise negatif olarak kabul edilmiştir. Preparatların androjen, östrojen ve progesteron miyarları ile immun histokimyasal reaksiyonu sonucunda reseptör mevcut olan hücrelerde nükleuslar kahverengi renkte boyanmıştır.

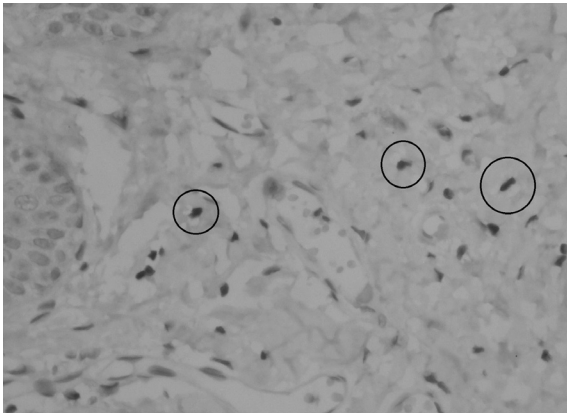
Bulgular

Üç aylık sürede kliniğimizde aile istemi nedeniyle geleneksel/dini amaçlı sünnet cerrahisi yapılan ve prepusyum gelişimi tam ve penisi normal görünümlü 12 çocuk çalışmaya dâhil edildi. Olguların yaş ortalaması 4.8 yıl (4 ay-10 yıl arasında değişmekte) idi. Eksize edilen prepusyum dokusunun frenulum bölgesinde en önde ve üstteki prepusyum cildinden 3x3 mm boyutunda biyopsi örnekleri alındı. Her bir biyopsi örneği üç parçaya bölünerek immunhistokimyasal boyamanın her biri ayrı ayrı boyandı. Tüm biyopsi örnekleri

rinde progesteron reseptörleri “negatif” bulundu, östrojen ve androjen reseptörleri ise “pozitif” bulundu. Preparatlarda immün histokimyasal reaksiyon sonucu östrojen ve androjen reseptörleri nükleuslarda kahverengi renkte boyanmıştı. Avidin-biotin horseradish peroxidase tekniği ile androjen reseptörleri pozitif nükleuslu prepusyum örnek fotoğrafı Resim 2’de, östrojen reseptörleri pozitif nükleuslu prepusyum örnek fotoğrafı ise Resim 3’te görülmektedir (Resim 2, Resim 3).



Resim 2. İmmün histokimyasal reaksiyon sonucu nükleuslarda östrojen reseptörleri kahverengi renkte boyanmıştır. Kahverengi boyanmış nükleuslar daire içine alınmıştır (ABHRx100).



Resim 3. İmmün histokimyasal reaksiyon sonucu nükleuslarda androjen reseptörleri kahverengi renkte boyanmıştır. Kahverengi boyanmış nükleuslar daire içine alınmıştır (ABHRx100).

Tartışma

Penis gelişimi ve hipospadias etyopatogenezinde androjen, östrojen ve progesteron hormonlarının etkisi hâlen tartışma konusudur⁽¹⁻⁶⁾. Hormonal etki mekanizmaları henüz tam açıklanmış olmasa da hormonal etkinin reseptörleri aracılığıyla olması gerekliliği var-

sayılmaktadır. Hormonal etki söz konusu olduğunda reseptör yapılanması da önem kazanmaktadır.

Hipospadias etyopatogenezini aydınlatırken öncelikli olarak normal penis gelişimi ve dokulardaki hormon reseptörlerinin gelişiminin nasıl olduğu tanımlanmalıdır. Ayrıca bu konudaki güncel çalışmalarda hipospadias etiolojisinde çokça tartışılan ve östrojenik etki gösteren endokrin bozucular sorumlu tutulmaktadır⁽¹²⁻¹⁴⁾.

Ancak günümüzde normal gelişmiş penil dokularda (prepusyum, üretra, corpus cavernosum, vb.) hormon reseptörlerinin yapılanmasıyla ilgili çok sınırlı sayıda çalışma ve bilgi mevcuttur. Normal veya hastalıklı dokularda hormon reseptörlerinin var olup olmamasının yanı sıra, hormon reseptörlerinin hangi dokularda, ne kadar yoğunlukta var oldukları da önemlidir. Ayrıca prenatal ve/veya postnatal dönemlerde hormon reseptör yapılanmasında farklılıklar olabileceği için, bu reseptör yapılanmalarının prenatal ve postnatal dönemlerdeki durumları ve gelişimlerinin de ayrıca ortaya konulması gereklidir⁽⁷⁻¹¹⁾. Dolayısıyla tüm bu olasılıkları aydınlatacak birbirinden bağımsız, ancak birbirini tamamlayıcı pek çok çalışmaya gereksinim vardır.

Mevcut çalışma, ileri çalışmalara temel olması ve karşılaştırma yapılabilmesi amacıyla planlandı. Normal yapılı penisi olan çocukların tam gelişmiş prepusyumlarında seks hormon reseptörlerinin araştırılması amacıyla, sünnet cerrahisi uygulanan çocuklardan yalnızca normal ve tam gelişmiş prepusyumlu olanlar çalışmaya dâhil edildi. Literatürde yalnızca prepusyumda bu yönde yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Cerrahi sünnet sonrası eksize edilen prepusyumun frenulum bölgesinde ön ve üst noktadan alınan biyopsi örneklerinde yukarıda tanımlanmış immünohistokimyasal yöntemle seks hormon reseptörlerinin varlığının araştırıldığı bu çalışmamızda, androjen ve östrojen reseptörlerinin frenulum hizasında normal gelişmiş prepusyumun ön üst kısmında mevcut olduğu gösterilmiştir. Yöntem androjen, östrojen ve progesteron açısından bilinen klasik reseptörleri tespite yöneliktir, ancak östrojen reseptörlerinin “Beta1, Beta2” gibi alt gruplarını göstermemektedir. Östrojen reseptörleri alt gruplarının “fonksiyonel” olarak tanımlanmış reseptörler olduğu gösterildiğinden dolayı^(15,16); östrojen reseptörleri alt gruplarının prepusyumda dağılımları üzerine yapılacak ileri çalışmalar,

prepusyumun tam veya dorsal prepusyum tarzında kısmi gelişiminin etyopatogenezinin aydınlatılmasında yararlı olabilir.

Progesteron sırasında bir gebelik hormonudur. Penis gelişiminde progesteron hormon etkisinin önemi, prenatal dönemde yapılan deneysel hayvan çalışmalarında vurgulanmıştır ^(6,9). Ancak çalışmamızda normal gelişmiş prepusyumda progesteron hormon reseptörleri varlığı gösterilememiştir. Bu farklılık; araştırmamızın sıçan dokusu yerine insan prepusyum dokusunda yapılmış olması, progesteron reseptörlerini tespit için kullanılan immun histokimyasal boyama yöntemlerinin farklı olması veya çalışma grubumuzun prenatal dönem yerine 4 ay-10 yaş arası çocuklardan alınan dokulardan çalışılmasından kaynaklandığını düşündürmektedir. Ancak yukarıda belirtilen nedenlerle progesteronun penis ve prepusyumun gelişiminde hormonal etkisinin olmadığını, yalnızca mevcut çalışmamızın sonucuna bakarak söylemek olası değildir. Progesteronun insan prepusyumunun prenatal veya postnatal gelişimindeki rolünün tam olarak ortaya konulabilmesi için özellikle fetus ve yenidoğanlarda yapılacak benzer çalışmalara gereksinim vardır.

Bu çalışmada, özellikle erkek fenotipinde genital gelişim için önemli olan androjen reseptörlerinin yanı sıra östrojen reseptörlerinin de varlığı tüm prepusyum örneklerinde gösterilmiştir. Çalışılan doku yalnızca prepusyum olduğundan elde edilen sonuç yalnızca normal gelişmiş prepusyum için sınırlı kalacaktır, ancak bu bulgu prepusyumları yalnızca arkada gelişmiş, önden gelişmemiş penisli ve/veya hipospadiaslı olgularda oldukça değerlidir. Penis amputasyonu yapılan erişkin olgularda yapılan benzer çalışmalarda androjen ve östrojen reseptör yapılanmaları gösterildiğinden, penil gelişimde yalnızca androjen reseptör eksikliği veya yokluğundan ziyade bir “Androjen/Östrojen Reseptörleri Dengesi veya Dengesizliği” olabileceği düşünülebilir ⁽²⁾.

Çalışmamızın bulguları anormal prepusyum gelişimi etiyolojisinde, penis ön yüzde reseptörler olmadığı için mi prepusyumun penis ön yüzde gelişmediği sorusuna tam olarak yanıt verememektedir. Ancak, çalışmamızda normal gelişmiş prepusyum dokusunda androjen ve östrojen reseptörlerinin varlığının gösterilmiş olması, “androjen ve östrojen reseptörlerinin varlığının prepusyumun eksiksiz gelişimi için gerekli

bir ön koşul” olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma olgu sayısı ve yaş grubu açısından bazı kısıtlamalarına rağmen, aşağıdaki sap-tamaları yapmamıza olanak vermektedir: Progesteron reseptörlerinin tüm prepusyum örneklerinde negatif bulunması, androjen ve östrojen reseptörlerinin ise pozitif bulunması, prepusyumun bütün ve eksiksiz olarak gelişiminde androjen ve östrojen reseptörleri ve hormonlarının önemli rol oynadığını düşündürmektedir. Ancak, normal penis veya hipospadiaslı penis gelişiminde seks hormon ve reseptörlerinin etkisinin gösterilmesi açısından ek çalışmalara gereksinim vardır; bu amaçla tarafımızca bir dizi çalışma başlatılmıştır.

Kaynaklar

1. Crescioli C, Maggi M, Vannelli GB, et al. Expression of functional estrogen receptors in human fetal male external genitalia. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(4):1815-24. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2002-021085>
2. Dietrich W, Haitel A, Huber JC, et al. Expression of estrogen receptors in human corpus cavernosum and male urethra. *J Histochem Cytochem* 2004;52(3):355-60. <http://dx.doi.org/10.1177/002215540405200306>
3. Kim KS, Liu W, Cunha GR, et al. Expression of the androgen receptor and 5 alpha-reductase type 2 in the developing human fetal penis and urethra. *Cell Tissue Res* 2002;307(2):145-53. <http://dx.doi.org/10.1007/s004410100464>
4. Mowa CN, Jesmin S, Miyauchi T. The penis: a new target and source of estrogen in male reproduction. *Histol Histopathol* 2006;21(1):53-67.
5. Schultheiss D, Badalyan R, Pilatz A, et al. Androgen and estrogen receptors in the human corpus cavernosum penis: immunohistochemical and cell culture results. *World J Urol* 2003;21(5):320-4. <http://dx.doi.org/10.1007/s00345-003-0371-y>
6. Willingham E, Agras K, de Souza AE Jr, et al. Steroid receptors and mammalian penile development: an unexpected role for progesterone receptor? *J Urol* 2006;176(2):728-33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2006.03.078>
7. Celayir S, Eliçevik M, Tireli G, et al. Expression of estrogen and androgen receptors in children with hypospadias: preliminary report. *Arch Androl* 2007;53(2):83-5. <http://dx.doi.org/10.1080/01485010601166862>
8. Kim KS, Torres CR Jr, Yucel S, et al. Induction of hypospadias in a murine model by maternal exposure to synthetic estrogens. *Environ Res* 2004;94(3):267-75. [http://dx.doi.org/10.1016/S0013-9351\(03\)00085-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0013-9351(03)00085-9)
9. Agras K, Shiroyanagi Y, Baskin LS. Progesterone receptors in the developing genital tubercle: implications for the endocrine disruptor hypothesis as the etiology of hypospadias. *J Urol* 2007;178(2):722-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2007.03.110>

10. Qiao L, Rodriguez E Jr, Weiss DA, et al. Expression of estrogen receptor alpha and beta is decreased in hypospadias. *J Urol* 2012;187(4):1427-33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2011.12.008>
11. Qiao L, Tasian GE, Zhang H, et al. Androgen receptor is overexpressed in boys with severe hypospadias, and ZEB1 regulates androgen receptor expression in human foreskin cells. *Pediatr Res* 2012;71(4-1):393-8.
12. Kim KS, Torres CR Jr, Yucel S, et al. Induction of hypospadias in a murine model by maternal exposure to synthetic estrogens. *Environ Res* 2004;94(3):267-75. [http://dx.doi.org/10.1016/S0013-9351\(03\)00085-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0013-9351(03)00085-9)
13. Klip H, Verloop J, van Gool JD, et al. OMEGA Project Group. Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study. *Lancet* 2002;359(9312):1102-7. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)08152-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(02)08152-7)
14. North K, Golding J. A maternal vegetarian diet in pregnancy is associated with hypospadias. The ALSPAC Study Team. Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood. *BJU Int* 2000;85(1):107-13. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1464-410x.2000.00436.x>
15. Böttner M, Thelen P, Jarry H. Estrogen receptor beta: Tissue distribution and the still largely enigmatic physiological function. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2014;139(1):245-51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.03.003>
16. Kuiper GG, Shughrue PJ, Merchenthaler I, et al. The estrogen receptor beta subtype: A novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 1998;19(4):253-86. <http://dx.doi.org/10.1006/frne.1998.0170>