

SAĞLIKLI VE DİYABETİK SIÇANLARDA TOPIKAL VE/VEYA SİSTEMİK OLARAK UYGULANAN LEPTİNİN YARA İYİLEŞMESİ VE YARA NİTRİK OKSİT DÜZEYLERİNE ETKİSİ

Şebnem GÜLEN¹, Sibel DİNÇER¹, Deniz ERBAŞ¹, Neşe LORTLAR², Deniz ERDOĞAN²

ÖZ:

Amaç: Bu çalışmada sağlıklı ve streptozotosin (STZ) ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda leptin uygulamasının yaralarda iyileşmeye ve nitrik oksit düzeylerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmada 24 adet Wistar Albino erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar diyabet olmayan (NDM) (n=12) ve STZ ile diyabet oluşturulmuş (STZ-DM) (n=12) olarak iki ana gruba ayrıldı. STZ (55mg/kg, intraperitoneal(i.p.), tek doz) uygulamasından 7 gün sonra kan glukoz düzeyi 300 mg/dl ve üzeri olan sıçanlar diyabetik kabul edildi. Tüm sıçanlarda, genel anestezi altında iken, 6-mm çapında dermal punch ile sırtta orta hattın her iki yanında üçer tane olmak üzere eksizyonel yaralar oluşturuldu. Sıçanlar, leptin ve taşıyıcı (PBS) olarak alt gruplara ayrıldı. Sıçanlara yara yapılan günden itibaren beş gün süreyle, i.p. (0.1 mg/kg/gün) ve topikal (5 µg/yara/gün) olarak rekombinant sıçan leptini ve/veya PBS uygulandı. Uygulamaların sonunda hayvanlar anestezi altında kalplerinden kan alınarak feda edildi ve yara dokuları alındı. Yara dokuların ışık mikroskopisinde histolojik olarak değerlendirildi. Yara dokularında nitrik oksit düzeylerinin göstergesi olan nitrat-nitrit düzeyleri ölçüldü ve NOx olarak ifade edildi.

Bulgular: Histolojik değerlendirmede diyabetik yaralarda inflamasyonun devam ettiği, kollojen oluşumu ve epitelizasyonun zayıf olduğu gözlemlenmiştir. NDM grupta sadece topikal leptin uygulanan yaraların, STZ-DM grupta ise sistemik ve birlikte topikal leptin uygulanan yaraların epitelizasyonunun ve kollojen organizasyonunun, leptin uygulanmayan yaralara göre belirgin olarak daha iyi olduğu gözlemlenmiştir. Yara NOx düzeyleri ise STZ-DM hayvanlarda ve sistemik ve/veya topikal leptin uygulanmış hem STZ-DM hem de NDM sıçanlarda, hiç leptin tedavisi almamış kontrol yaralara göre anlamlı şekilde daha düşük bulunmuştur.

Sonuç: Sonuçlarımız leptinin NDM sıçanlarda sadece topikal olarak, STZ-DM sıçanlarda ise sistemik ve topikal birlikte uygulandığında yara iyileşmesini olumlu etkilediğini göstermektedir. Yara dokularında NOx düzeyleri ise, yarada inflamasyonun derecesi ve hiperglisemi ile ilişkili görünmektedir.

Anahtar Kelimeler: Streptozotosin, Diyabet, Leptin, Yara İyileşmesi, Nitrik Oksit.

THE EFFECT OF TOPICALLY AND/OR SYSTEMICALLY ADMINISTERED LEPTIN ON WOUND HEALING AND NITRIC OXIDE LEVELS IN HEALTHY AND DIABETIC RATS

ABSTRACT:

Purpose: In this study the effects of leptin administration on wound healing and nitric oxide levels in healthy and diabetic rats (with streptozotocin, STZ) are investigated.

Material and methods: Twenty four male Wistar Albino rats were used in this study. The animals were divided into two groups as non-diabetic (NDM) (n=12) and diabetic (STZ-DM) (n=12). Seven days after the STZ administration (55mg/kg, intraperitoneal (i.p.), single dose), rats with blood glucose level of 300 mg/dl and over were considered diabetic. Under general anesthesia, all rats were subjected to excisional wound formation on the back and on both sides of the central line (3 on the each side) with 6-mm diameter dermal punch. The rats were divided into leptin and vehicle (PBS) subgroups. In leptin group, recombinant rat leptin and/or PBS was administered intraperitoneally (0.1 mg/kg/day) and topically (5 µg/wound/day) to the animals for 5 days after the wound formation. After administrations, the rats were sacrificed via cardiac puncture under anesthesia and wound tissue samples were taken. The wound samples were examined under light microscopy. The nitrite-nitrate levels which are the indicator of nitric oxide levels in wound tissue were measured and expressed as NOx.

Results: In histological evaluation, it was observed that, the inflammation continued and collagen production and epithelialization were incomplete in diabetic rats. In topical leptin administered NDM rats and systemic-topical leptin administered STZ-DM rats, epithelialization and collagen organization was significantly improved in the wounds compared to vehicle subgroup with no leptin treatment. When wound NOx levels in leptin group are compared to vehicle subgroup with no leptin treatment, NOx levels were found to be significantly lower.

Conclusion: Our findings point out that leptin has a positive effect on wound healing when it is administered only topically in healthy rats. However, it has a positive effect on wound healing when it is administered systemically and topically together in rats with diabetes. The NOx levels in wound tissue appear to be related to the degree of wound inflammation and hyperglycemia.

Key words: Streptozotocin, Diabetes, Leptin, Wound Healing, Nitric Oxide

GİRİŞ

Yara iyileşmesi inflamasyon, proliferasyon, matris birikimi, yeniden şekillenme fazlarından oluşan ve pek çok hücre tarafından yönetilen karmaşık bir fizyolojik süreçtir. Bu karmaşık olaylar bir-biri içine geçmiş olarak sırayla pıhtılaşma, inflamasyon, granülasyon dokusu oluşumu, epitelizasyon, neovaskularizasyon, kollojen sentezi ve yara bütüşmesi safhalarını içerir.¹ Fonksiyonel iyileşme sürecinde meydana gelen aksaklıklar iyileşmenin yetersizliğiyle sonuçlanır.

Yara iyileşmesi, yara dokusunda bulunan hücrelerden kaynaklanan çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler ve nitrik oksit tarafından düzenlenir.² Nitrik oksit (NO) küçük, diffüze olabilen ve fizyolojik ve patofizyolojik birçok sürece katılabilen bir sinyal molekülüdür. Nitrik Oksit Sentaz (NOS) adı verilen enzimin katalizlediği reaksiyon sonucunda L-Arginin'in L-Sitrüllin'e dönüşümü esnasında oluşur.³ NOS enziminin endotelial (eNOS), nöronal (nNOS) ve indüklenebilir (iNOS) olmak üzere üç izoformu bulunmaktadır. eNOS ve nNOS, Ca²⁺ ve Kalmodulin tarafından düzenlenip düşük düzeylerde (nmol/L düzeylerinde) NO üretimine, iNOS ise post-transkripsiyonel olarak düzenlenerek ve inflamatuvar uyarıya cevap olarak yüksek düzeylerde (µmol/L düzeylerinde) NO üretimine sebep olur.

Yara iyileşmesine katılan trombositler, inflamatuvar hücreler, fibroblastlar, endotelial hücreler ve keratinositlerin NOS'ın farklı izoformlarını kullanarak NO sentezlendiği saptanmıştır.^{4,5} Yara dokusundaki NO, iyileşmenin inflamatuvar fazında, bu faza hakim olan hücrelerde esas olarak bulunan iNOS izoformundan; ilerleyen fazlarda ise bu evrelerin hakim hücrelerinin daha çok içerdiği eNOS ve nNOS izoformlarından kaynaklanmaktadır.^{6,7} Bu nedenle yara dokusundaki NO miktarı iyileşmenin ilk günlerinde (1.-5. günler) yüksek düzeyde iken, ilerleyen günlerde giderek azalarak iyileşmede belirleyici rol oynamaktadır.^{4,5,7}

Yara dokusunda NO düzeylerinin azaldığı bildirilen durumlardan birisi iyileşmenin geciktiği diyabetik yaralardır.^{8,9} Diyabette yara iyileşmesinin gecikmesi ciddi bir klinik problemdir. İyileşmedeki gecikme; hücrel infiltrasyonda ve granülasyon dokusu oluşumunda gecikme, anjiyogenezde, kollojenin oluşumunda ve organizasyonunda azalma ile karakterizedir.¹⁰ Diyabette oluşan hücrel sorunların temelinde hipergliseminin olduğu düşünülmektedir.¹¹ Hiperglisemi nedeniyle oluşan ve yara iyileşmesini geciktiren durumlar arasında; kemotaksis ve fagositoz yetersizliği (enfeksiyona eğilim), proteolitik aktivitenin, yara hücrelerinin apoptozunun ve oksidatif stresin artışı¹² ile büyüme faktörlerinin ve fibroblast proliferasyonunun azalması sayılabilir.¹⁰

Streptozotosin (STZ) ile oluşturulmuş deneysel diyabette; insülin düzeyleri ve beden ağırlığı ile birlikte plazma leptin düzeyleri de azalmaktadır.¹³⁻¹⁸

¹ Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi ¹Fizyoloji, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalları, Ankara, Türkiye

Leptin yapımı ob geni ile kontrol edilen, 167 aminoasit içeren ve başlıca yağ doku tarafından sentezlenerek kana salınan çok fonksiyonlu bir hormondur. Leptin etkisini santral sinir sisteminde ve periferik pek çok dokuda yer alan reseptörü aracılığıyla göstermektedir.¹⁹ Yara iyileşmesine katılan hücrelerden eritrositler, trombositler, endotelial hücreler, fibroblastlar ve keratinositlerde²⁰⁻²³, yara oluşturulmuş derinin deri altı damarlarında²⁴ leptin reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir.

Leptin geninden yoksun, genetik olarak obez ve diyabetik fenotipe sahip *ob/ob* farelerde yara iyileşmesi gecikmektedir. Bu hayvanlara leptin uygulaması ile diyabete ve leptin eksikliğine bağlı bulguların yanı sıra, yara iyileşmesi de düzelmektedir.^{23,24} Leptinin, yara iyileşmesi esnasında, keratinositlerin mitojenik etkinliğini ve re-epitelizasyonu artırarak olumlu etki yaptığı gösterilmiştir.^{22,25}

Leptin, *in vitro* koşullarda farklı hücre tiplerinde ve *in vivo* uygulandığında plazma ve bazı dokularda NO düzeylerini etkileyebilmektedir.²⁶⁻³⁰

Bu bilgiler ışığında planladığımız çalışmamızda, STZ ile diyabet yapılarak hiperglisemi ve hipoleptinemi oluşturulmuş sıçanlarda sistemik ve/veya topikal leptin uygulamalarının, eksizyonel yaraların iyileşmesine ve yara dokusu NOx düzeylerine olan etkisini araştırmak amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Deney Hayvanları

Çalışma Gazi Üniversitesi deney hayvanları etik kurulundan izin alındıktan sonra; Refik Saydam Hıfzıssıha enstitüsünden sağlanan, ortalama $250 \pm 23,9$ gram ağırlığında, 8-10 haftalık 24 adet erkek Wistar albino sıçan ile gerçekleştirildi. Sıçanların her biri ayrı kafeslerde standart sıçan yemi ve musluk suyu ile beslendi. 12 saat aydınlık/karanlık (08⁰⁰ – 20⁰⁰) döngüsünde tutuldu.

Çalışma Düzeni ve Diyabet Oluşturma:

Bütün hayvanlar çalışmaya alınmadan önce bir haftalık uyum koşullarında bekletildi. Hayvanlar, diyabet olmayan nondiyabetik (NDM)(n=12) ve STZ diyabetli (STZ-DM)(n=12) olarak iki ana gruba ayrıldı. Çalışmanın ilk gününde, bir gün önceden aç bırakılan hayvanlar tartılarak açlık kan şekeri (AKŞ) ölçüldü. STZ-DM grubundaki hayvanlara streptozotosin (SİGMA), soğuk sitrat tampon (0.1 M, pH=4.5, 1 ml/kg) içinde çözüldükten sonra, 55mg/kg tek dozda i.p. olarak enjekte edildi. Sağlıklı kontrol grubundaki (NDM) hayvanlara ise aynı hacimde sitrat tampon enjekte edildi.

STZ uygulamasından sonraki 7. günde, bir gün önceden aç bırakılan ve glukometre (Glukotrend/Roche) ile kuyruk ve ninden alınan kanda yapılan ölçümde açlık kan şekeri değeri 300mg/dl ve daha üzeri olan sıçanlar diyabet kabul edilerek, kontrol grubu sıçanlarla birlikte yara oluşturma işlemine alındı. Çalışmanın başında, yara oluşturma protokolünden önce ve çalışma sonunda beden ağırlıkları ve açlık kan şekeri değerleri kaydedildi.

Yara Oluşturma Protokolü:

Yara oluşturulmadan önce sıçanlara anestezi amacıyla 60mg/kg ketamin HCl (Ketalar[®]) ile 8 mg/kg Xylazin (Alfazin[®]) intramusküler (i.m.) olarak uygulandı. Anestezi sağlandıktan sonra sırt derileri traş edildi, %70 lik etanolle silinerek temizlendi. Sırtta orta hattın her iki yanında üçer adet olacak şekilde, orta hattan ve birbirlerinden ortalama bir cm uzaklıkta, altı adet eksizyonel tam deri kesi yarası, 6 mm çaplı dermal punch aleti kılavuzluğunda oluşturuldu (Şekil 1).



Şekil 1. Uygulanan eksizyonel yara protokolü.

Uygulama Protokolü:

Yaranın yapıldığı gün de dahil olmak üzere sıçanlara beş gün süre ile günde bir kez, saat 15⁰⁰-15³⁰ arasında i.p. ve topikal uygulamalar yapıldı. STZ-DM ve NDM her iki grupta da hayvanların yarısına Fosfat Tampon Solüsyonunda (PBS) çözülmüş (pH:7.4; 0.25 mg/ml) fare rekombinant leptin (CAL-BİOCHEM) 0.4 ml/kg (0.1 mg/kg/gün leptin)²⁷, bu grupların kontrolü kabul edilen gruplara ise eşit hacimde PBS i.p. olarak uygulandı. Tüm gruplarda orta hattın sağındaki yaralara 20 µl/yara leptin içeren solüsyon (5 µg/yara leptin)²⁴, orta hattın solundaki yaralara ise eşit hacimde PBS topikal olarak uygulandı. Beş günlük uygulama sonrası yaranın 6. günü sabahı geçeden aç bırakılan hayvanlar Tiyopental Sodyum (Pental Na[®]) (50 mg/kg) anestezisi altında iken kalplerinden kan alarak feda edildi. EDTA'lı tüplere alınan kanlar 3000g' de 5 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Yara dokuları dermal punch aleti ile çıkarıldıktan sonra birer yara örneği % 10'luk formaline alındı. Geriye kalan yara örnekleri sıvı azota kondu. Doku örnekleri çalışılincaya kadar -20 °C de saklandı.

Histolojik Değerlendirme:

Elde edilen yara dokusu örnekleri %10'luk nötral formolde tespit edilerek rutin histolojik takip yöntemlerinden geçirildikten sonra parafin bloklara gömüldü. Beş mikronluk kesitler halinde polilizinli lamlara alınan dokular, etüvde deparafinize edildikten sonra, iki kez 15'er dakika ksilolde bekletildi. Azalan etil alkol gradiyentinde rehidrate edilen dokular distile suya kadar getirildi. Ardından Masson-Trikrom Goldner with light green (Bio-Optica, San Faustina, 58, 20134, Milano, Italia) boyası ile boyanan kesitler Leica DM 4000 B (Leica, Wetzlar, Germany) fotoşık mikroskobu ile değerlendirildi.

Plazmada Leptin Düzeyi Ölçümü:

Plazma leptin düzeyleri ölçümü için rat leptin ELISA kiti (Titerzyme, Assay Designs, USA.) kullanıldı.¹⁵

Nitrik Oksit Düzeyi Tayini

Dokuda Nitrik Oksit'in göstergesi olarak nitrit+nitrat (NOx) düzeyleri tayininde modifiye Griess yöntemi kullanıldı.^{31,32} Elde edilen değerler nmol/gr doku olarak hesaplandı.

Verilerin İstatistiksel Analizi

Değerler beden ağırlıkları için ortalama \pm standart sapma (SS), diğer veriler için ortalama \pm standart hata (SH) olarak verilmiştir. Bilgisayarda 'SPSS; 13.0 for Windows' programı kullanılarak normal dağılıma uyum: Saphiro-Wilk testi ile; bağımsız gruplar arasındaki ilişki: Kruskal Wallis ve Mann Whitney U testleri ile; bağımlı gruplar arasındaki ilişki Wilcoxon testi ile gerçekleştirilmiş, $p < 0.05$ değerleri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

STZ (55 mg/kg) ve leptin uygulamalarının açlık kan şekeri değerleri üzerine etkileri Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Gruplarda çalışma başında, uygulamalardan önce ve sonra elde edilen açlık kan şekeri değerleri.

	Sistemik uygulama	Denek sayısı (n)	Açlık Kan Şekeri-1 (mg/dl)	Açlık Kan Şekeri-2 (mg/dl)	Açlık Kan Şekeri-3 (mg/dl)
NDM	PBS	6	86,6 \pm 2,0	86,8 \pm 2,9	123,1 \pm 3,0 ^b
	LEPTİN	6	88,5 \pm 1,7	83,0 \pm 4,4	129,6 \pm 8,9 ^b
STZ-DM	PBS	6	78,0 \pm 6,7	380,8 \pm 20,3 ^a	341,8 \pm 33,2
	LEPTİN	6	74,5 \pm 2,9	341,8 \pm 33,2 ^a	357,5 \pm 19,5

Açlık Kan Şekeri-1: Çalışmanın başında STZ uygulamasından önce

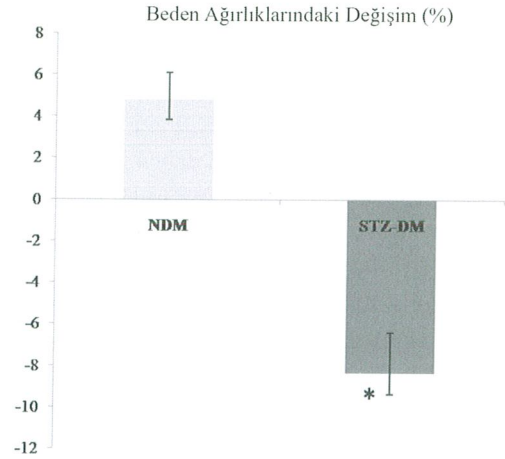
Açlık Kan Şekeri-2: STZ uygulamasından bir hafta sonra sistemik uygulamalara başlamadan önce

Açlık Kan Şekeri-3: Uygulamaların sonunda, 6. günde ve anestezi altında iken

^a $p < 0,01$; Açlık Kan Şekeri-2, Açlık Kan Şekeri-1 ile karşılaştırıldı.

^b $p < 0,05$; Açlık Kan Şekeri-3, Açlık Kan Şekeri-1 ve Açlık Kan Şekeri-2 ile karşılaştırıldı.

Çalışma başında henüz diyabet oluşturmadan önce her grupta eşit sayıda sıçan olacak şekilde ikiye ayrılan sıçanların beden ağırlıkları farklı bulunmamıştır (250,8 \pm 19,0 ve 249,6 \pm 28,8; $p > 0,05$). STZ uygulamasında bir hafta sonra; yara işleminden önce, PBS ve leptin uygulamaları için eşit sayıda denek içeren gruplara rastgele seçimle ayrılan sıçanların uygulamalar öncesindeki bir haftalık dönemde ve beş günlük uygulamaların sonunda beden ağırlıklarında meydana gelen değişim yüzde değer olarak hesaplanmıştır. Beden ağırlıklarındaki değişimler Şekil 2A ve B de özetlenmiştir.

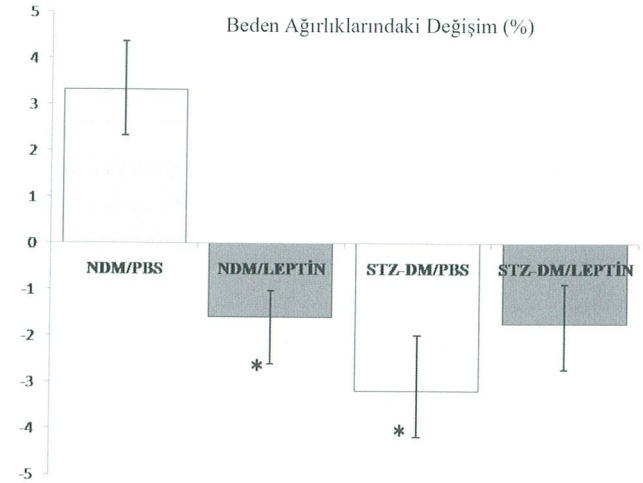


Şekil 2A. Diyabet oluşturulduğu günden sonraki bir hafta içerisinde (leptin uygulamaları başlamadan önceki hafta) gruplarda meydana gelen beden ağırlığı değişimi % değişim olarak hesaplanmıştır.

NDM: Diyabetsiz, sağlıklı grup (n=12)

STZ-DM: Streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş grup (n=12)

* $p < 0,001$



Şekil 2B. Yaralamanın yapıldığı ve uygulamanın başladığı ilk gün ile beş günlük uygulamanın sonu arasında gruplarda meydana gelen beden ağırlığı değişimleri % değişim olarak hesaplanmıştır.

NDM/PBS: Diyabetsiz, ip.PBS uygulanan grup (n=6)

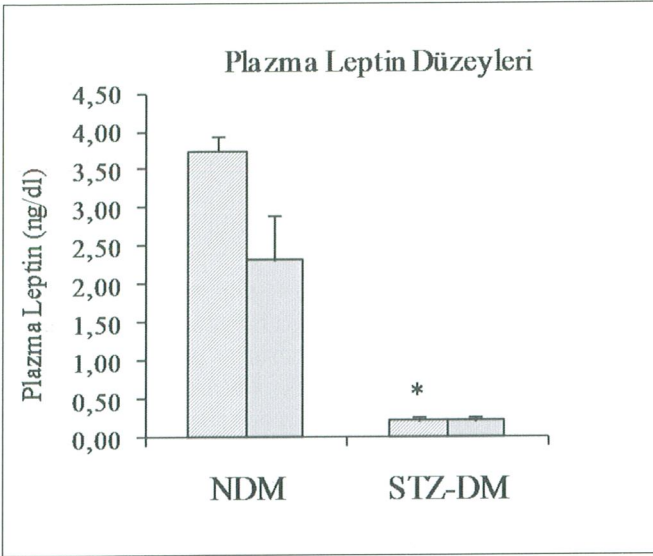
NDM/LEPTİN: Diyabetsiz, ip.leptin uygulanan grup (n=6)

STZ-DM/PBS: Diyabetik, ip.PBS uygulanan grup (n=6)

STZ-DM/LEPTİN: Diyabetik, ip.leptin uygulanan grup (n=6)

* $p < 0,001$; NDM/LEPTİN ve STZ-DM/PBS grupları NDM/PBS ile karşılaştırıldı.

STZ-DM sıçanların plazma leptin düzeyleri (0,20 \pm 0,06 ngr/dl), NDM sıçanların plazma leptin düzeyleri (3,74 \pm 0,20 ngr/dl) ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p < 0,0001$). İntraperitoneal yoldan leptin uygulamalarının plazma leptin düzeyine istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olmamıştır. Plazma leptin düzeyleri Şekil 3'de gösterilmiştir.

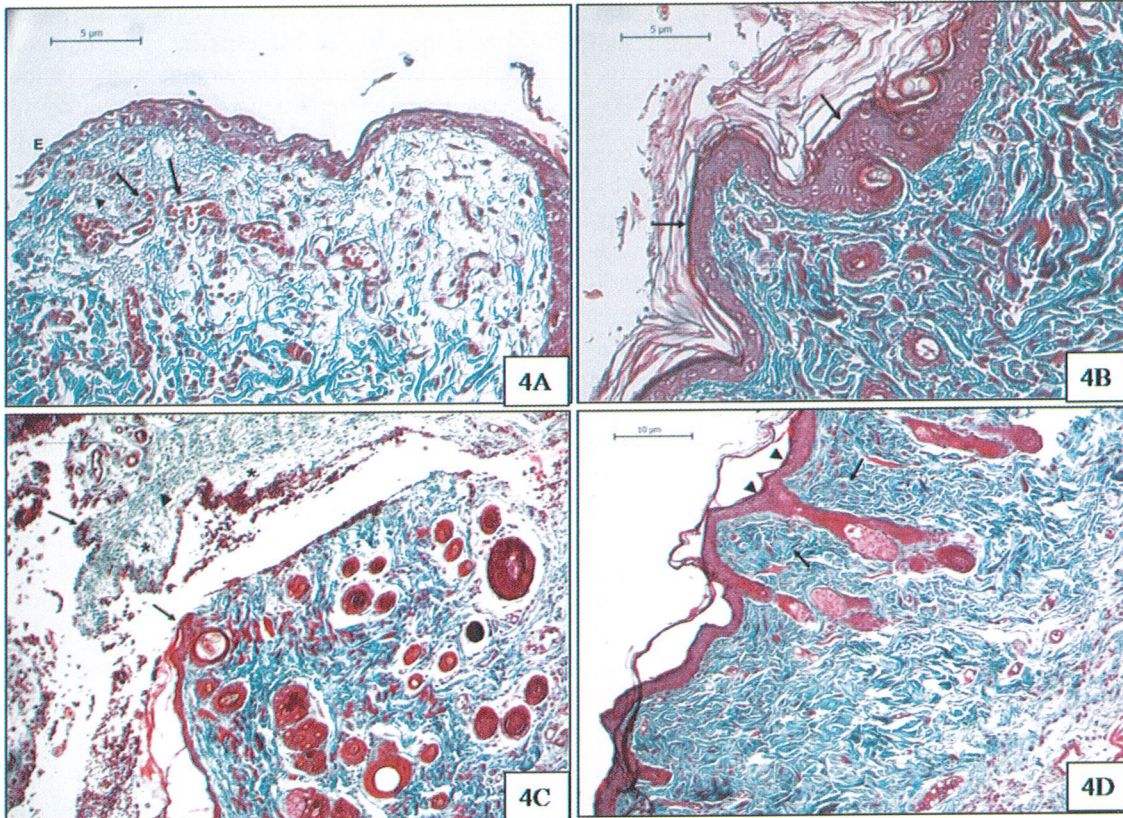


Şekil 3. Diyabet oluşturulmamış (NDM) ve Diyabetik (STZ-DM) sıçanlarda intraperitoneal (i.p.) PBS (taramalı bar ile gösterilmiştir) ve i.p. Leptin (düz bar ile gösterilmiştir) uygulamalarının plazma leptin düzeylerine etkileri.

* $p<0,01$; STZ-DM ve NDM kontrol (i.p. PBS) grupları birbiriyle karşılaştırıldığında

Elde edilen histolojik kesitlerde sadece PBS uygulanan NDM grubunda epitelizasyonun olduğu ve dermiste ince kollojen liflerin ve inflamatuvar hücrelerin varlığı izlenmiştir (Şekil 4A). NDM olup topikal leptin uygulanan grupta, normal yapıda epidermis ile yeni oluşan kan damarları, organize kollojen liflerin varlığı gözlenmiştir (Şekil 4B). Sadece PBS uygulanan STZ-DM grubunda epitelizasyonun zayıf, mevcut kollojen liflerin ince, inflamatuvar hücre hakimiyeti ve ödem varlığı izlenmiştir (Şekil 4C). STZ-DM olup topikal ve sistemik leptin uygulanan grupta ise epitelizasyonun tamamlanmış olduğu ve dermiste organize kollojen lifler ve az sayıda bağ doku hücrelerinin varlığı dikkati çekmiştir (Şekil 4D) (Masson –Trikrom, x100). Yaralamanın beşinci günü sonunda (6. günde) alınan yara dokularının histolojik değerlendirmesinde seçilen grupları temsil eden kesitler ve niteleyici morfometrik sonuçlar Şekil 4’ de özetlenmiştir.

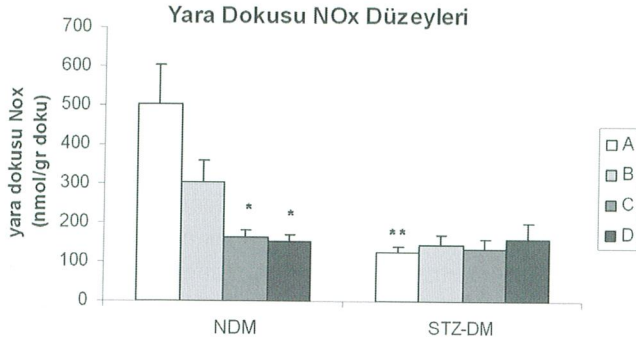
Çalışmamızda diyabet oluşturmak, yara dokuları nitrik oksit düzeylerinin kontrol grubu yaralarına göre anlamlı olarak düşük bulunmasına neden olmuştur ($p<0,01$). NDM sıçanlarda, leptinin sistemik yoldan (i.p.) uygulanması, beraberinde topikal uygulama olsun ya da olmasın, yaraların nitrik oksit düzeylerinde kontrol yaralarına göre anlamlı olarak azalmaya yol açmıştır ($p<0,05$).



Şekil 4. Eksizyonel yara oluşumundan sonra 5. günde ratlardan elde edilen histolojik kesitlerde nondiyabetik kontrol grubuna (4A) epitelizasyonun olduğu ve dermiste ince kollojen lifler ile inflamatuvar hücreler izleniyor. Non-diyabetik ve topikal leptin uygulanan grupta (4B), normal yapıda epidermis ile yeni oluşan kan damarları, organize kollojen lifler ve bağ doku dikkati çekiyor. Diyabetik kontrol grubunda (4C) zayıf epitelizasyon (↑), ince kollojen lifler (▶), çok sayıda inflamatuvar hücreler ve ödem (*) izleniyor. Diyabetik, topikal ve sistemik leptin uygulanan grupta (4D), okbaşları epitelizasyonun tamamlandığını belirtirken, dermiste, organize kollojen lifler ve az sayıda bağ doku hücreleri dikkati çekiyor. (Masson–Trikrom, x100).

STZ-DM hayvanlarda ise leptin uygulamaları yara dokusu nitrik oksit düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farka neden olmamıştır.

Yara dokularına ait NOx düzeyleri ve p değerleri Şekil 5 de gösterilmiştir.



Şekil 5. Yara Dokusu NOx Düzeyleri.

A: i.p. PBS+topikal PBS, B: i.p. PBS+topikal Leptin, C: i.p. leptin+topikal PBS, D: i.p. leptin+topikal leptin uygulamalarını temsil etmektedir.

*p<0.05, i.p. Leptin uygulanan yaralar; i.p. PBS uygulanan yaralarla karşılaştırıldığında,

**p<0.01, STZ-DM i.p. PBS+topikal PBS uygulanan yaralar; NDM i.p. PBS+topikal PBS uygulanan yaralarla karşılaştırıldığında.

TARTIŞMA

STZ ile oluşturulan diyabet, insanda görülen insülin-bağımlı diyabete model oluşturabilen ve kemirgenlerde yaygın olarak kullanılan deneysel diyabet modelidir. Çalışmamızda uyguladığımız STZ, deney hayvanlarında beklenen hipergliseminin yanı sıra literatürle uyumlu olarak hipoleptinemiye de neden olmuştur.¹⁶⁻¹⁸ Plazmadaki leptin düzeyleri yağ dokunun ve beden ağırlığının miktarını yansıtmakla birlikte, STZ ile oluşmuş diyabette insülin eksikliği, glukoz alımı ve metabolizmasının azalması da dolaşımında düşük düzeylerde leptin bulunmasına katkıda bulunmaktadır.¹³ Uyguladığımız doz ve süredeki leptinin, plazma leptin düzeylerine anlamlı bir etkisi bulunmamıştır. Bu durumun uygulamanın şekline kaynaklanabileceği daha önce çeşitli araştırmalarda vurgulanmıştır.^{15,27} Çalışmamızda kullandığımız uygulama şekli sürekli olmayıp günde tek ve fizyolojik dozdadır. Ayrıca diyabette insülin eksikliğinden kaynaklanan metabolik değişimlerin ancak eksilen insülinin yerine konması ile tamamen düzelebileceğini de göz ardı etmemek gerekir.

Diyabette yara iyileşmesi gecikmektedir, ancak bunun mekanizması henüz tam olarak anlaşılabilir değildir. İnsanlarda ve hayvan modellerinde yapılan çok sayıda çalışma ile diyabette yara iyileşmesinde meydana gelen çeşitli değişiklikler, moleküler düzeyde açıklanmaya çalışılmaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, genetik olarak leptinden yoksun ve diyabetik fenotipe sahip olan farelerde yara iyileş-

mesinin geciktiği, leptin uygulaması ile diyabetik fenotipe birlikte yara iyileşmesindeki gecikmenin de düzelebileceği gösterilmiştir. Bu durum leptinin yara iyileşmesinde önemli bir faktör olabileceğini düşündürmektedir.^{24,25}

Çalışmamızda 5 gün süre ile yapılan uygulamalarda, NDM sıçanlarda en iyi iyileşmenin leptinin sadece topikal olarak uygulandığı yaralarda olduğu belirlenmiştir. Bu yaralarda epidermiste keratinositlerin, dermiste kollojen liflerinin iyi organize olduğu gözlenmiştir (Şekil 4B). Leptinin normal tip farelerde topikal uygulandığında yara iyileşmesini hızlandırdığı bildirilmiştir.²⁵ Yara sınırında bulunan ve proliferasyon gösteren keratinositlerde leptinin özellikle fonksiyonel reseptörünün (Ob-R) ekspresyonu olmaktadır. Leptin bu reseptörler aracılığıyla keratinositler üzerine mitojenik etki göstermektedir.²⁵ Çalışmamızda yara dokusu nitrik oksit düzeyleri kontrol yaraların NO düzeyleriyle karşılaştırıldığında, leptinin sistemik yoldan uygulamasından etkilenen tüm yaralarda istatistiksel olarak anlamlı derecede; leptinin sadece topikal yoldan uygulandığı yaralarda ise anlamlı olmayan düzeyde daha düşük bulunmuştur. Yara dokusu NO düzeyleri, yaradaki mevcut hücrelerin katkısıyla belirlenir.² Leptinin pek çok hücre tipinde NO yapımını uyardığı bilinmektedir.²⁶ Ancak yaradaki hücrelerin NO metabolizması üzerine etkileri açık değildir. Yaradaki NO düzeyi aynı zamanda iyileşmenin seyri ile de ilgilidir.² Yara iyileşmesi sürecinde NO'nun en yüksek düzeylerde olduğu dönem, yaklaşık ilk bir haftayı kapsayan inflamatuvar dönemdir. Bu dönemde yara bölgesindeki yoğun inflamatuvar hücre infiltrasyonu NO artışından sorumlu tutulmaktadır. Artan NO düzeyleri hem antimikrobiyal etkiyle, hem de fibroblastların ve keratinositlerin farklılaşmasını ve çoğalmasını sağlayarak iyileşmenin proliferatif fazına geçişte önemli bir rol oynar.^{5,7} Proliferatif fazda inflamatuvar faza göre daha düşük düzeylerde olmakla birlikte, devam eden NO sentezi re-epitelizasyon ve kollojen birikimi için gerekli sinyallerin bir parçası olmaktadır.^{6,7} Bu nedenle özellikle yaralanmadan sonraki ilk beş gün içerisinde nitrik oksitin varlığı ve miktarı hem inflamatuvar fazın sağlıklı geçmesi açısından hem de yaranın iyileşmesinin diğer fazına geçmesi ve ilerlemesi açısından önemlidir.

Sistemik olarak leptin uygulanan sıçanların yara dokularında nitrik oksit düzeylerinin daha düşük bulunması, yara dokusunun leptinin sistemik uygulamasından etkilendiğini düşündürmektedir. Sistemik olarak uygulanan leptin sağlıklı sıçanlarda beden ağırlığında azalmaya neden olmaktadır.¹⁹ Sistemik leptin uygulamasına eşlik eden beden ağırlığı azalması çalışmamızda da gözlenmiştir (Şekil 2). Bu katabolik durum yara iyileşmesini etkiliyor ve yaradaki hücrelerin nitrik oksit metabolizmasını bozuyor olabilir.

STZ-DM sıçanların kontrol yaralarında literatürle^{8,9,10,33,34} uyumlu olarak zayıf epitelizasyon, ince kollojen liflerinin varlığı gözlenmiştir. Bu yaralarda inflamatuvar hücrelerin hakimiyeti dikkati çekmiştir (Şekil 4C). Diyabet oluşturulan sıçanların yara dokularında nitrik oksit düzeyleri de düşük bulunmuştur. STZ diyabette yara dokularında iNOS ekspresyonunun ve NO düzeylerinin belirgin olarak azaldığı daha önce bildirilmiştir.⁸

STZ-DM sıçanlarda en iyi iyileşmenin leptinin sistemik ve topikal olarak birlikte uygulandığı yaralarda olduğu belirlenmiştir. Epitelizasyonu neredeyse tamamlanmış olan bu yaralarda dermisde bulunan kollojen liflerinin de iyi organize olduğu görülmüştür (Şekil 4D).

Literatürde bulgularımızı karşılaştırmak üzere, leptin uygulamasının STZ ile oluşturulmuş diyabette deri yara iyileşmesine etkisini araştıran başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bununla birlikte leptin, kendini kodlayan genden yoksun olan diyabetik fenotipli farelere uygulandığında yara iyileşmesini artırmaktadır.²⁴ Ancak bu hayvanlara uygulanan leptinin eksikliğin giderilmesini sağlayarak gecikmiş yara iyileşmesini düzeltebileceğini göz ardı etmemek gerekir.

Çalışmamızda sistemik ve/veya topikal leptin uygulanan STZ-DM sıçanlara ait yaralar ile sadece PBS uygulanmış NDM yaraları karşılaştırıldığında yara dokusu nitrik oksit düzeylerinde anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Tedavi edilmiş diyabetik yaralarda nitrik oksit düzeylerinin NO metabolizmasına paralel olarak azalması bilinen bir durumdur.^{8,9} Çalışmamızda, sistemik ve topikal leptinle tedavi edilen yaraların NO düzeyleri diyabetik kontrol yaralarından farklı bulunmamakla birlikte, bu yaralar histolojik olarak daha belirgin iyileşme göstermiştir (Şekil 4D). Bu durum leptin uygulanan diyabetik yaraların daha ileri bir iyileşme fazında olduğunu göstermektedir ve aynı zamanda yara dokusunda NO düzeylerinin neden yüksek bulunmadığını açıklayabilir.

SONUÇ

Tüm bu bulgular göz önüne alındığında leptin sağlıklı sıçanlarda sadece topikal olarak uygulandığında, diyabetik koşullarda ise sistemik ve topikal birlikte uygulandığında yara iyileşmesini artırmaktadır. Bu iyileştirici etki yara dokusu nitrik oksit düzeyleri ile izlenebilir. Bununla birlikte bu durumun açıklığa kavuşturulabilmesi için yaraların farklı günlerini de içeren bir protokolle ileri analizlerin yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Yazışma Adresi: Şebnem GÜLEN

Mebusevleri Şerefli Sk. No: 41/6

Beşevler, Ankara, Türkiye

E-mail: sebnemgulen@gmail.com

KAYNAKLAR

1. Yamaguchi Y, Yoshikawa K. Cutaneous wound healing: an update. *J Dermatol* 2001; 28:521-534.
2. Isenberg JS, Ridnour LA, Espey MG, Wink DA, Roberts DD. Nitric oxide in wound-healing. *Microsurgery* 2005; 25:442-451.
3. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med* 1994; 120:227-237.
4. Efron DT, Most D, Barbul A. Role of nitric oxide in wound healing. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000; 3:197-204.
5. Luo JD, Chen AF. Nitric oxide: a newly discovered function on wound healing. *Acta Pharmacol Sin* 2005; 26:259-264.
6. Ping Shi H, Efron DT, Most D, Barbul A. The role of iNOS in wound healing. *Surgery* 2001; 130:225-229.
7. Stallmayer B, Kämpfer H, Kolb N, Pfeilschifter J, Frank S. The function of nitric oxide in wound reepithelialization: inhibition of inducible nitric oxide-synthase severely impairs wound reepithelialization. *J Invest Dermatol* 1999; 113:1090-1098.
8. Schäffer MR, Tandy U, Efron PA, Ahrendt GM, Thornton FJ, Barbul A. Diabetes-impaired healing and reduced wound nitric oxide synthesis: A possible pathophysiologic correlation. *Surgery* 1997; 121:513-519.
9. Witte MB, Thornton FJ, Tandy U, Barbul A. L-Arginin supplementation enhances diabetic wound healing: involvement of the nitric oxide synthase and arginase pathways. *Metabolism* 2002; 51:1269-1273.
10. Blakytyn R, Jude E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabet Med* 2006;23:594-608.
11. Hehenberger K, Hansson A, Heilborn JD, Abdel-Halim SM, Ostenson CG, Brismar K. Inhibited proliferation of fibroblasts derived from chronic diabetic wounds and normal dermal fibroblasts treated with high glucose is associated with increased formation of l-lactate. *Wound Repair Regen* 1998; 6:135-141.
12. Marhoffer W, Stein M, Maeser E, Federlin K. Impairment of polymorphonuclear leukocyte function and metabolic control of diabetes. *Diabetes Care* 1992; 15:256-260.
13. Havel PJ, Uriu-Hare JY, Liu T, Stanhope KL, Stern JS, Keen CL, Ahren B. Marked and rapid decreases of circulating leptin in streptozotocin diabetic rats: reversal by insulin. *Am J Physiol* 1998; 274:R1482-1491.
14. Sindelar DK, Havel PJ, Seeley RJ, Wilkinson CW, Woods SC, Schwartz MW. Low plasma leptin levels contribute to diabetic hyperphagia in rats. *Diabetes* 1999; 48:1275-1280.
15. Gülen S, Dinçer S. Effects of leptin on oxidative stress in healthy and Streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem*. 2007; 302:59-65.
16. Sivitz WI, Walsh S, Morgan D, Donohoue P, Haynes W, Leibel RL. Plasma leptin in diabetic and insulin-treated diabetic and normal rats. *Metabolism* 1998; 47:584-591.
17. Hidaka S, Yoshimatsu H, Kondou S, Oka K, Tsuruta Y, Sakino H, Itateyama E, Noguchi H, Himeno K, Okamoto K, Teshima Y, Okeda T, Sakata T. Hypoleptinemia, but not hypoinsulinemia, induces hyperphagia in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Neurochem* 2001; 77:993-1000.
18. Hidaka S, Yoshimatsu H, Kondou S, Tsuruta Y, Oka K, Noguchi H, Okamoto K, Sakino H, Teshima Y, Okeda T, Sakata T. Chronic central leptin infusion restores hyperglycemia independent of food intake and insulin level in streptozotocin-induced diabetic rats. *FASEB J* 2002; 16:509-518.
19. Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; 26:1407-1433.

20. Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leucoc Biol* 2000; 68:437-446.
21. Glasow A, Kiess W, Anderegg U, Berthold A, Bottner A, Kratzsch J. Expression of leptin (Ob) and leptin receptor (Ob-R) in human fibroblasts: regulation of leptin secretion by insulin. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:4472-4479.
22. Stallmayer B, K pfer H, Podda M, Koufmann R, Pfeilschifter J, Frank S. A novel keratinocyte mitogen: regulation of leptin and its functional receptor in skin repair. *J Invest Dermatol* 2001; 117:98-105.
23. Stallmayer B, Pfeilschifter J, Frank S. Systemically and topically supplemented leptin fails to reconstitute a normal angiogenic response during skin repair in diabetic ob/ob mice. *Diabetologia* 2001; 44:471-479.
24. Ring BD, Scully S, Davis CR, Baker MB, Cullen MJ, Pellemounter MA, Danilenko DM. Systemically and topically administered leptin both accelerate wound healing in diabetic ob/ob mice. *Endocrinology* 2000; 141:446-449.
25. Frank S, Stallmayer B, K mpfer H, Kolb N, Pfeilschifter J. Leptin enhances wound re-epithelialization and constitutes a direct function of leptin in skin repair. *J Clin Invest* 2000; 106:501-509.
26. Fr hbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J* 2006; 393:7-20.
27. Fr hbeck G. Pivotal role of nitric oxide in the control of blood pressure after leptin administration. *Diabetes* 1999; 48:903-908.
28. Beltowski J, Wojcicka G, Borkowska E. Human leptin stimulates systemic nitric oxide production in the rat. *Obes Res* 2002; 10:939-946.
29. Vecchione C, Maffei A, Colella S, Aretini A, Poulet R, Frati G, Gentile MT, Fratta L, Trimarco V, Trimarco B, Lembo G. Leptin effect on endothelial nitric oxide is mediated through Akt-endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway. *Diabetes* 2002; 51:168-173.
30. Tsuda K, Kimura K, Nishio I. Leptin improves membrane fluidity of erythrocytes in humans via a nitric oxide-dependent mechanism--an electron paramagnetic resonance investigation. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 297:672-681.
31. Taskiran D, Sagduyu A, Yuceyar N, Kutay FZ, Pogun S. Increased cerebrospinal fluid and serum nitrite and nitrate levels in amyotrophic lateral sclerosis. *Int J Neurosci* 2000; 101:65-72.
32. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 2001; 5:62-71.
33. Rasik AM, Shukla A. Antioxidant status in delayed healing type of wounds. *Int J of Exp Path* 2000; 81: 257-263.
34. Musalmah M, Nizrana MY, Fairuz AH, NoorAini AH, Azian AL, Gapor MT, Wan Ngah WZ. Comparative effects of palm vitamin E and alpha-tocopherol on healing and wound tissue antioxidant enzyme levels in diabetic rats. *Lipids* 2005;40, 575-580.