

N^ω-NİTRO-L-ARJİNİNİN (L-NNA) SIÇANLARDA KAN BASINCI VE DERİ FLEPLERİNİN YAŞAMASINA OLAN ETKİLERİ

THE EFFECTS OF N^ω-NITRO-L-ARGININE (L-NNA) ON BLOOD PRESSURE AND SURVIVAL OF THE SKIN FLAPS IN RATS

*Dr. Rüştü Köse, **Dr. A. Mustafa Yıldırım, **Dr. M. İhsan Okur, ***Dr. İbrahim Tuğrul

* Harran Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı, ŞANLIURFA

** Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı, ELAZIĞ

*** Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı, ELAZIĞ

ÖZET

Amaç: Bu çalışma, nitrik oksid sentez inhibitörü olan N^ω-nitro-L-arjininin (L-NNA) sıçanların sistemik kan basınçlarına ve deri fleplerinin yaşamasına olan etkilerini araştırmak için yapılmıştır.

Gereç ve yöntem: Çalışmada 16 adet erkek Wistar albino sıçan kullanıldı. Sıçanlar her grupta 8 denek olacak şekilde 2 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna normal musluk suyu verildi. L-NNA grubuna ise 3 hafta süreyle içme suyuna 50mg/350ml/gün L-NNA katıldı.

Kan basıncı ölçümleri sıçanların bilinci açık iken kuyruktan indirekt kuyruk manşonu yöntemi ile yapıldı. Çalışmanın 14. gününde bütün sıçanların sırtından kranial tabanlı 8x3 cm boyutlarında random flepler kaldırıldı. Sıçanlara 21. günde 0,5 ml fluorescein sodyum solüsyonu intraperitoneal olarak enjekte edildi. Asetatlı kağıt üzerine fleplerin yaşayan ve nekroz olan kısımları işaretlendi. Yaşayan flep alanları kağıt üzerinden dijital planometri yardımı ile hesaplandı.

Sonuç: Oral yoldan 21 gün boyunca, 21 mg/kg/gün L-NNA uygulaması sıçanlardaki tansiyonu anlamlı olarak yükseltmesine rağmen fleplerin beslenmesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.

ABSTRACT

Object: This study is planned to investigate the effect of N^ω-nitro-L-arginin (L-NNA), which is nitric oxide synthase inhibitor, on the blood pressure and survival of the skin flap of rats.

Material and Methods: 16 Wistar albino male rats are used in the study. They were divided into 2 groups, each containing 8 rats. In the control group, tap water was given for 3 weeks. In group L-NNA, 50mg/350ml/day L-NNA was administered with tap water for 3 weeks.

Blood pressure was measured by indirect tail cuff method during the conscious period. Cranial based random flaps 8x3 cm in size were raised from dorsal skin of the rats at the 14th day of the study. Fluorescein sodium solution (0.5 ml) administered intraperitoneally at the 21st day. The viable and the necrotic parts of the flaps were labeled on the clear acetate sheets. The viable parts on the sheets were calculated by digital planometry.

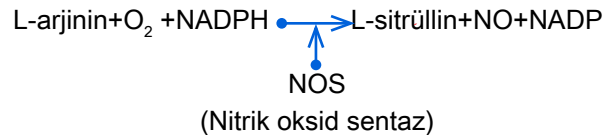
Results: The arterial blood pressure of the rats which were administered 21 mg/kg/day L-NNA for 21 day was increased however; the effect on the flap survival was statistically insignificant.

GİRİŞ

Deri flepleri, tümör eksizyonları, konjenital malformasyonlar ve yaralanmalar sonrasında oluşan deri ve yumuşak doku defektlerini onarmak için sıkça kullanılmaktadır. Flep çeşitlerinin artması ve cerrahi tekniklerin gelişmesine rağmen deneyimli ellerde bile nekrozla sonuçlanan iskemi, flep cerrahisinde hala en önemli sorundur. Deri fleplerinde oluşan iskeminin patogenezi tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Kerrigan yapmış olduğu çalışmalarda fleplerdeki nekrozun nedenini yetersiz arteriyel kan akımına bağlamıştır.¹ Fleplerde oluşan nekroz oranını azaltmak için birçok çalışma yapılmıştır. Günümüzde flep yaşamını artırdığı kabul edilen ve cerrahi işlemlerde kullanılan tek yöntem geciktirme

işlemidir.²

Nitrik oksid (NO) lipofilik, kimyasal stabilitesi olmayan, çok kısa yarı ömürlü biyoaktif memeli hücresi sekresyon ürünüdür (3). NO semiesansiyel bir aminoasit olan L- arjinden nitrik oksid sentaz (NOS) olarak adlandırılan enzimlerce L- sitrüllin ile birlikte oluşturulur.^{3,4}



NO vasküler düz kaslarda gevşeme ile vazodi-

latasyon, trombositlerin ve lökositlerin adezyon ve agregasyonunda inhibisyon, düşük konsantrasyonda eritrosit deformabilitesinde artış, nörotransmitter etkiler, antiproliferatif etki ve immünomodülatör etki gösterir.^{3,5} L-NNA (N^ω-nitro-L-arjinin) ve L-NAME (N-G nitro-L-arjinin metil ester) nonselektif NOS inhibitörleridir.

NOS inhibitör ve NO ön maddelerinin flepler üzerine olan etkilerini araştırmak için birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların sonuçları birbirleriyle farklılıklar göstermektedir.⁶⁻¹⁰

Bu çalışma, nitrik oksid sentez inhibitörü olan L-NNA'nın sıçanların sistemik kan basıncına ve sırttan kaldırılan random fleplerin yaşamasına olan etkilerini saptamak için yapılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Elazığ Veteriner Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen 123 – 207 gr ağırlığında, 6-8 haftalık 16 adet erkek Wistar albino sıçan kullanıldı. Çalışmadaki deneylerin tümü Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun izni ile yapıldı.

Deneyel Protokol

Sıçanlar her grupta 8 denek olacak şekilde 2 gruba ayrıldı. Kontrol grubundaki sıçanlara 3 hafta süreyle musluk suyu verildi. L-NNA grubuna 350 ml içme suyuna 50 mg L-NNA eklendi. Deney grubu sıçanları 21 gün boyunca 14,3 mg/100ml L-NNA (N^ω-nitro-L-arjinin) (Sigma Deishofen Almanya) içeren musluk suyu içtiler. Hayvanların her gün ne kadar su içtikleri not edilip aldıkları ilaç miktarı ortalama 21 mg/kg/gün L-NNA olarak belirlendi.

Kan Basıncı Ölçümleri

Sıçanların bilinci açık olarak kan basıncı ölçümleri indirekt kuyruk manşonu yöntemiyle yapıldı (MAY BPHR 9610-PC Tail Cuff Indirect Blood Pressure Recorder). Sıçanların kan basıncı ölçümleri L-NNA uygulamasına başlamadan önce (0. gün) ve ilaç uygulamasına başladıktan sonra 1., 2., 3., 4., 7., 14. ve 21. günlerde yapıldı.

Cerrahi uygulamalar

Çalışmanın 14. gününde tüm deneklere 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar® flakon Eczacıbaşı) ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorür (Rompun® flakon Bayer) intraperitoneal yoldan verilerek anestezi sağlandı. Sıçanların sırtlarından yeterli alan tıraş edildi ve polivinilpirolidon (Batticon® solüsyon Adeka) ile temizlendi. Yedinci servikal vertebra hizasından kraniyal tabanlı, pannikulus karnosusu içeren 8x3 cm boyutlarında random flepler kaldırıldı (Şekil 1). Daha sonra flepler 1 cm aralıklı 4/0 keskin ipek dikişler ile yerlerine sütüre edildi. Cerrahi girişim sonrası 3 gün

boyunca günde bir kez antiseptik solüsyon ile pansuman yapıldı.

Fleplerin değerlendirilmesi

Çalışmanın 21. gününde sıçanlara 50 mg/kg ketamin (Ketalar® flakon Eczacıbaşı) ve 5 mg/kg ksilazin (Rompun® flakon Bayer) intraperitoneal enjekte edilerek anestezi sağlandı. Florescein sodiyum (Sigma Deishofen Almanya) tozundan 100 mg/ml olacak şekilde serum fizyolojik ile steril solüsyon hazırlandı. Bu solüsyondan sıçanlara 0,5 ml intraperitoneal olarak enjekte edildi. Flepler 15-20 dakika sonra Wood lambası altında değerlendirildi. Asetatlı kağıt üzerine fleplerin yaşayan ve nekroz olan kısımları işaretlendi (Şekil 2). Yaşayan kısımlar bu kağıtlar üzerinden dijital planometri (Ushikata x- plan 360 C+) yardımıyla hesaplandı.

Tüm sıçanlar deney işlemleri tamamlandıktan sonra intraperitoneal olarak verilen yüksek dozda pentobarbital ile sakrifiye edildiler.

İstatistik

Elde edilen veriler ortalamalar ± standart hata



Şekil 1. Sıçanların sırtlarından kraniyal tabanlı 8x3 cm'lik fleplerin hazırlanışı



Şekil 2. Fleplerin yaşayan ve nekroz olan kısımlarının görünümü.

Tablo 1. Kontrol ve L-NNA gruplarının günlere göre ortalama kan basınçları (mmHg) \pm standart hata.

Günler	Kontrol	L-NNA
0	113,85 \pm 3,98	89,25 \pm 11,73
1	117,42 \pm 2,41	109,42 \pm 2,15
2	115,42 \pm 3,46	110,83 \pm 3,07
3	98,57 \pm 6,15	111,25 \pm 7,28
4	110,71 \pm 2,99	119,12 \pm 4,22
7	135,25 \pm 2,81	122,12 \pm 6,81
14	108,62 \pm 2,96	139,71 \pm 4,15
21	127,12 \pm 4,12	144,42 \pm 5,06

(SH) olarak belirtildi. Elde edilen verilerin analizi Origin 5.0 paket istatistik programı kullanılarak bağımsız Student's t test ile yapıldı ve p değerinin 0,05'in altındaki değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

SONUÇLAR

Ortalama Kan Basınçları (OKB)

L-NNA uygulanması ilk günden itibaren sıçanların OKB'lerinde yükselmeye neden oldu. L-NNA grubunun 4. gününde ölçülen OKB değerleri, 0. gün

Tablo 2. Kontrol ve L-NNA gruplarının fleplerindeki yaşayan alanları ve ortalamaları. Grupların yaşayan alanları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).

denekler	kontrol	L-NNA
1	14,70	13,24
2	20,22	16,88
3	13,24	4,50
4	10,40	4,35
5	19,82	10,14
6	7,60	16,51
7	8,26	12,49
8	14,20	15,02
ortalama	13,46 \pm 1,94	11,15 \pm 1,94

OKB değerleri ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,05$). OKB değerlerindeki yükselme artarak devam etti ve 21. günde en yüksek düzeye ulaştı (Tablo 1).

L-NNA grubunun OKB değerleri fleplerin kaldırıldığı 14. günde kontrol grubunun 14. gün OKB değerlerinden anlamlı olarak yüksekti ($p<0,05$). İki grup OKB değerleri arasındaki anlamlı fark son güne kadar devam etti.

Kontrol grubunun OKB değerleri oynamalar olmakla birlikte 21. güne kadar anlamlı bir fark yoktu. 21. gündeki OKB değerleri, 0. güne göre anlamlı olarak yüksekti ($p<0,05$). Bu yükselmelerin sıçanlardaki

büyümeye bağlı olabileceği düşünüldü (Tablo 1).

Fleplerin Yaşayan Alanlarının Değerlendirilmesi

Sıçanların sırtlarından kaldırılan fleplerin yaşayan kısımları gereç ve yöntem bölümünde belirtildiği gibi ölçüldü.

Kontrol grubundaki fleplerin yaşayan alanların ortalaması 13,46 \pm 1,94 cm² olarak saptandı (Tablo 2). Üç hafta boyunca 21,09 \pm 05 mg/ kg/ gün L-NNA verilen sıçanların fleplerindeki canlı alanların ortalaması 11,15 \pm 1,94 cm² olarak bulundu. Student's t test kullanılarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yaşayan alanların arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$), (Tablo 2).

TARTIŞMA

NO dirençli damarların vasküler tonusunun sağlanmasında önemli rolü olan etkili bir vazodilatatördür.^{11,12} NO cGMP'yi (siklik guanin monofosfat) aktive ederek damar düz kaslarında gevşemeye yol açar ve dokulara olan kan akımını artırır.¹³ Nötrofillerin damar duvarına yapışmasını NO etkili bir şekilde engeller.¹⁴ NO bilinen bu etkileri nedeniyle son zamanlarda flepler üzerine olan etkileri araştırma konusu olmuştur.

Kronik NOS inhibisyonu total periferik direnci artırarak kan basıncında yükselmeye neden olur.¹⁵ Esansiyel hipertansiyonlu (HT) hastaların damar ve trombositlerindeki NO sentezinin noksanlığından dolayı vazodilatasyonda azalma olmaktadır.^{16,17}

Endotelial NOS (eNOS) enziminin inhibisyonu sonucunda sıçanların kan basıncında yükselme ve NO seviyesinde azalma olduğu hakkında görüş birliği mevcuttur. Kendi çalışmamızda NOS inhibisyonu ile HT oluşmuştur. Flep yaşayan alanlarına olan etkileri hakkında çelişkili yayınlar mevcuttur. Bu etkinin faydalı olduğu,^{6,7,9} zararlı olduğu,^{8,18} hatta hiçbir değişiklik olmadığı gösterilmiştir.^{19,20} Bu farklı etkiler farklı deney modelleri kullanılması, farklı NOS enzim inhibitörleri ve değişik ilaç verilme yollarına bağlanabilmekle birlikte,¹⁰ NO bilinen ve bilinmeyen doku üzerine olan etkilerinden mi olduğu tam açıklığa kavuşturulamamıştır.

Dışardan NO öncül maddesi olan L-arginin verilmesi flep yaşamını artırmaktadır.^{8,19,21} Bu etki damarlarda meydana getirdiği vazodilatasyona bağlanmaktadır. Bir çalışmada L-arginin verilen sıçanlar da kan ve dokuda NO düzeyi artmadığı halde fleple de olumlu etkileri saptanmıştır. Aynı çalışmada endotelial NOS enziminin inhibitörü olan L-NAME'nin NO düzeyinde azalma yaptığını fakat flepler de bir herhangi etki yapmadığı belirtilmiştir.¹⁹

NO öncül maddesi olan Spermine/nitrik oksit

kompleksi (Sper/NO) ile yapılan bir çalışmada deri flepleri üzerine NO doza bağlı olarak oluşturduğu etkiler araştırılmıştır. Bu çalışmada Sper/NO dozu artırıldıkça sistemik tansiyondaki düşme de artmıştır. Bu çalışmada en uygun doz 500 nmol/kg Sper/NO uygulaması ile elde edilmiştir. Bu dozda minimal hemodinamik yan etkiler meydana gelmiştir. Daha düşük doz (250 nmol/kg Sper/NO) uygulanmasında flepler üzerinde hiçbir fark görülmemiş, daha yüksek doz (750 nmol/kg Sper/NO) uygulamasında, fleplerde 500 nmol/kg Sper/NO yapmış olduğu aynı olumlu etki meydana gelmiş fakat sistemik tansiyonda kabul edilemeyecek düzeyde düşmeler olmuştur.²²

Fizyolojik durumlarda eNOS (Endotelyal NOS) tarafından sentezlenen NO, vazodilatasyon, trombositlerin adezyon ve agregasyonunda inhibisyon oluşturmaktadır.⁴ Diğer taraftan iNOS (İndüsiibl NOS) tarafından sentezlenen NO, dokulara toksik etkileri olan serbest radikalleri meydana getirmektedir.^{23,24} NO dokularda hem koruyucu hem de yıkıcı etkiler oluşturabilmektedir.

NO seviyesi ile flep yaşayabilirliği arasında tam bir ilişki mevcut değildir. NO seviyesinde azalma olduğu halde flep yaşamında önemli değişiklikler olmadığını gösteren çalışma mevcuttur.¹⁹ Bizim çalışmamızda doku veya kandaki NO seviyesi ölçülememesine rağmen, sıçanlarda oluşan hipertansiyonun NO seviyesindeki azalmadan olduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamızda sıçanların sistemik tansiyonlarda yükselme olmasına rağmen flep yaşayan alanlarında önemli bir değişiklik meydana gelmedi. Bu etki NOS inhibitörleri fleplere olumlu olan NO in vazodilatör etkilerini ortadan kaldırır iken, flep yaşamı üzerine NO in olumsuz etkileri olan serbest oksijen radikallerinin oluşmasını engellemesine bağlanmaktadır.

Endotelyal NOS enzimin L-NNA ile inhibisyonu deri fleplerinin yaşamını önemli derecede azaltmış olduğu gösterilmiştir. Fleplerdeki bu olumsuz etki NO in vazodilatasyon etkisinin engellenmesi sonucu fleplerdeki kan akımının azalmasına bağlanmıştır.²⁵ Biz çalışmamızda, 21 gün boyunca oral yoldan 21 mg/gün NO inhibitörü olan L-NNA verdiğimiz sıçanlarda hipertansiyon oluşmasına rağmen fleplerde istatistiksel olarak anlamlı olumsuz bir etki bulamadık. Bu uyumsuzluk verilen L-NNA miktarı ve uygulama yolu arasındaki farklardan olduğuna inanılmaktadır.

Bu yaptığımız çalışmanın sonucunda NO'nun etkili bir vazodilatör olduğu görülmüştür ve bunun sentezinin ilaçla azaltılması sonucunda HT oluşmaktadır. NO'nun deri fleplerine olan etkileri halen tam açıklığa kavuşturulmamış bir konudur. Deney sonucu oluşturulan HT'nin flep yaşamına olumsuz etkileri bulunamamıştır.

Dr. Rüştü KÖSE

Harran Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı 63300 ŞANLIURFA

E-posta: rkose@harran.edu.tr

Tel: 0 414 3148410

Faks: 0 414 3139615

KAYNAKLAR

1. Kerrigan CL. Skin flap failure: pathophysiology. *Plast Reconstr Surg* 1983; 72: 766-77.
2. Kerrigan CL, Hjortdal VE. Skin flap physiology and pathophysiology. Bardach J (editor). *Local Flap and Free Skin Grafts*. New York: Louis Mosby. 1992: 24.
3. Koşay S (editor). Nitrik oksidin patolojik olaylardaki rolü. *Ayın kitabı* 83. 1996.
4. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109-42.
5. Cooke JP, Dzau VJ. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med* 1997; 48:489-509.
6. Knox LK, Stewart AG, Hayward PG, et al. Nitric oxide synthase inhibitors improve skin flap survival in the rat. *Microsurgery* 1994;15(10):708-11.
7. Knox LK, Angel MF, Gamper T, et al. Secondary ischemic tolerance improved by administration of L-NAME in rat flaps. *Microsurgery* 1996;17(8):425-27.
8. Um SC, Suzuki S, Toyokuni S, et al. Involvement of nitric oxide in survival of random pattern skin flap. *Plastic & Reconstructive Surgery* 1998;101(3):785-92.
9. Kane AJ, Barker JE, Mitchell GM, et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity promotes ischaemic skin flap survival. *British Journal of Pharmacology* 2001;132(8):1631-38.
10. Gribbe O, Samuelson UE, Wiklund NP. Effects of nitric oxide synthase inhibition on blood flow and survival in experimental skin flaps. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2007;60(3):287-93.
11. Moncada S, Radomski MW, Palmer RM. Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 2495-501.
12. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension* 1988; 12: 365-72.
13. Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* 1989; 2: 997-1000.
14. Kanwar S, Wallace JL, Befus D, Kubes P. Nitric oxide synthesis inhibition increases epithelial permeability via mast cells. *Am J Physiol* 1994; 266: 222-29.
15. Dananberg J, Sider RS, Grekin RJ. Sustained hypertension induced by orally administered nitro-L-arginine. *Hypertension* 1993; 21: 359-63.
16. Radomski MW, Moncada S. Regulation of vascular homeostasis by nitric oxide. *Thromb Haemostasis* 1993; 70: 36-41.
17. Luscher TF, Dohi Y, Tschudi M. Endothelium-dependent regula-

- tion of resistance arteries: alterations with aging and hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 19: 34-42.
18. Cordeiro PG, Santamaria E, Hu Q-Y. Use of nitric oxide precursor to protect pig myocutaneous flaps from ischemia-reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg* 1998;102:2040-48.
 19. Ozyazgan I, Ozköse M, Başkol G. Nitric Oxide in Flow-Through Venous Flaps and Effects of L-Arginine and Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME) on Nitric Oxide and Flap Survival in Rabbits. *Ann Plast Surg* 2007; 59: 550-57.
 20. Meldrum DG, Stephenson LL, Zamboni WA. Effects of L-NAME and L-arginine on ischemia-reperfusion injury in rat skeletal muscle. *Plast Reconstr Surg* 1999;103:935-40.
 21. Ercocen AR, Apaydin I, Emiroglu M, Gultan SM, Ergun H, Yormuk E. The effects of L-arginine and iloprost on the viability of random skin flaps in rats. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1998; 32: 19-25.
 22. Engel H, Sauerbier M, Germann G, Küntscher MV. Dose-Dependent Effects of a Nitric Oxide Donor in a Rat Flap Model. *Ann Plast Surg* 2007;58: 456-60.
 23. Radi R, Beckman JS, Bush KM, et al. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 1991;266:4244-50.
 24. Hibbs JBJr, Taintor RR, Vavrin Z, et al. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;157: 87-94.
 25. Johnson RA, Freeman RH. Pressure natriuresis in rats during blockade of the L-arginine/nitric oxide pathway. *Hypertension* 1992; 19: 333-38.