

# KRONİK DİABETİK RAT PENİS DOKUSUNDA NİTRİK OKSİT SENTAZ İÇERİĞİ VE E VİTAMİNİNİN NİTRİK OKSİT SENTAZA ETKİSİ

## NITRIC OXIDE SYNTHASE AND THE EFFECT OF VITAMIN E ON NITRIC OXIDE SYNTHASE IN CHRONIC DIABETIC RAT PENIS

ALICI, B.,\* GÜMÜŞTAŞ, M. K.,\*\* AKKUŞ, E.,\* ÖZKARA H.,\* İKİTİMUR E.,\*\*\* HATTAT, H.,\*

### ÖZET

Kronik diabetik rat penis dokusunda nitrik oksit sentaz içeriği ve diabetik ratlarda E vitamini uygulamasının nitrik oksit sentaz üzerine etkisini incelemektir.

180-250 gr. ağırlıkta, genç-erişkin, erkek Sprague-Dawley ratlar, diabetik (n: 10) diabetik olup E vitamini alan grup (n: 8) ve diabetik olmayan normal kontrol grubu (n: 8) olarak üç gruba ayrıldı. 65 mg/kg streptozotocin tek doz halinde intraperitoneal yolla verilerek diabet oluşturuldu. Diabet oluşturulan ratlardan sekizine 48. saatten itibaren 90 mg/48 saat dozda E vitamini intraperitoneal olarak başlandı. Sekiz hafta sonra sakrifiye edilen ratların penisleri en-blok alındı. Kriyostat ile 7 µm lik kesitler alındı, NADPH-diaforaz boyası ile boyandı ve boyanan odaklar mikroskopta sayıldı.

Diabetik grup en az boyanma gösterirken, E vitamini alan grup daha fazla ve diabetik olmayan normal kontrol grubu en fazla boyanma gösterdi. Boyanan odak sayıları diabetik grupta ortalama 21±15, diabetik olup E vitamini alan grupta 78±32 ve diabetik olmayan kontrol grubunda ise 184±46 bulundu.

Diabetik ratlarda penil dokuda nitrik oksit sentaz varlığının azaldığı, E vitamini uygulamasının penil nitrik oksit sentaz içeriğinin kısmen korunmasına katkıda bulunduğu kanaatindeyiz.

### ABSTRACT

To determine nitric oxide synthase content in chronic diabetic rat penis and the effect of vitamin E on nitric oxide synthase in diabetic rats.

Male, young-adult Sprague-Dawley rats weighing 180-250 gr were divided into three groups: diabetic (n: 10), diabetic rats receiving vitamin E (n: 8) and non-diabetic control group (n: 8). Diabetes was established by introduction of streptozotocin 65 mg/kg intraperitoneally in single dose. To eight of diabetic rats, 48 hours after streptozotocin injection, vitamin E was administered 90 mg/48 hours intraperitoneally. Eight weeks later, the rats were sacrificed and the penises were excised en-bloc. Cryostat sections were cut at 7 µm, stained with NADPH-diaforase stain and stained regions were counted under the microscope.

While scarce staining was present in diabetic group, better staining pattern was present in vitamin E group and best staining was present in the non-diabetic control group. Mean number of stained regions were 21±15 in diabetic group, 78±32 in diabetic rats receiving vitamin E and 184±46 in non-diabetic, control group.

Nitric oxide synthase content was decreased in diabetic rats and we believe that vitamin E administration may have some beneficial effect on preserving penile nitric oxide synthase content.

**ANAHTAR KELİMELER:** Nitrik oksit sentaz, diabet, penis, E vitamini.

**KEY WORDS:** Nitric oxide synthase, diabetes, penis, vitamin E.

Dergiye geliş tarihi: 12.2.1999

Yayına kabul tarihi: 16.4.1999

\*İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Üroloji ABD, Cinsel Fonksiyon Bozuklukları Merkezi, \*\*Biokimya ABD.  
İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, \*\*\*Tıbbi Biyoloji ABD.

**GİRİŞ**

Korpus kavernozum düz kası relaksasyonu sinir ve endotel kaynaklı biomoleküller tarafından kontrol edilmektedir. Bu biomoleküllerin en önemlisi nitrik oksit'tir (NO).<sup>1</sup>

Nitrik oksit, L-arginin'in nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından L-sitrullin'e çevrilmesi sırasında sentezlenmektedir.<sup>2</sup> L-arginin'in L-sitrullin'e çevrilmesi için NOS'ın yanısıra genellikle nikotinamid dinukleotid fosfat'a (NADPH) gereksinim vardır. Vincent ve arkadaşları, NADPH diaforaz enziminin, spesifik nöronal NOS (nNOS) antikoru ile aynı yeri boyadığını göstermişler ve nöronal NADPH diaforaz'ın bir NOS olduğunu bildirmişlerdir.<sup>3</sup> NADPH varlığında NADPH diaforaz, nitroblue tetrazolium ile mavi renkte boyanır. Daha önce yapılmış bir çalışmada, kavernoöz dokuda NOS antikoruna ile NADPH diaforaz boyanmaları kıyaslanmış ve her ikisinin aynı lokalizasyonu boyadıkları ispatlanmıştır.<sup>4</sup>

Diabet, erektil disfonksiyona yol açan önemli bir risk faktörüdür. Ratlarda penil NOS aktivitesi ve varlığı ile ilgili bir çok çalışma yapılmıştır. Konjenital diabetik BB ratlarda hem penil NOS aktivitesinin, hem de nNOS içeriğinin azaldığı bildirilmiştir.<sup>5</sup> Yaşlanma ile ratlarda erektil cevabın ve penil NOS aktivitesinin azaldığı literatürde belirtilmektedir.<sup>6, 7</sup> Sigara tiryakiliğinin yaşa bağlı olmaksızın penil NOS aktivite ve nNOS içeriğinde azalmaya yol açtığı bilinmektedir.<sup>8</sup>

Bu çalışmamızın amacı, kronik diabetik rat penis dokusunda nitrik oksit sentaz içeriği ve diabetik ratlarda E vitamini uygulamasının nitrik oksit sentaz üzerine etkisini incelemektir.

**GEREÇ VE YÖNTEM**

Genç-erişkin, 180-250 gr. ağırlıkta, erkek Sprague-Dawley ratlar, diabetik grup (n: 10), diabetik olup E vitamini alan grup (n: 8) ve diabetik olmayan normal kontrol grubu (n: 8) olmak üzere üç gruba ayrıldı.

Diabet oluşturmak için ratlara streptozotosin (STZ) 65 mg/kg'lık tek doz halinde intraperitoneal yolla verildi. STZ uygulamasından 48 saat sonra akut diabet oluşan ratlar sekiz hafta sonunda kronik diabetik hale gelmiştir. STZ ile diabet oluşmasının kontrolü kan glikoz değerleri ve he-

moglobin A<sub>1c</sub> düzeyleri ölçülerek yapılmıştır. Akut diabet oluşturulan ratlardan 8 tanesine 48. saatten itibaren E vitamini (90 mg/48 saat) intraperitoneal yoldan uygulanmıştır.

**Doku hazırlanması ve NADPH diaforaz boyama tekniği:**

Her üç gruptaki toplam 26 rat sekizinci haftada eter anestezisi uygulanarak penisleri blok halinde eksize edildi ve kalplerinden 8-10 cc kan drene edilerek sakrifiye edildiler. Daha önce Brock ve ark. tarafından tarif edildiği biçimde, eksize edilen penisler hemen O.C.T. maddesi (Tissue-Tek, Miles lab., USA) içine konulup sıvı nitrojen içinde donduruldu ve -70° C'de saklandı.<sup>9</sup>

Boyama yapılacağı zaman cryostat ile 7 µm'lik kesitler hazırlandı. Bu kesitler pH 8 olan % 4 formaldehit / 0.05 M fosfat tampon ile beş dakika fikse edildi. Daha sonra kesitler β-NADPH (1 mg/mL, Sigma), nitroblue tetrazolium (0.1 mg/mL, sigma) ve pH 8.0 olan 0.1 M fosfat tampondaki % 0.2 Triton karşımı ile 45 dakika 37° C'de inkübe edildiler. Tampon çözelti ile yıkanan kesitler mikroskopta incelendi. NADPH ile boyanan yapılar koyu mavi boyalı bölgeler halinde göründüler. Boyanma paterni 200 büyütmede değişik 10 alanda tüm dokularda değerlendirildi ve boyanan odaklar sayıldı.

İstatistiksel analiz için t-test uygulandı ve anlamlılık p<0.05 olarak alındı.

**BULGULAR**

Diabetik, Diabetik+E vitamini grubu ve kontrol gruplarının örnekleri arasında histolojik bakımdan bariz NOS boyanma farkı mevcuttu. Diabetik grup en az boyanma gösterirken (Resim 1), E vitamini alan grup (Resim 2) diabetik gruptan daha fazla, ancak kontrol grubundan daha az boyanma gösterdi. En fazla boyanma kontrol grubunda görüldü ve boyanan odaklar kolaylıkla ayırt edebiliyordu (Resim 3).

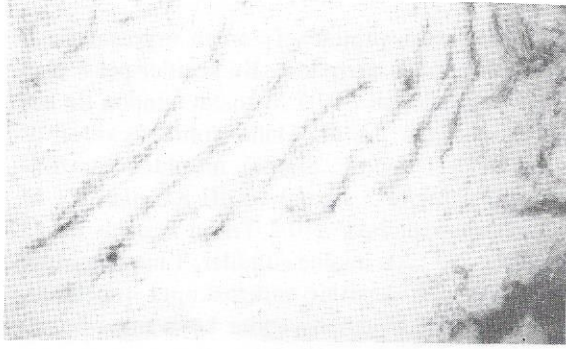
Tablo 1'de görüldüğü gibi, diabetik grupta çok az boyanma vardı ve boyanan odak sayısı ortalama 21±15 idi. Diabetik olup E vitamini alan grupta ise ortalama 78±32 boyanmış odak sayılı ve kontrol grubunda ise bu sayı ortalama 184±46 buldu.



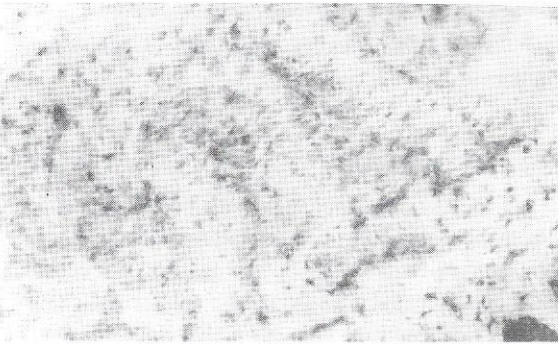
Resim 1. Diabetik rat korpus kavernozumunda NADPH-diaforaz ile boyanma (X200 büyütme)



Resim 2. Diabetik olup E vitamini alan rat korpus kavernozumunda NADPH-diaforaz boyanma. (X200 büyütme)



Resim 2. Kontrol grubu rat korpus kavernozumunda NADPH-diaforaz ile boyanma (X200 büyütme)



Tablo 1. Kavernoöz cisimlerde değişik on alanda sayılan NOS içeren odak sayıları

| Gruplar                      | NOS pozitif odaklar |
|------------------------------|---------------------|
| Diabetik (D) (n: 10)         | 21±15               |
| Diabetik+E vit. (D+E) (n: 8) | 78±32               |
| Kontrol (K) (n: 8)           | 184±46              |

D ile D+E ve K arasında  $p<0.05$  ve D+E ile K arasında  $p<0.005$  tir.

## TARTIŞMA

Nitrik oksit sentazın L-argininden NO sentezlemesi  $Ca^{+2}$ /calmodulin'e bağlı bir mekanizma ile olmaktadır.<sup>1, 10</sup> NO, siklik guanozin monofosfat'ı (cGMP) aktive ederek düz kas gevşemesi yaratan potent bir nörotransmitterdir. Eretil disfonksiyon diabetiklerde sık görülmektedir. Diabete bağlı erektile disfonksiyon gelişmesinin penisteki NOS azalmasına, dolaylı olarak olarak da nitrik oksit azalmasına bağlı olup olmadığı bilinmemektedir. Yapılan bazı çalışmalarda, konjenital diabetik ratlarda penil NOS aktivitesinde ve nNOS içeriğinde azalma olduğu gösterilmiştir.<sup>5, 11</sup> Buna karşın, bir çalışmada ise diabetik ratlarda penil NOS aktivitesinde artış olduğu bildirilmiştir.<sup>12</sup> Bizim çalışmamızda ise, kronik diabetik ratlarda, kontrol grubu ile kıyaslandığında, penil NOS içeriğinin azaldığı gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda, E vitamini alan diabetik ratlarda NOS içeriği diabetik olanlardan iyi, ancak kontrol grubundan daha kötü bulunmuştur. E vitamininin öncelikli olarak antioksidan etkisi nedeniyle diabetiklerde oksidatif stresi azalttığı, ikincil olarak da oksidatif stresin azalmasına bağlı olarak vasküler ve nörojenik yapıların dejeneratif etkilerden korunmasının, NOS düzeyinin azalmasının yavaşlattığı düşünülebilir. Yapılan bir çalışmada, diabetik rat aortunda endotele bağlı relaksasyon defektinin E vitamini verilerek engellendiği bildirilmiştir.<sup>13</sup> Diabetiklerde endotele bağlı relaksasyon defektinin çoğunlukla fazla üretilen reaktif oksijen radikallerine bağlı olduğu, E vitamininin de serbest radikallerle savaşarak vasküler endotel koruduğu belirtilmiştir. E vitamini haricinde oksijen radikallerini inaktive eden C vitamini ile superoksit dismutaz'ın (SOD) diabetiklerde, endotel kaynaklı relaksasyonda rolü olan NO etkisini restore ettikleri kaydedilmiştir.<sup>14, 15</sup> Bizim çalışmamız da bu çalışmalarda uyum göstermektedir. Tüm bu sonuçların desteklediği gibi, diabetiklerde E vitamini uygulamasının penil dokudaki NOS içeriğinin korunmasına katkısı olabileceği düşünülebilir.

Vincent ve arkadaşlarının gösterdiği gibi NADPH diaforaz boyama tekniği ile NOS varlığı gösterilebilmektedir. Bu boyama tekniği ile yapılan bir çalışmada, kavernoöz sinir hasarı olan hastaların klinik anamnezleri ile kavernoöz cisim biopsisi NOS boyanma sonuçları iyi korelasyon

göstermiştir.<sup>9</sup> Aynı çalışmada özellikle nörojenik kaynaklı erektil disfonksiyonda kavernoöz cisim biopsisi ve NADPH diaforaz boyama ile morfolojik inceleme ve değerlendirme yapılabileceği belirtilmiştir. Keza diabetiklerde kavernoöz cisim biopsisi yapılarak NADPH diaforaz boyama tekniği ile dokuda NO içeriği ve dağılımı hakkında bilgi edinilebilir. Ancak, azalmış NO içeriği, tek başına, NO aktivitesini gösteremez. Dolayısı ile diabete bağlı erektil disfonksiyondan tek başına sorumlu olduğu söylenemez.

Diabet nedeni ile ortamda mevcut olan oksijen radikalleri (O<sub>2</sub>) hızla NO ile birleşerek peroksinitrit (NO<sub>3</sub>) oluştururlar. Bu çok toksik olan yeni radikal, hem vasküler sistemde ve nöronlarda harabiyet yaratabilmekte, hem de NO aktivitesini azaltabilmektedir.<sup>12</sup> Diabetik rat penislerinde azalmış NOS içeriği bu harabiyete bağlı olabilir.

Sonuç olarak, diabetik ratlarda penil dokuda NOS varlığının azaldığı, E vitamini uygulamasının penil NOS içeriğinin kısmen korunmasına katkıda bulunduğu kanaatindeyiz.

#### KAYNAKLAR

- 1- Ignarro LJ, Bush PA, Buga GM et al.: Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electric field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 170: 843-850, 1990.
- 2- Moncada S.: The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta Physiol. Scand.* 145: 201-227, 1992.
- 3- Vincent SR, Hope BT: Neurons that say NO. *Trends Neurosci* 15: 108-113, 1992.
- 4- Carrier S, Zvara P, Nunes L et al: Regeneration of nitric oxide synthase-containing nerves after cavernous nerve neurotomy in the rat. *J. Urol.* 151 (suppl): 448, 1994.
- 5- Vernet D, Cai L, Garban H et al.: Reduction of penile nitric oxide synthase in diabetic BB/WORdp (type I) and BBZ/WORdp (type II) rats with erectile dysfunction. *Endocrinology* 136: 5709-5717, 1995.
- 6- Carrier S, Nagaraju P, Morgan DM. et al.: Age decreases nitric oxide synthase-containing nerve fibers in the rat penis. *J Urol.* 157: 1088-1092, 1997.
- 7- Garban H, Vernet D, Freedman A et al.: Effect of aging on nitric oxide-mediated penile erection in the rat. *Am L. Physiol.* 268: H467, 1995.
- 8- Xie Y, Garban H, Chris NG et al.: Effect of long-term passive smoking on erectile function and penile nitric oxide synthase in the rat. *J Urol.* 157: 1121-1126, 1997.
- 9- Brock G, Nunes L, Padma-Nathan H et al.: Nitric oxide synthase: a new diagnostic tool for neurogenic impotence. *Urology* 42: 412-417, 1993.
- 10- Bredt DS, Ferris CD, Synder SH: Nitric oxide synthase regulatory sites phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; Identification of flavin and calmodulin binding sites *J Biol Chem* 267: 10976-10981, 1992.
- 11- McVary KT, Rathnau CH, McKenna KE: Sexual dysfunction in the diabetic BB/WOR rat: a role of central neuropathy. *Am J Physiol* 272: 259-267, 1997.
- 12- Elabbady AA, Gagnon C, Hassouna MM et al.: Diabetes mellitus increases nitric oxide synthase in penises but not in major pelvic ganglia of rats. *Br J Urol.* 76: 196-202, 1995.
- 13- Keegan A, Walbank H, Cotter MA et al.: Chronic vitamin E treatment prevents defective endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta. *Diabetologia.* 38: 1475-1478, 1995.
- 14- Ting HH, Timimi FK, Boles KS et al.: Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilatation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 97: 22-28, 1996.
- 15- Ohishi K, Carmines PK: Superoxide dismutase restores the influence of nitric oxide on renal arterioles in diabetes mellitus. *J Am Soc Nephrol* 5: 1559-1566, 1995.