



T.C.

UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

**RAT İSKEMİK YARA MODELİNDE L-ARGİNİN TEDAVİSİNİN  
YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Onur Evren YILMAZ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Erdem YORMUK

ANKARA

2012



UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
Dr.Rıdvan Ege Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi (Hastanesi)  
Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi ANABİLİM / BİLİM DALI  
UZMANLIK TEZİ JÜRİ TUTANAGI

ADAYIN ADI : Onur Evren  
SOYADI : YILMAZ  
ANABİLİM / BİLİM DALI : Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi

Tıp Fakültesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı/Bilim Dalı uzmanlık öğrencilerinden Dr. Onur Evren YILMAZ tez değerlendirme jürisi toplandı, tez jüri üyeleri tarafından değerlendirildi ve sözlü savunması yapıldı.

Dr. Onur Evren'in " Bat İstemi Yara Modelinde L-Arginin Tedavisinin Yara İyileşmesini Hızlandırma Etkisinin Değerlendirilmesi " uzmanlık tezi jürimiz tarafından başarılı bulunmuştur.

Saygılarımızla.

TARİH  
22.10.2012

JÜRİ ÜYESİ

Adı-Soyadı :  
Anabilim Dalı :  
Tarih :  
İmzası :  
UFUK ÜNİVERSİTESİ  
Dr. Rıdvan Ege Hastanesi  
Prof. Dr. Erdem YORMUK  
Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi  
Dip. No: 1327 İmza No: 17768/15068/16147

JÜRİ ÜYESİ

UFUK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
Prof. Dr. Dikmen ARBAL  
Cerrahi Tıp Bilimleri Bölüm Başkanı  
Dip.No:2556 Uzm.No:10006/15214

JÜRİ ÜYESİ

Doç. Dr. Süleyman KAYA  
Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Ortopedi ve Travmatoloji Uzm.  
Dip.No:23369/28837  
İmza No:5923/185889

EKLER: Uzmanlık Tezi Değerlendirme formları

## TEŞEKKÜR

Oluşturduğu çatı altında ihtisasımı yapmamı sağlayan, tez araştırmam sürecinde maddi ve manevi desteklerini eksik etmeyen, sayın hocam Prof. Dr. Rıdvan EGE'ye,

Uzmanlık eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, eğitimim süresince destek ve yardımlarını her an yanımda hissettiğim, anabilim dalı başkanımız ve tez danışmanım sevgili hocam Prof. Dr. Erdem YORMUK'a,

Eğitim sürecimde bana yol gösteren, bilimsel ufkumu genişleten, değerli hocam Prof. Dr. Mehmetcik Ruşen KAPUCU'ya,

Asistanlık eğitimim süresince birlikte çalışma şansına eriştiğim sevgili Dr. Senem Özge Turaçlı KARAGÜVEN'e,

Çalışmamın histopatolojik incelemelerinde değerli katkılarından dolayı Dr. Pelin ÖRCEK'in şahsında, Prof. Dr. Ömür ATAÖĞLU'na, biyokimyasal ölçümlerde katkılarından dolayı, Dr. Fevzi Nuri AYDIN'a, istatistiksel analizlerde katkılarımı esirgemeyen Dr. Fatih BÜYÜKCAM'a, Fizyoloji anabilim dalından Hesna Ural KAYALIK'a,

Eğitim sürecimde beraber çalıştığım ameliyathane ve servis hemşirelerine, personeline,

Bu seviyeye gelmemde büyük emekleri olan sevgili aileme, hayatın tüm zorluklarına tanıştığımız ilk günden beri beraber göğüs gerdiğimiz, bana her zaman destek olan canım eşim Duygu'ya, hayatımıza anlam katan oğlum Çınar'a

Teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ.....	vi
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Yara İyileşmesi ve Yara İyileşmesinin Fazları.....	3
2.1.1. İnflamatuar Faz.....	3
2.1.2. Proliferasyon Fazı.....	5
2.1.3. Yeniden Şekillenme Fazı.....	6
2.2. Kollajen ve Yara Gerim Direncinin Gelişimi .....	7
2.2.1. Kollajen.....	7
2.2.2 Yara Gerim Direncinin Gelişimi.....	8
2.3. Arginin.....	9
2.3.1 Arginin Sentezi.....	9
2.3.2.Arginaz.....	10
2.4. Nitrik Oksit.....	11
2.4.1.Nitrik Oksit Sentezi.....	12
2.4.2.Nitrik Oksit Sentaz (NOS) Enziminin Özellikleri.....	12
2.4.3.Nitrik Oksit Fizyolojik Rollerini.....	13

2.5 Rat İskemik Yara Modeli.....	14
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	16
3.1 Denekler.....	16
3.2. Deney Protokolü.....	16
3.3. Yara Alanı Ölçümleri.....	19
3.4. Yara Gerim (g/mm <sup>2</sup> ) ve Kopma Kuvveti Ölçülmesi.....	20
3.5. Dokuda Hidroksiprolin Düzeyi Ölçülmesi.....	22
3.6.Histopatolojik İnceleme.....	24
3.7. İstatistiksel Analiz.....	24
4.BULGULAR.....	25
4.1 Yara Alanı Ölçümleri.....	25
4.1.1. Sefalik Bölge Yara Alanları.....	25
4.1.2. Santral Bölge Yara Alanları.....	27
4.1.3. Kaudal Bölge Yara Alanları.....	28
4.2. Yara Gerim ve Kopma Kuvveti sonuçları.....	28
4.3. Hidroksiprolin ölçüm sonuçları.....	30
4.4. Histopatoloji bulguları.....	31
5.TARTIŞMA.....	36
SONUÇ.....	46
ÖZET.....	47
SUMMARY.....	49
KAYNAKLAR.....	51

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. L-Arginin Metabolizması.....	11
Şekil 2. Ayrı kafeslerde ve numaralandırılmış olarak takip edilen denekler.....	16
Şekil 3. Rat dorsumundan 10x4 cm lik bipediküllü flep hazırlanması.....	17
Şekil 4. Fleplerin pannikulus karnosusu da içerecek şekilde eleve edilmesi.....	17
Şekil 5. Fleplerin yerine iade edilerek 1 cm aralıklarla sütüre edilmesi.....	18
Şekil 6. Bipediküllü fleplerden 4 gün sonra punchlarla yaranın oluşturulması.....	18
Şekil 7. Sağlıklı grupta flepler kaldırılmadan yaraların oluşturulması.....	19
Şekil 8. Auto Cad programı ile fotoğraftan yara alanı hesaplanması.....	20
Şekil 9. Yara gerim direncini ölçmek için hazırlanmış düzenek ve bilgisayar yazılımını sağlayan Biopac MP35 veri kayıt cihazı. ....	21
Şekil 10. Kopma anında maksimum gerim kuvvetinin belirlenmesi.....	22
Şekil 11. 16. Gün sonunda çalışılacak doku örneklerinin alınmasının planlanması...24	
Şekil 12. 3.gün histopatolojik görünüm (HEX100).....	31
Şekil 13. Sağlıklı grupta 5. Gün. Ülser alanın kenarında izlenmekte olan reepitelizasyon (HEX100) .....	33
Şekil 14. Kontrol grubu 5. Gün. Ülser kenarında başlamış olan reepitelizasyon. (HEX100) .....	33
Şekil 15. Deney grubu 5.gün. Ülserasyon alanı üzerinde keratinizasyon (HEX100)..33	
Şekil 16. Sağlıklı grup 8. Gün. Tamamlanmış epitelizasyon ve epitel altı dokuda fibrozis (HEX100).....	34
Şekil 17. Kontrol grubu 8. gün. Ülserasyon alanında tamamlanmamış reepitelizasyon (HEX40).....	34

<b>Şekil 18.</b> Deney grubu 8.gün. 5.günle benzer görünüm (HE X40).....	34
<b>Şekil 19.</b> Sağlıklı grup 12. Gün tamamlanmış epitelizasyon 8. Güne göre azalmış fibrozis (HEx100).....	35
<b>Şekil 20.</b> Kontrol grubu 12. gün. Ülser üzerinde tam olmayan reepitelizasyon ve epitel altında fibrozis.(HEx40).....	35
<b>Şekil 21.</b> Deney grubu 12.gün. Tam iyileşme gösteren deri dokusu. (HE x100).....	35

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> Sefalik bölge yara alanları.....	25
<b>Tablo 2.</b> Kontrol ve deney grubunun sefalik yara alanlarının karşılaştırılması.....	26
<b>Tablo 3.</b> Sağlıklı ve kontrol grubunun sefalik yara alanlarının karşılaştırılması.....	26
<b>Tablo 4.</b> Sağlıklı ve deney grubunun sefalik yara alanlarının karşılaştırılması.....	27
<b>Tablo 5.</b> Santral bölge yara alanları.....	28
<b>Tablo 6.</b> Kaudal bölge yara alanları.....	28
<b>Tablo 7.</b> Gerilim direnci ölçümlerinin ortalama sonucu.....	29
<b>Tablo 8.</b> Gruplar arasındaki kopma kuvveti değerlerinin göstergesi.....	29
<b>Tablo 9.</b> Hidroksiprolin ölçüm sonuçları .....	30



## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Yara iyileşmesi, travmatik, cerrahi, idiopatik veya çeşitli hastalıklar nedeniyle bir doku hasarı sonucu organizmada; doku hasarına yanıt olarak ortaya çıkan ardışık, karmaşık, hücresele, fizyolojik ve biyokimyasal olayların bütünüdür (1). Bu süreçte oluşacak herhangi bir gecikme veya olumsuzluk, yaranın kapanmaması ve iyileşmede gecikme ile sonuçlanır. Gecikmiş yara kapanması veya yara dudaklarının açılması cerrahide güncel bir problem olarak önemini hala korumaktadır. Lokal ve sistemik birçok faktör yara iyileşmesini etkilemektedir.

Normal koşullarda yetişkinler için non-esansiyel olan Arginin, çocuklar ve gençler için esansiyel bir amino asittir. L-Arginin gereksinimi büyüme döneminde, travma ya da enfeksiyon durumunda artar. Bu bağlamda argininin “koşullara bağlı esansiyel bir amino asit” olarak değerlendirilmesi daha doğaldır.

L-Argininin oral yoldan yara iyileşmesi üzerine olan etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla ratlarda daha önce tariflenmiş yara modeli ile kronik bir yara ortamına paralel çevre hazırlanması planlanmıştır. İskemik yara modeli Rees ve ark. tariflediği şekilde rat dorsal cildinde hazırlanan bipediküllü flep üzerinde 4. gün 6 adet 4 mm’lik yara oluşturularak sağlanmaktadır (2). İskemik yarada gözlenen gecikmiş yara iyileşmesi, artmış protein disülfüd, artmış anjiojenik aktivite, uzamış inflamatuvar süreç şeklindeki değişikliklerin, benzer şekilde iskemik yara modelinde de meydana geldiği savunulmaktadır (3).

Son dönemde artmakla birlikte L-Argininin yara iyileşmesi üzerine olan etkilerinin araştırıldığı klinik ve deneysel çalışmalar literatürde yer almaktadır. Ancak çalışmamızın temelini oluşturan; kronik iskemik bir yara zemini oluşturulup, etkilerinin karşılaştırıldığı deneysel bir araştırmaya rastlanamamıştır.

Plastik cerrahi kliniklerinde takip edilen bası yarası, venöz staz ülseri, diabetik ayak gibi kronik yarası olan hastaların tedavisinde vücutta azalmış olan amino asit miktarının, nutrisyon desteğinde ek olarak verilmesinin faydasının gösterilmesi ve klinikte uygulama kolaylığı ile birlikte kullanımı sonrası hastaların yara iyileşmesinde hızlanma, hospitalizasyon süresinde azalma, olası komplikasyonların

önlenmesi ve azaltılmasında ek bir yöntem olarak faydalanılıp, rutin kullanıma girebileceği düşüncesi ile yola çıkılmıştır.

Bu deneysel çalışmamızda, iskemik yara modeli olarak, “rat bipediküllü dorsal flebi” üzerinde oluşturulan yaralarda, oral L-Arginin desteğinin yara iyileşmesi üzerine etkisinin, makroskopik, histopatolojik, biyomekanik ve biyokimyasal incelemelerle gösterilmesi amaçlanmıştır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Yara İyileşmesi ve Yara İyileşmesinin Fazları**

Canlı dokunun, anatomik ve fonksiyonel devamlılığının; travma, cerrahi girişim ya da hastalıklar gibi farklı nedenlerle bozulması ya da kaybı ile var olan fizyolojik özelliklerinin geçici veya tamamen kaybolmasına ‘yara’ denir. Yara iyileşmesi, farklı türdeki organ sistemlerinin yaralanmaya verdikleri farklı yanıtları içeren büyük ve karmaşık bir konudur.

Carrel 1910 yılında yara iyileşmesinin karmaşık süreçlerini tanımlamıştır. Clark yara iyileşme sürecinin temel üç faz üzerinden incelenmesi gerektiğini bildirmiştir (7,8). Yaralanmış organın hem fiziksel, hem de fizyolojik devamlılığının sağlanmasında bir yama görevi görmek üzere, başka bir hücresel matriksin yaralı doku yerini alması süreci skar oluşumu olarak gözlenir. Rejenerasyon süreci ise, gelişimsel yolların reaktivasyonu aracılığıyla organın orjinal mimarisinin yeniden oluşturulmasıdır. Skar oluşumu ve doku rejenerasyonu arasındaki denge, değişik doku ve organlarda farklılık gösterir. Sinir yaralanmaları az miktarda rejenerasyon ve çok skarlaşma ile karakterize iken, karaciğer ve kemik yaralanmaları genellikle primer olarak rejenerasyon aracılığıyla iyileşir (9). Yara iyileşmesi genel olarak 3 faz halinde incelenir.

#### **2.1.1. İnflamatuar Faz ( Hemostaz ve İnflamasyon )**

Hemostaz ve inflamasyon doku hasarına karşı verilen ilk cevaptır. Bu aşamanın fonksiyonel öncelikleri, hemostazın sağlanması, ölü ve devitalize olmuş dokuların ortamdaki uzaklaştırılması ile mikrobiyal patojenler tarafından oluşturulacak invaziv enfeksiyonların önlenmesidir. Öncelikle kanamanın durdurulması gerekir. Yaralanmayı takiben, Tromboksan A2 ve prostaglandin-2 gibi vazokonstriktörler salgılanır. Vazokonstriksiyonun yanında pıhtı tıkaçı oluşumu aktive edilir. Pıhtı, fibrin yumağı içinde agregat olup gömülü kalan trombositlerden oluşur. Fibrin ağı kırmızı kan hücrelerini de tutarak pıhtı içeriğine katılmalarını sağlar. Fibrin vasküler yaralanmanın başlattığı koagülasyon zincirinin son ürünüdür. Ayrı olayların başlattığı iki koagülasyon mekanizması vardır. İntrensek koagülasyon mekanizması Faktör XII’nin aktive olmasıyla başlar, bu aktivasyonu sağlayan ise kanın yabancı bir

yüzey ile temas etmesidir. Faktör VII veya VIIa'yı bağlayan doku faktörünün ortaya çıkması ile ekstrensek koagülasyon mekanizması aktive olur. Doku faktörü endotelial hücrelerde bulunmaz, ekstravasküler hücrelerin yüzeylerinde ve esas olarak da adventisyal fibroblastların yüzeylerinde bol miktarda bulunur. Her iki koagülasyon mekanizması da bir plazma proteini olan fibrinojenin fibrine dönüşmesini katalize eden trombinin üretimine neden olur.

Fibroblast ve epitelyal hücrelerce üretilen fibronektinler bir glikoprotein olup, göç eden hücrelerin fibrin ağ üzerine yapışmalarını kolaylaştırır. Trombositlerin birbirlerine, fibrine ve kollajene yapışması integrin yüzey reseptörleri aracılığıyla olur. Fibrinojen, fibronektin, trombospondin ve Von Willebrand faktörü adeziv glikoproteinlerdir. Bu faktörler hem serum hem de trombositlerin alfa-granüllerinden kaynaklanır.

Hemostatik mekanizmanın stimülasyonu yaralanma sahasında sınırlı kalır, normal endotelial hücrelerin ürettiği prostosiklin trombosit agregasyonuna engel olur. Ayrıca yaralanmanın olmadığı sağlam bölgelerde anti-Trombin III trombinini bağlayarak aktivitesini kısıtlar ve protein C, Faktör V ve Faktör VII'yi parçalar. Koagülasyon ve trombosit agregasyon olayı, pıhtı oluşumunu başlatan stimulus ortadan kalkınca durur. Pıhtının lizisi plazminojeni plazmine dönüştüren plazminojen aktivatörü tarafından yönetilir.

İnflamasyon evresi; 15-20 dk'lık geçici vazokonstriksiyonu takiben gelişen vazodilatasyon ve kapiller geçirgenlik artışıyla başlamış olur. Pıhtı oluşumu ile kanama durdurulduktan sonra, endotel hücrelerinden salgılanan histamin, prostoglandin E2, prostosiklin ve endotelial büyüme faktörü ile vazodilatasyon gelişir ve damar geçirgenliği artar. İnflamasyonun fizik bulguları; eritem, ödem, ağrı ve ısı artışını içerir.

Polimorf nüveli lökositler ve plazma, damar yatağından dışarıya çıkıp yara bölgesine göç ederler. İnflamatuvar hücreler, kompleman sisteminin aktivasyonu (C5a), degranüle trombositlerden salınan transforming (dönüştürücü) büyüme faktörü beta (TGF-beta), İnterlökin (IL)-1, Tümör nekroz faktör (TNF) ve lipopolisakkaritler gibi bakteriyel degradasyon ürünleri tarafından bölgeye çekilirler. Yaralanmayı takip

eden ilk iki gün, yara kavitesini dolduran fibrin matriksinin içine nötrofilik infiltrasyon olur. Nötrofillerin yara yüzeyindeki ana görevi, yabancı cisimle bakterilerin fagositozu ve proteaz salınımıyla da travmadan zarar gören hücre kalıntılarının yara bölgesinden temizlenmesidir. Yara yerinde uzun süre kalmalarının, akut yaraların iyileşmeyen kronik yaralara dönüşmesinin primer faktörü olduğu düşünülmektedir.

48-96 saat sonra monosit yoğunluğu başlar. Nötrofil sayısının azalmasıyla birlikte monosit/makrofaj sayısı artar. 72 saat sonra makrofajlar yarada hakim hücre olurlar. Aktif makrofajların yara bölgesinde bulunması yara iyileşmesi için esastır. Nötrofil yokluğu yara iyileşmesinin genel akışını bozmazken, makrofaj yokluğunda yara iyileşme süreci durmaktadır. Makrofajların yara iyileşmesindeki temel görevleri; fagositoz ve antimikrobiyal fonksiyon, yara debritleme, matriks sentez regülasyonu, hücre aktivasyonu ve anjiogenezdir. Makrofajlar ayrıca çeşitli sitokin, büyüme faktörleri ve NO sentezlerini gerçekleştirirler. Keratinosit ve fibroblast aktivasyonunu artırırlar (9).

T lenfositler yara bölgesine 5 ila 7.günlerde gelen son hücre tipidir. T lenfositleri (özellikle CD4) yara bölgesine; IL-1, IL-2, TNF-alfa, fibroblast aktive edici faktör, EGF ve TGF-beta salgılar. Dolaşımdaki T lenfositlerin inhibe edilmesi yara iyileşmesini geciktirmektedir. B lenfositlerin ise yara iyileşmesinde rolü bulunamamıştır. İnflamatuar faz, yaranın derinliğine ve genişliğine bağlı olmakla beraber ortalama 3-6 gün devam eder.

### **2.1.2. Proliferatif Faz**

Proliferatif fazın, genellikle yaralanmayı izleyen 4 ile 21. günlerde ortaya çıktığı kabul edilir. Geçici fibrin matriks granülasyon dokusu ile yer değiştirir. Granülasyon dokusu temelde fibroblastlar, makrofajlar ve endotelial hücrelerden oluşur. Bu hücreler ekstraselüler matriks ve kan damarlarını meydana getirirler. Granülasyon dokusu yaralanmayı takip eden yaklaşık 4. günde oluşmaya başlar. Bu süre boyunca fibroblastlar iyileşen skarı dolduran ekstraselüler matriksi yaparlar ve keratinosit migrasyonuna bir ortam sağlarlar. Geçici fibrin matriks yerini daha sonra yeniden

şekillendirme aşamasında tip I kollajen ile yer değiştirecek olan Tip III kollajene bırakır.

Travmadan sonraki ilk 36–72. saatler içinde damarların adventisyasına yakın mezenşimal hücrelerin farklılaşmasından fibroblastlar oluşur. Fibroblast yoğunluğu, yara yerinde 6. günde maksimum düzeye ulaşır. Fibroblastlar yara onarımı yapan hücrelerdir ve bağ dokusunun ana maddeleri olan kollajen, proteoglikan, retikülin ve elastini üretirler.

Doku kaybı olan yaralarda, sıvı kaybını engellemede ve enfeksiyon oluşumuna karşı koymada epitelial hücre artışı önemlidir. Epitelizasyon, insizyonel yaralarda, yaralanmadan hemen sonra başlar ve 24-48 saat içinde tamamlanır.

Aktive olan makrofajlar tarafından salınan anjiogenik faktörlerin uyarısıyla yara bölgesinde endotelial hücre tomurcuklarından yeni kapillerler oluşur; onarım alanında bulunan damarların tomurcuklanmasıyla yeni damarların oluşumu olayına anjiyogenez veya neovaskülarizasyon denir. Dördüncü günde belirginleşir ve yara iyileşmesinin sonuna kadar devam eder. Primer uyarıcısı vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)'dür. Makrofajlar salgıladıkları Tümör nekroz faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) ve Fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi büyüme faktörleriyle anjiyogenezde de anahtar rol oynarlar.

### **2.1.3. Yeniden Şekillendirme Aşaması**

Yaranın kontraksiyonu ve kollajen şekillendirilmesi süreçlerinin her ikisinin birlikteliğiyle karakterizedir. Kollajenin ortaya çıkması ile başlayan bir süreçtir. Bu fazın ana özelliği kollajen depozisyonu, organizasyonu ve iyi bir şekilde ağ yapısı oluşturmaktır. Bu faz sırasında yoğun hücrel aktivitesi ve vaskülaritesi olan doku, daha az hücre ve damardan oluşan skar dokusu ile yer değiştirir.

Olgunlaşma fazının süresini hastanın yaşı, genetik yapısı, yaranın tipi, vücuttaki yerleşimi ve inflamasyon periyodunun süresi, yoğunluğu gibi çoklu değişkenler belirler. Damarların büyük kısmında tromboz ve dejenerasyon gelişir. Sonuçta, granülasyon dokusu inaktif görünümde iğsi şekilli fibroblastlar, elastik doku parçaları, ekstrasellüler matriksten oluşan skar dokusuna dönüşür.

## 2.2. Kollajen ve Yara Gerim Direncinin Gelişimi

### 2.2.1. Kollajen

Bağ dokusunun başlıca bileşenleri kollajen, retikülin, elastin ve proteoglikanlardır (10). İyileşme sürecinde doku devamlılığı bağ dokusu ile sağlanır. Bu hücreler çoğalıp yeni hücrelerarası madde yaparak, rejenere olamayan dokuların kayıplarını kapatırlar. Kollajen; deri, kıkırdak, kemik, tendon ve tüm canlı dokuların başlıca yapı proteini. Vücutta en fazla miktarda bulunan protein olan kollajen total vücut proteininin %30'unu, skar dokusundaki proteinlerin ise % 50' sini oluşturur (1,11).

Kollajenin ana görevi, dokuları deformasyona karşı dirençli kılmak ve dokuların şekil almasını sağlamaktır. Temel olarak, proalfa zincir adı verilen polipeptid zincirinden oluşur (12). Kollajen molekülü (tropokollajen), alfa- zincir olarak isimlendirilen birbiri etrafına sarılı iplik yapısına benzer üç polipeptidten oluşmuş üçlü heliks yapısındadır. Kollajenin aminoasit dizilimi genellikle tekrarlayan bir tripeptid birimidir ve Glisin-X-Prolin veya Glisin-X-Hidroksiprolin şeklinde dizilim görülür ve arada bulunan X herhangi bir aminoasit olabilir.

Kollajen, fibroblastların ribozomlarında üretildikten sonra endoplazmik retikuluma geçerek heliks yapısını alır. Heliks formasyonu hidroksiprolin ve hidroksilizinden arta kalan prolin ve lizinin hidroksilasyonu sonucu oluşur. Hidroksiprolin ve hidroksilizin kollajenle doğrudan birleşmezler. Bunların ön maddeleri olan prolin ve lizin, protokollajenin peptid zincirlerine bağlanarak hidroksil hale dönerler. Burada protokollajen prolin hidroksilaz ve protokollajen lizil hidroksilaz enzimleri katalizör olarak rol oynarlar. Bu reaksiyonda, alfa-ketoglutarat, oksijen, demir ve askorbik asit kofaktör olarak kullanılır (14). Bu moleküller transferaz enzimleri aracılığıyla hücre dışına çıkartıldıktan sonra özel tarzda bir araya gelerek kollajen fibrillerini oluştururlar. Kollajendeki aldehit grupları arasına lizil oksidaz enzimi ile sağlanan bağlantılar da eklendiğinde sağlam kollajen fibrilleri oluşur. Kollajen fibrilleri arasındaki moleküller içi ve arası bağlar, yaranın gerilim kuvvetine ve sağlamlığına etki eder (14).

Kollajen ilk sentezlendiğinde çapraz bağları azdır ve nötral çözücülerde çözülebilir, çapraz bağları arttıkça sadece asit çözücülerde çözülebilir hale gelir. Molekül tüm

çapraz bağlantılarını tamamlayıp, son halini aldığı anda ise hiçbir çözücüde çözülemez ki bu molekülün en dayanıklı halidir (15).

İnsan vücudunda dokudan dokuya farklı tip ve özellikte sentez edildiği bilinen 19 tip kollajen olmasına karşın bizim için önemli olanlar strese dayanabilen fibriler kollajenlerdir (Tip I, II, III). Yarada en yüksek oranda Tip III kollajen bulunur. Skar dokusunda da en çok Tip 1, daha az oranda da Tip 4 kollajen bulunur. Tip II kollajen çoğunlukla kırık dokusunda bulunur ve özellikle omurları ve eklemleri darbelere karşı korur. Endotelial hücreler ile kollajen Tip V arasında güçlü bir korelasyon olup neovaskularizasyon döneminde artar. Sağlam deride %80-90 oranında Tip I kollajen, %10-20 oranında Tip III kollajen bulunurken granülasyon dokusunda Tip III kollajen %30 oranındadır (16).

### **2.2.2. Yara Gerim Direncinin Gelişimi:**

Yara direnci, iyileşme esnasında ekstrasellüler ortamda salgılanan hücrel ürünler arasındaki biyokimyasal etkileşim ile kazanılmaktadır (20). Yaraya direnç kazandıran ana madde kollajendir. Yaranın erken evrelerinde direnç kazanma özelliği fibrin pıhtı sayesinde oluşur. İlk 24 saatte yaranın ölçülebilir miktarda gerilim direnci kazandığı, sonuç olarak bu direnci epitelizasyon ve fibrin pıhtı sayesinde kazandığı gösterilmiştir (9). Yara iyileşmesinin erken döneminde, gerim kuvvetine katkıda bulunan en önemli faktörler, fibrin-fibronektin kompleksinin arasındaki kohezyon kuvveti, hücrel migrasyon ve hücrel ürünlerdir. Fakat bu faktörler zayıf bir yara direnci sağlar. Bu süreçte yara kolayca zarar görebilir ve yara açılması genellikle bu evrede gözlenir.

Yara iyileşmesinin ilk evrelerinde hücrelerden salınan fibronektin ve hyaluronik asit, hücrelerin migrasyonu için etkili bir ortam oluştururlar (9). Yara iyileşirken hyaluronik asit konsantrasyonu azalırken proteoglikan konsantrasyonu artar. Ekstrasellüler matriks komponentlerindeki bu değişiklik, hücrelerin bağlanmalarını ve sabitleşmelerini sağlar. Fibroblastlar yaraya geldikten sonra, yaranın şekilsiz temel maddesini oluşturan protein, polisakkaritler ve çeşitli glikoproteinler salgılamaya başlarlar. Fibroblastların salgıları 3 ila 5. günde maksimum seviyeye ulaşır ve kollajen birikmesi bu süreçte etkili olur. İlk evrede tropokollajen



molekülleri ekstrasellüler bölge içine geçerler ve fibroblastların yakınındaki genç kollajen fibriller ile birleşir (19). Helikal kollajen makromoleküllerinin fibriller demetleri oluşturmasıyla yaranın kıvamı ve gerilme direnci artar.

Yara gerim direnci, kollajenlerin olgunlaşmasına bağlıdır. Kollajenin olgunlaşması yaralanmadan sonraki 15. günde başlar ve 12 ay kadar sürer (20). Yara direncinin artması, kollajen fiberlerin fiziksel dizilişlerinin değişmesi ve çapraz bağlanmasından kaynaklanmaktadır. Gerilim kuvveti ve ayrılma direncinin artmasında en önemli faktör, yaranın ihtiva ettiği kollajen miktarından ziyade mevcut kollajenin kovalent bağlarının artmasıdır (17).

Gerim kuvveti; her kesit alan birimine uygulanan kuvvettir. Yeni kollajen sentezi miktarını ve yara iyileşmesinin erken fazının iyi bir şekilde devam ettiğini yansıtır. İyileşen yarayı ayırmak için gereken kuvvet miktarının direkt ölçümüdür.

Yaralanmadan sonraki 3. haftada yara %20 ila 25 arasında, bir ay sonra ise % 40 oranında bir direnç kazanır. Kollajen olgunlaşma süreci aylar hatta yıllarca sürebilir. Fakat skar dokusunun gerim direnci sağlam derinin gerim direncinin ancak % 70 ila 80' nine ulaşır.

### **2.3. Arginin:**

Arginin (2-amino-5-guanidino-pentanoik asit) 1895 yılında Hedin tarafından hayvansal proteinlerin bir komponenti olarak bulunmuş, pozitif yüklü (bazik) R gruplu bir amino asittir. D-ve L-arginin izomerlerinden L-arginin formu proteinlerin yapısına girer. Argininin kaynağı besinlerle alımından kaynaklı egzojen veya tüm vücut protein döngüsünden, barsaklardaki sentezden veya de novo sentezden kaynaklı olarak endojen olabilir.

#### **2.3.1. Arginin sentezi**

Besinlerdeki proteinlerin sindirim kanalında hidrolizi sonucu serbestleşen arginin, ince barsak lümeninden enterositler tarafından alınarak aktif transportla emilir, portal dolaşım ile karaciğere taşınır. Karaciğerde metabolize olmamış arginin sistemik dolaşıma geçer. Arginin oral yol ile alındıktan yaklaşık 1-2 saat sonra plazmada en yüksek düzeyine ulaşır.

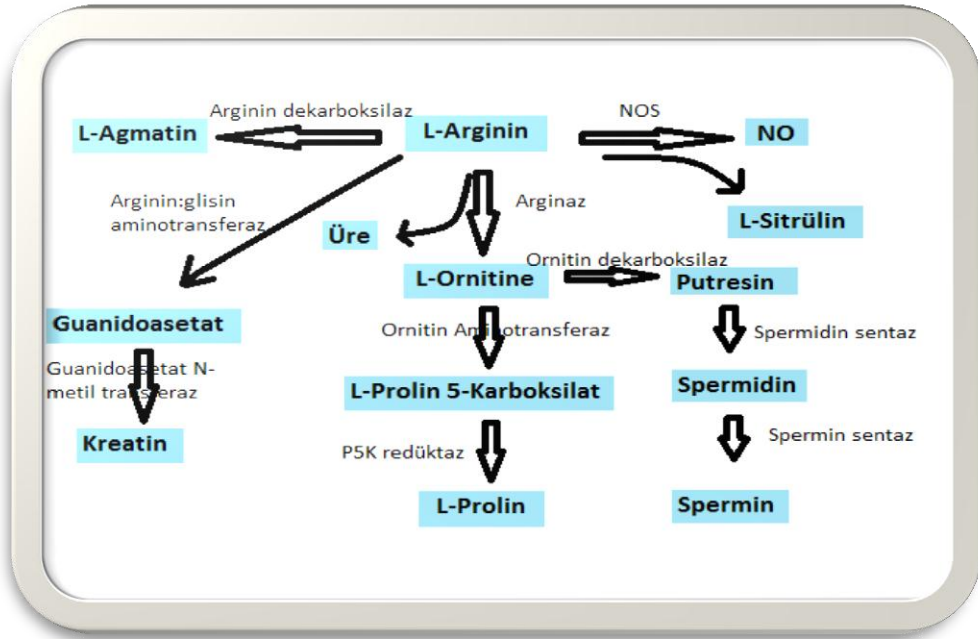
Yetişkinlerde arginin sentezinin çoğu renal proksimal tübüllerde sitrülinden gerçekteşir. Arginin sitrülinden argininosüksinat sentaz (ASS) ve argininosüksinat liyaz (ASL), yani üre döngüsünün 3. ve 4. enzimleri aracılığıyla sentezlenmektedir. Nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından tekrar sitrülün oluşturabilir. Üre siklusunda arginaz tarafından hidrolize edilerek ornitin ve üreye çevrilir. Sonuç olarak NOS ve arginaz enzimleri ortak substrat olarak arginini kullanırlar (24,25,26).

Endojen sentez türe, nutrisyonel durum ve gelişme evresine göre değişiklik gösterir. De novo arginin sentezi endojen arjininin %5-15'ini oluşturmaktadır. Endojen sentez özellikle neonatal dönemde arginin homeostazisinin sağlanmasında önemli bir kaynak iken, erişkinde endojen arginin kaynağının çok az bir kısmını oluşturur. Endojen arginininin büyük kısmı protein yıkımından açığa çıkmaktadır (26). Arginin besin maddelerinde (özellikle et, balık, deniz ürünleri ve tahıllarda) bolca bulunan bir aminoasittir ve normal diyetle günlük ortalama arginin alımı 5-6 gramdır (27).

### **2.3.2 Arginaz**

Arginaz, L-Arginini ornitin ve üreye hidroliz eden binükleer manganez metalloprotein bir enzimdir (Şekil 1), üre ve ornitine hidrolizinden sorumludur. İki arginaz izoformu farklı subselüler kompartmanlarda lokalize olmuşlardır. Arginaz I, sitozolik formudur ve karaciğerde çok fazla eksprese edilir. Bunun aksine Arginaz II daha çok ekstrahepatik dokularda; mitokondriyal formudur, ornitin kaynağı olarak glutamat ve prolin biyosentezinde, hücre büyümesinde ve farklılaşmasında rol oynayan poliamin biyosentezinde, çeşitli organlarda özellikle nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından nitrik oksit (NO) sentezinin düzenlenmesinde görev alır (28-31)

Argininden sentezlenen ornitin, ornitin dekarboksilaz (ODC) enzimi aracılığı ile poliaminlerin sentezinde yer alır. ODC putresin oluşumunu sağlar ve poliamin sentezi de temel olarak ODC aktivitesi ile düzenlenir. Ornitinden diğer bir metabolik yol ile kollajen molekülünün yapıtaşlarından biri olan prolin sentezlenmektedir.



Şekil 1. L-Arginin Metabolizması

#### 2.4. Nitrik Oksit (NO)

Furchgott ve Zawadzki 1980 yılında, asetilkoline yanıt olarak endotel hücrelerden düz kas gevşetici bir madde salındığını ortaya çıkarmışlardır. Bu maddeye endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF: Endotel Derived Relaxing Factor) adı verilmiştir. Palmer, EDRF'nin bilinen biyolojik etkilerinde nitrik oksit (NO) adlı bir gazın sorumlu olduğunu göstermiştir (32,33).

Nitrik oksit (NO) tüm vertebralılarda bulunan, nötral yapıda ve serbest radikal olarak davranan bir gazdır. NO çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik yanıtların düzenlenmesinden sorumlu sinyal molekülüdür. Moleküler ağırlığı 30 g/mol olan NO en küçük moleküler mediatördür. NO çok kısa yarı ömürlü ( 0,1-10 sn), hücre içi ve hücreler arası sinyal iletiminden sorumlu biyolojik bir mesajcıdır.

NO, renksiz bir gazdır. Havadaki NO, kısa sürede oksijenle oksitlenerek nitrojen dioksit'e dönüşür. Aynı zamanda NO, taşıdığı ortaklanmamış elektron nedeniyle bir radikal molekül olarak isimlendirilir. Diğer serbest radikaller her konsantrasyonda hücreler için zararlı iken NO düşük konsantrasyonlarda çok önemli fizyolojik işlevlerde rol almaktadır. NO, bu özelliği ile çok ideal bir fizyolojik haberci molekülü özelliği kazanmaktadır (34).

### 2.4.1. Nitrik oksit sentezi

Nitrik Oksit Sentaz (NOS) enzim grubu tarafından L-argininden, L- sitrülün oluşumu sırasında meydana gelir. Bu süreçte NOS, kofaktör olarak nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH), flavin mononükleotit (FMN), flavin adenin dinükleotit (FAD) ve tetrahidrobiopterin (BH<sub>4</sub>)'e gereksim duyar. NG- Hidroksi-L-Arginin (NOHA) ; NO üretimi sırasında oluşan ara maddedir bu ara madde enzime sıkıca bağlı kalır. Daha sonraki basamakta oksidasyon sonucu L-sitrülün ve NO meydana gelir. (26)

NO sentezi, NOS enzimi aracılığıyla iki basamakta gerçekleşir. İlk olarak N-hidroksiarginin meydana gelir. NO sadece enzimatik olarak sentezlenmez ayrıca düşük pH'da enzimatik olmayan yollarla nitritten de üretilmektedir. Nitrik oksitin nitrat ve nitrite okside olması NO metabolizmasının asıl yoludur.

### 2.4.2. Nitrik Oksit Sentaz (NOS) Enziminin Özellikleri

NO üretimi, üç NOS isoformu tarafından argininden meydana gelir:

- Nöronal NOS ( nNOS)
- Endotelyal NOS (eNOS)
- İndüklenebilir NOS (iNOS)

Bu isoformlardan, nNOS ve eNOS Ca<sup>+2</sup>-kalmodulin bağımlı formlarıdır. Aksine iNOS Ca<sup>+2</sup>-kalmodulin bağımlı değildir ve patolojik uyarıya cevap olarak üretilir. nNOS ve eNOS az miktarlarda NO üretirken, iNOS ise çeşitli uyarılara cevapta yüksek miktarda NO üretir (35).

Hücre içi kalsiyum artışı, eNOS enzimini aktive eder. Üretilen NO difüzyonla düz kasa geçer ve guanilat siklazı uyarır, cGMP salınımı hücre içi kalsiyum seviyelerini düşürür. Böylelikle damar düz kasları genişler. Ayrıca eNOS, damar duvarına lökosit adezyonunu, trombosit agregasyonunu ve adezyonunu inhibe eder.

L-Arginin analogları ile yarışmalı substrat inhibisyonu ve substratın redüksiyonu ile sekonder olarak NOS aktivitesi azaltılabilmektedir. Bu şekilde hücreler içine L-arginin transportu da engellenmektedir. L-Arginin analogları, L-argininin metillenmiş türevleridir. N-monometil L-Arginin (L-NMMA), Asimetrik dimetil arginin (ADMA), L-NAME ( NG-nitro-L-Arginin metil ester), bu grup içindeki örneklerdir. ADMA seviyeleri bazı patolojik koşullarda; hipertansiyon, ateroskleroz, hiperkolestrolemide artar (35).

#### **2.4.3. Nitrik Oksit'in Fizyolojik Roller**

Monometil-L-arginin (L-NMMA) verilerek NO sentezinin inhibe edilmesi ile deney hayvanlarında kan basıncının yükseldiği bulunmuştur. L-Arginin verilmesi ile kan basıncının tekrar düştüğü gözlenmiştir. Nonkolinerjik ve nonadrenerjik terminallerden salınan NO, vazodilatör etkiyle kan basıncını ve kan akışını düzenlemektedir. Nitrogliserin uzun yıllar kliniklerde hipertansiyonun tedavisinde kullanılmıştır. NO'ya dönüşerek etkisini göstermektedir (38). Endojen aktif madde (otakoid) özelliğine sahip olan NO'nun güçlü bir vazodilatör olduğu ve bu temel etkisine ilave olarak nörotransmitter, immünomodülatör ve yabancı etkenlere karşı sitotoksik etki gösterdiği bilinmektedir.

NO, lökosit adezyonu ve kemotaksisinde güçlü etkilere sahiptir. NO üretimi, nötröfil ve endotelial hücreler üzerinde adezyon moleküllerinin ekspresyonlarını düşürür. Bu etkiler lökosit adezyonunun azalmasına yol açar. NO, mast hücreleri aktivasyonunu inhibe ederek anti-inflamatuar etki gösterir. Oksidatif stres koşulları altında NO, serbest radikal temizleyicisidir, hücre hasarı önler (37,38). İnterferon veya bakteri lipopolisakkaritleri tarafından aktive edilen makrofajlar büyük miktarda NO sentez ederler. Makrofaj kaynaklı NO bakteri, parazit ve tümör hücreleri üzerinde sitotoksik etki yapmaktadır (39). NO, hedef hücrelerde (bakteri, parazit, tümör hücresi) DNA sentezinin hız kısıtlayıcı enzimi olan ribonükleotid redüktazı bloke eder ve hücre DNA'sının deaminasyonu ile bu hücrelerde sitostatik etki meydana getirir (40). Makrofajlardan özellikle monositlerde L-arginin-NO yolu; tümör hücreleri, intra ve ekstrasellüler mikroorganizmalara karşı çok önemli bir savunma mekanizmasıdır.

## 2.5. Rat İskemik Yara Modeli:

İlk defa McFarlene tarafından tanımlanmış olan rat iskemik yara modeli Schwarz tarafından modifiye edilmiştir (41,42). Hipoksi, doku zedelenmesinin beklenen bir sonucu olup onarım için uyarıcı bir etkidir. Ancak bu süreçte kritik bir moleküler oksijen düzeyine gereksinim vardır. Çünkü yara hücreleri kendilerine sunulan oksijeni daha fazla kullanarak angiogenez, kollagen yapımı, matriks birikimi ve epitelizasyonu hızlandırmaktadır. Lökositlerin işlevleri de oksijene bağımlı olup ortaya reaktif oksijen metabolitleri çıkar. Bunlar, oksijen radikalleri olarak adlandırılmışlar, bazı iskemik inflamatuvar olaylarla ilişkilendirilmişlerdir. Oksijen iyileşmede olumlu etkilere sahipken, metabolitleri de doku hasarı yaratabilmektedirler.

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde tek bir elektron içeren moleküller olarak tanımlanabilir. Bu tek elektron oksidasyon ve redüksiyon potansiyeline sahiptir. Oksijen molekülüne bir elektron eklenmesiyle Süperoksid Radikali ( $O_2^-$ ); iki elektron eklenmesiyle Hidrojen Peroksit ( $H_2O_2$ ); üç elektron eklenmesiyle ise oldukça reaktif olan Hidroksil Radikali ( $OH^-$ ) oluşur.

Oksijen radikalleri yara iyileşmesi için hem yararlı hem de zararlı olabilen inflamatuvar olaylar zincirini başlatabilir. İnflamatuvar hastalıklarda ise süperoksid dismutaz ve katalaz derişimlerinde azalma ile birlikte hücre dışı bileşenlerde hasar oluşur. Kronik yaralarda özellikle venöz bacak ülserlerinde, iskemi ve hipoksiye bağlı venöz ülserleşmelerde genellikle destrüktif oksidanlar ve serbest oksijen radikalleri dokular için toksik etki göstermektedirler. Bu toksik etkileri sonucu da doku nekrozu oluşmaktadır. Ek olarak cilt kapillerlerinde sıkışan akyuvarlar aracılı serbest radikaller ile endotelial hücre hasarları ile cilt iskemileri ve sonrasında cilt ölümleri gerçekleşmektedir. Oksijen kökenli radikaller ekstrasellüler matriks içine salındıklarında Hyalüronik asit ve kollajeni bozarak, fosfolipid membranındaki yağ asitlerini perokside edip hücre zarlarını parçalayarak, hücrel hasar oluştururlar.

Glutasyon, hücreleri oksidan hasara karşı koruyan hücre içindeki de en önemli antioksidan bileşiktir. İskemik fleplerde oksidan strese bağlı olarak glutasyon seviyesi düşmektedir. Glutasyon düzeyi artırıldığında hücrel korumanın meydana

geldiği gösterilmiştir. Modeli tarifleyen Rees ilk olarak rat dorsum cildinde 4 cm'lik insizyon yaparak sütüre etmiş, 4 ve 6 gün sonra ölçümler planlanmış. Gruplardan birine gama glutamilsistein sentaz inhibitörü olan L-Buthiyonin sulfoksimin (BSO) 2mg/kg intraperitoneal verilmiş. 4. gün glutasyon seviyelerinde BSO verilen gruplardan, opere olmayanlarda 80%, opere olanlarda %60 düşüş gözlenmiş. BSO verilmeyen grupta ise düşüş 30% olarak ölçülmüş. 6. gün glutasyon seviyeleri normale gelmiş (43).

Bu bulguların ışığında çalışmalarına devam etmiş, random fleplerde iskemiye bağlı glutasyon seviyelerinin düştüğünü göstermiştir. Fakat geciktirme işlemi uygulanan modelde glutasyon seviyesinin korunarak GSH redüktaz aktivitesinin arttığı gösterilmiştir. Akut fleplerin distal ucundaki glutasyon redüktaz aktiviteleri, bipediküllü fleplerin pedikülündeki dokulardan alınan örneklerin ölçümü ile kıyaslandığında, sham grubuna göre akut flepte Glutasyon redüktaz (GR) miktarının düştüğü, bipediküllü flepte GR aktivitesinin arttığı saptanmış. Glutasyon seviyesi, akut fleplerde düşerken, geciktirme uygulanan fleplerde GR aktivitesine bağlı olarak arttığı saptanmıştır (2).

Okside glutasyon yüzdesinin en yüksek olduğu 4. gün bipediküllü flep üzerinde yaraları oluşturarak, daha büyük bir oksidan stresin varlığı hipotezine dayandırarak, flep ve kontrol grubu arasındaki farkı gözlemlemeyi amaçlamışlar. Oluşturdukları modelde yara iyileşmesinin, uzamış inflamatuvar faz, uygun olmayan ekstrasellüler matriks ve azalmış keratinosit migrasyonu nedeniyle normalin dışına çıktığını rapor etmişlerdir. İskemik yara modeli kollajen depozisyonu açısından değerlendirildiğinde kollajen depozisyonunun ve histolojik değişikliklerin kontrol grubuna göre daha az olduğu gösterilmiştir. Yara iyileşmesi ve kollajen depozisyonundaki azlık, inflamasyon süresinin uzun olması ve açığa çıkan proteazların yıkım etkisine bağlıdır (3). Bu modelde yapılan çalışmalarda, gecikmiş yara iyileşmesi, artmış protein disülfid ve anjiyogenik aktivite ile, histopatolojik bulgular açısından da iskemik yaraya benzer özellikler ortaya konulmuştur. Rees ve arkadaşları bu çalışmalar ışığında iskemik yarada meydana gelen biyokimyasal ve biyolojik değişikliklerin benzer şekilde iskemik yara modelinde de meydana geldiğini savunmaktadır (44,46).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, Kobay Deneş Hayvanları Yerel Etik Kurulundan alınan 37 protokol numaralı onay ile, Kobay Deneş Hayvanları Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır.

#### 3.1. Denekler

Çalışmada, deneş hayvanı olarak toplam 20 adet (186-213) gram ağırlığında dişi Sprague-Dawley cinsi rat kullanıldı. Sağlıklı grupta 4, kontrol ve deneş grubunda 8'er adet olacak şekilde rastgele seçilen hayvanlardan 3 adet grup oluşturuldu. Standart yem ve su ile ad-libitum beslenerek 12 saat gece/gündüz döngüsünde 21 derece oda sıcaklığında takip edildi. Tüm cerrahi işlemler Ketamin HCl 100 mg/kg IM ( Alfamine %10 10 ml) ve Ksilazin 10mg/kg IM (Alfazyne %2 30 ml) ile anestezi altında uygulandı. Ratlar tekli kafeslere yerleştirildi (Şekil 2) ve çalışma sonunda genel anestezi altında dekapitasyon işlemi ile sakrifiye edildi.



Şekil 2. Ayrı kafeslerde ve numaralandırılmış olarak takip edilen denekler.

#### 3.2. Deneş Protokolü

Elektrikli traş makinası yardımı ile tüm deneklerin sırtları traş edildi. Polivinilpirolidon iyot (Batticon sol. 1000ml Adeka) ile saha temizliği yapıldı. Ameliyat öncesi ratlara uygulanan anestezi derinliği parmak kıstırma testi ile kontrol



edildi. Kontrol ve tedavi grubunda rat dorsumunda 10x4 cm'lik bipediküllü flepler iskemik yara oluşturmak üzere, pannikulus karnosusu da içerecek şekilde künt diseksiyonla eleve edildi (Şekil 3-4).



**Şekil 3.** Rat dorsumundan 10x4 cm lik bipediküllü flep hazırlanması.



**Şekil 4.** Fleplerin pannikulus karnosusu da içerecek şekilde eleve edilmesi.

Flepler hemostaz sağlandıktan sonra, yerine iade edilerek 1 cm aralıklarla 4.0 ipek ile sütüre edildi (Şekil 5). 4 gün sonra hazırlanmış flep üzerine 6 adet 6 mm'lik

punchlarla tam kat yaralar oluşturuldu. Sağlıklı gruptaki ratlar da bugünden itibaren çalışmaya dahil edilerek bipediküllü flep kaldırılmadan, punchlarla yara oluşturma işlemi aynı şekilde uygulandı. Yaralar birbirinden transvers konumda 1 cm, vertikal konumda 2 cm olacak şekilde planlandı (Şekil 6)



**Şekil 5.** Fleplerin yerine iade edilerek 1 cm aralıklarla suture edilmesi.



**Şekil 6.** Bipediküllü  
Fleplerden 4 gün sonra  
Punchlarla yaranın  
oluşturulması.

**Sağlıklı Grup (1. Grup):** Bu gruptaki ratların dorsalinde bipediküllü flep hazırlanmadan 4.günde diğer gruplarla beraber punchlarla yaralar oluşturuldu ve herhangi bir tedavi verilmedi Şekil (7).

**Kontrol Grubu (2. Grup):** Bipediküllü flep oluşturulup 4. günden sonra 6 mm'lik punchlarla yaralar oluşturuldu ve herhangi bir tedavi verilmedi.

**Deney Grubu (3. Grup):** Bipediküllü flep oluşturulduktan sonra ve deney süresince %2'lik L-Arginin içme suyuna karıştırılarak oral yoldan verildi. GNC (General Nutrition Center-Pittsburg).

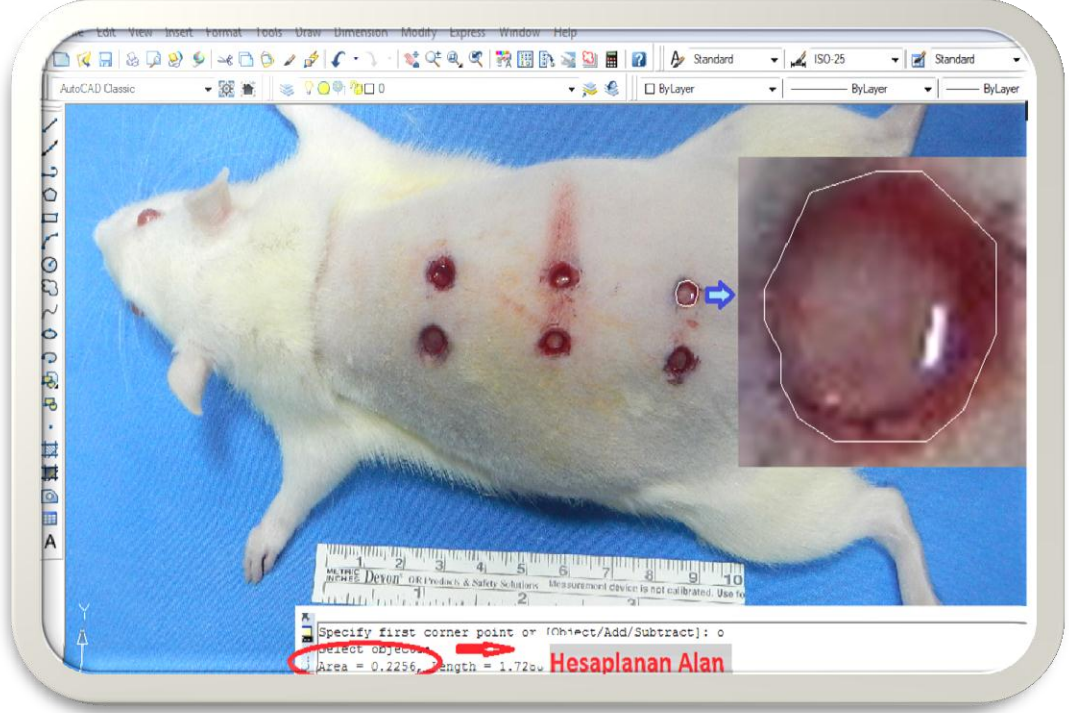


**Şekil 7.** Sağlıklı grupta flepler kaldırılmadan yaraların oluşturulması.

### 3.3. Yüzey Alanı Ölçümleri

Yara yüzey alanını değerlendirmek için 1,3,5,8,10 ve 12. günlerde sedasyon anestezisini takiben yara ve flep alanlarının görüntüleri alındı. Nikon Coolpix S100 marka dijital fotoğraf makinası ile açı, yükseklik ve yakınlaştırma standardizasyonu sağlanarak fotoğrafları çekildi. Alınan dijital görüntüler bilgisayar ortamında AutoCAD (Autodesk 2007, ABD) programına aktarıldı. Çekilen her bir fotoğrafın çekildiği ortamda bulunan, birim ölçü yardımı ile programın kalibrasyonu yapıldı. “Scale” komutu ile yeniden ölçeklendirilen görüntüler üzerinde yara sınırları alan çizgileriyle çevrelendi ve “Area” komutu kullanılarak çizilen

alanın  $\text{mm}^2$ 'si hesaplandı. Ardından değerlendirilen fotoğraf üzerinde yara yüzey alanlarının ayrı ayrı ölçümleri yapıldı (Şekil 8).

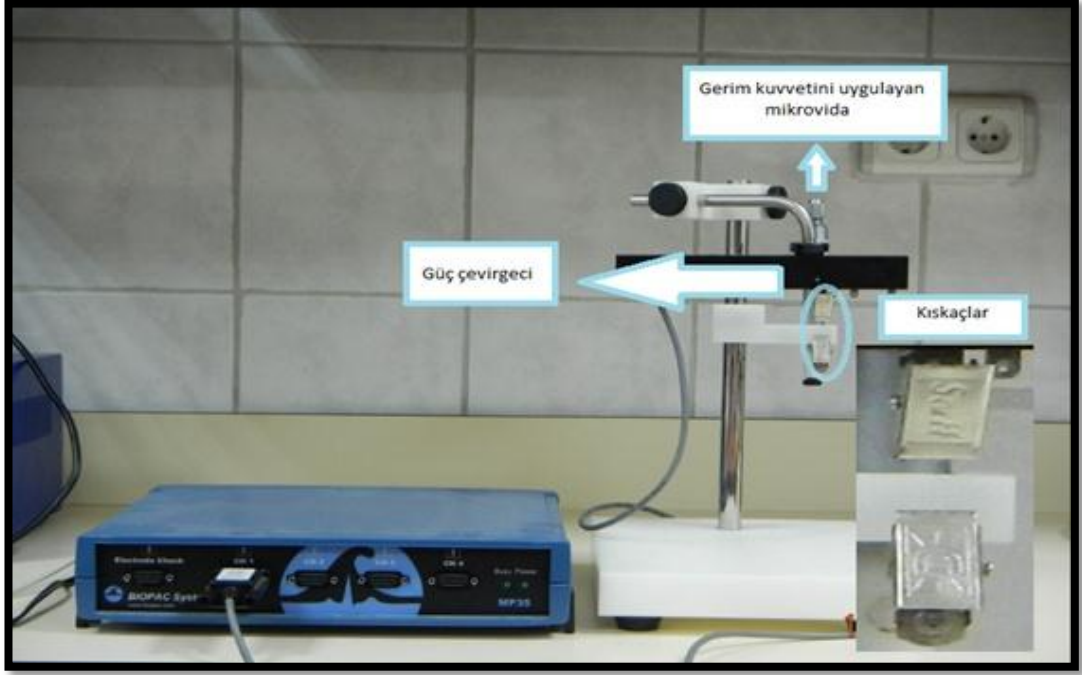


Şekil 8. Auto Cad programı ile fotoğraftan yara alanı hesaplanması.

### 3.4. Yara Gerim ( $\text{g}/\text{mm}^2$ ) ve Kopma Kuvveti Ölçülmesi:

Onaltıncı gün insizyon hattından alınan örneklerin biyomekanik ölçümleri 2 saatlik bir zaman dilimi içinde Fizyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirildi. Yara kopma kuvvetinin ölçümü için özel olarak hazırlanmış düzenekte deri kesitinin uçlarını tutturmak için biri düzeneğin kuvvet çevirgecine, diğeri sabit tarafına bağlı, dişli genişliği 1 cm olan 2 adet kısaç kullanıldı. Hazırlanan düzene, Biopac MP35 veri kayıt birimine bağlı May IOBS 99 FDT10-A tipi bir kuvvet çevirgeci ve bu kuvvet çevirgecinin takılı olduğu deri kesitini sabit hızda gererek kopartmak için kullanılan bir mikrovidadan oluşmaktadır. Bilgisayar yazılımı olarak Biopac Student Lab Pro v. 3.7 programı kullanıldı. Kuvvet çevirgecine uygulanan kuvveti ölçmek için Biopac Student Lab Pro programında bir kanal kuvvet çevirgeci için ayarlandı (Şekil 9).

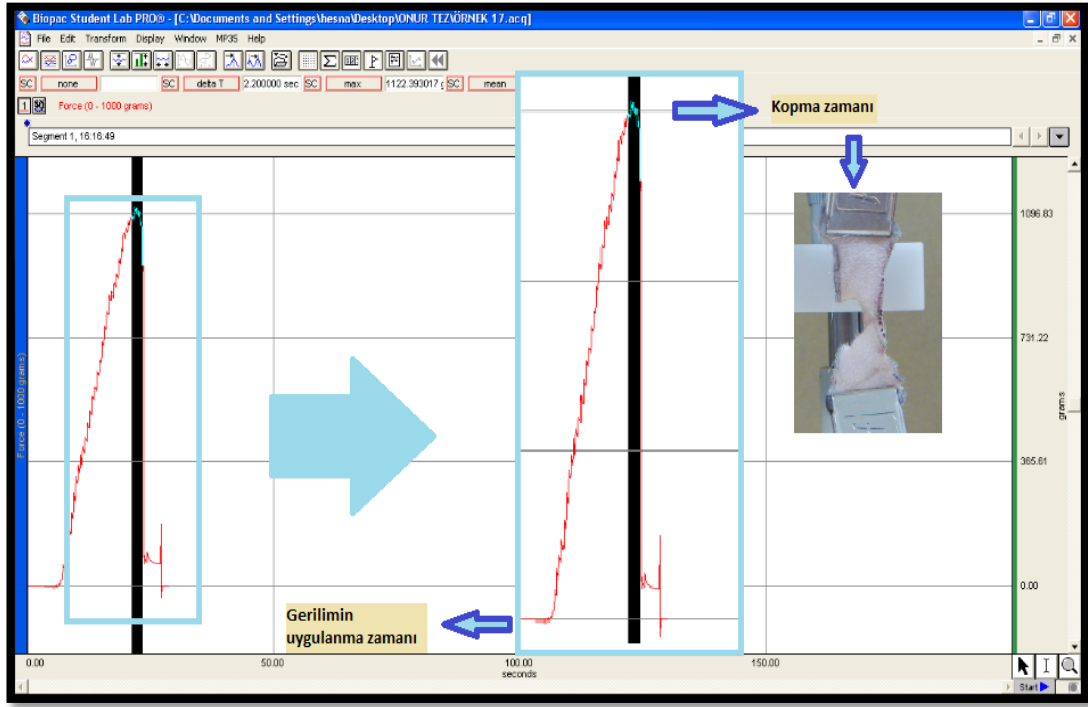
Ölçümler öncesinde kıskaç ve kısılcacın bağı olduğu çengel kuvvet çevirgecine takılarak gösterilen ağırlık 0 grama ayarlanmak suretiyle ağırlık etkisi giderildi ve 1 kg'lık ağırlık güç çevirgecine bağlanmak suretiyle kalibrasyonu yapıldı. 5 ölçümde bir kalibrasyon tekrarlandı.



**Şekil 9.** Yara gerim direncini ölçmek için hazırlanmış düzenek ve bilgisayar yazılımını sağlayan Biopac MP35 veri kayıt cihazı.

Ölçümler insizyon bölgesi uzun kenarın tam ortasına gelmek kaydıyla şerit şeklinde kesilen 3 cm uzunlukta ve 1 cm enindeki deri, deri altı kesitlerinden alındı. Alınan kesit kısılcacın vasıtasıyla uçlarından ölçüm düzeneğine, kısılcacın arası mesafe 1 cm olacak biçimde bağlandı. Deri şeritlerinin insizyon hattından eşit mesafede bağlanmasına dikkat edilerek kopmaların daima insizyon hattından olması sağlandı. Kayıt başlatıldıktan sonra mikrovida 20 mm/dk.'lık sabit hızda yaranın her iki tarafı birbirinden ayrılıp kopana kadar çevrildi. Gerilmenin tepe noktası olan maksimum değer programdan okunarak kaydedildi (Şekil 10).

Kopma kuvvetini elde etmeden önce, insizyonun ortasından deri kalınlığı ölçüldü. Kalınlık değeri, şerit eni ile çarpıldı ve kesit yüzey alanı hesaplandı. Kopma sırasındaki tepe değeri hesaplanan kesit yüzey alanına bölünerek birim hesaba düşen gerim kuvveti gösterildi.



Şekil 10. Kopma anında maksimum gerim kuvvetinin belirlenmesi.

### 3.5. Doku Hidroksiprolin Düzeyleri

Her üç gruptan da 12. gün sonunda santral yaralarından alınan, yaklaşık 0,8 mm çaplı doku, hidroksiprolin ölçümü için kullanıldı. Hidroksiprolin ölçümünde kullanılacak doku, ölçümün yapılacağı güne kadar -80 derecede muhafaza edildi. Ölçümler GATA Biyokimya Anabilim Dalında yapıldı. Dokuların tartılması ve parçalanması işlemleri soğuk zincir bozulmadan yapıldı. Homojenizasyon işlemi için; 0,5 ml HEPES, 0,5 ML EDTA, 10 mikrolitre PMSF (fenilmetilsülfonilflorid) ve 0,2 ml % 10'luk TritonX100 10 ml'ye distile su ile tamamlanarak kullanma solüsyonu hazırlandı.

Ultra Turrax T-25 ile 13500 rpm de doku tamamen parçalandı. Homojenizat, soğutmalı santrifüjde 5000 rpm hızda 15 dakika satrifüj edildi.

**Reaktifler:**

1-Asetat-Sitrat Tampon (pH=6,5): 120 gr Sodyum Asetat Trihidrat, 46 gr Sitrik Asit, 34 gr NaOH granül, 12 ml Asetik asit distile su ile çözülüp 1 litreye tamamlandı.

2- Kloramin T Reaktifi (0,056 M): 1,57 gr Kloramin-T, 20 ml %50 lik n-propanol (10 ml distile su + 10 ml n-propanol) içinde çözüldü. Bu çözelti asetat-sitrat tamponla 100 mililitreye tamamlandı.

3- Ehrlich Reaktifi: 15 gram p-dimetilaminobenzaldehid, n-propanol:perklorik asit (2:1 v/v) (66:33 ml) ile çözüldürüldü.

4- Standartlar: 13,1 mgr H.prolin, 20 ml 2 N NaOH içinde çözülerek 5 mikromolar standart elde edildi.

**Prosedür:**

1- 2 N NaOH içinde hazırlanmış standartlardan ve örneklerden 50'ser mikrolitre alınarak tüplere konuldu, 100 derecede suyu buharlaştırıldı.

2- Tüm tüplere 100 mikrolitre 2 N NaOH eklendi, karıştırılıp, kapakları sıkıca kapatıldı ve hidroliz olması için 120 derecede 20 dakika etüve kaldırıldı.

3- Hidrolizatların üzerine 450 mikrolitre Kloramin-T ilave edilerek yavaşça karıştırıldı. Oda ısısında 25 dakika bekletilerek okside olması sağlandı.

4- Ehrlich reaktifinden 500 mikrolitre eklenerek 65 derecede 20 dakika inkübasyon ile kromofor oluşumu sağlandı.

5- Her bir örnek 550 nm dalga boyunda hava körüne karşı okundu.

16. gün sonunda ratların santral yaralarından standart şekilde dokuda hidroksiprolin ve histopatolojik incelemelerin yapılacağı örnekler alındı. Aynı şekilde santral ve kaudal yaralar arasındaki insizyon hattından 3x1 cm olacak şekilde gerim testinde kullanılacak olan doku örnekleri eksize edildi.



**Şekil 11. 16.** Gün sonunda çalışılacak doku örneklerinin alınmasının planlanması.

### **3.6. Histopatolojik İnceleme:**

Oluşturulan yaraların, yara kenarını ve yara zeminini içeren her gruba ait 3, 5, 8. ve 12. günlerdeki doku örnekleri %10'luk formalin solüsyonunda fikse edildikten sonra parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardaki örneklerden mikrotom ile 5- $\mu$ m kalınlıkta kesitler alındı ve her örnek Hematoksilen – eozin boyası ile boyandı. Hematoksilen - eozin ile boyalı kesitler ışık mikroskopunda histopatolojik olarak değerlendirildi. Histopatolojik incelemede her olgu; reepitelizasyon, ülserasyon, ekstrasellüler matriks oluşumu, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, anjiyogenez ve granülasyon dokusu ile örtülme süresi değerlendirilmesi içeren parametreler dikkate alınarak yorumlandı.

### **3.7. İstatistiksel Analiz**

Çalışmada istatistiksel değerlendirmeler için SPSS 20.0 programı kullanılmıştır. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistik yöntemleri ortalamalar şeklinde ifade edildi. Niceliksel verilerden normal dağılım gösteren değişkenlerin iki grup arası karşılaştırmalarında Student t test kullanıldı.  $p < 0.05$  değeri anlamlı kabul edildi.



## 4. BULGULAR:

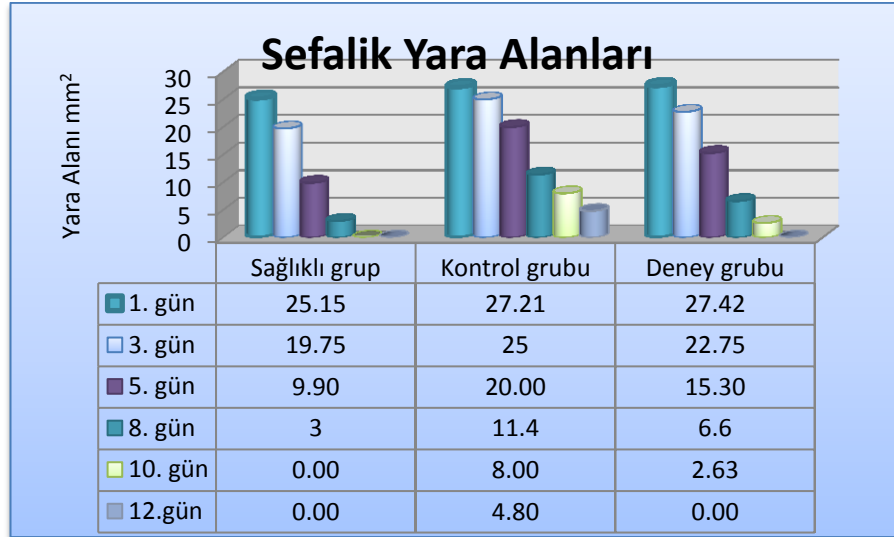
### 4.1. Yara Alanı Ölçümleri

İskeminin flep dolaşımında sefalik, santral ve kaudal bölgede farklı etkileri olabileceğini göz önüne alarak sağlıklı, kontrol ve deney gruplarının yara yüzey alanları 3 alt grupta incelenerek karşılaştırıldı.

#### 4.1.1. Sefalik Bölge Yara Alanları

Tüm gruplarda 1-3-5-8-10-12. gün sefalik yara ölçümleri normal dağılıyordu ( $p>0.05$ ). 1.gün alınan örneklerde sağlıklı grupta yara alanı ortalama  $25,15 \text{ mm}^2$ , kontrol grubunda  $27.21 \text{ mm}^2$  ve deney grubunda  $27,4 \text{ mm}^2$  olduğu gözlemlendi. 3.ve 5. gün deney grubundaki yaraların kontrol grubuna göre anlamlı oranda azaldığı gözlemlendi. Sağlıklı grupta ise küçülme her iki gruba göre daha fazlaydı.

Sağlıklı grupta 8. gün yaraların oldukça küçüldüğü ve 10. gün epitelize olduğu gözlemlendi. Deney grubunda 12. gün yaralar epitelize olurken, kontrol grubunda 12. günde ortalama  $4,8 \text{ mm}^2$  yaraların devam etmekte olduğu gözlemlendi (Tablo1).



**Tablo 1.** Sefalik bölge yara alanları.

**Tablo 2.** Kontrol ve deney grubunun sefalik yara alanlarının karşılaştırılması.

	Kontrol	Deney	p	t
<b>1.gün</b>	27,21	27,42	0,356	-0.956
<b>3.gün</b>	25	22,75	<0,001	6.594
<b>5.gün</b>	20,00	15,30	<0,001	10.875
<b>8.gün</b>	11,40	6,60	<0,001	10.791
<b>10.gün</b>	8,00	2,63	<0,001	18.180
<b>12.gün</b>	4,80	0,00	<0,001	16.327

1.günde kontrol ve deney grubunun sefalik yara alanları arasında fark yoktu ( $p=0.356$ ). 3-5-8-10 ve 12. günlerin tümünde deney grubundaki sefalik yara alanları kontrol grubundakilere göre anlamlı olarak daha küçüktü ( $p<0.001$ ).

**Tablo 3.** Sağlıklı ve kontrol grubunun sefalik yara alanlarının karşılaştırılması.

	Sağlıklı	Kontrol	p	t
<b>1.gün</b>	25,15	27,21	<0,001	7.194
<b>3.gün</b>	19,75	24,96	<0,001	9.499
<b>5.gün</b>	9,90	20,00	<0,001	18.461
<b>8.gün</b>	3,00	11,40	<0,001	13.786
<b>10.gün</b>	0,00	8,00	<0,001	24.514
<b>12.gün</b>	0,00	4,80	<0,001	11.267

1-3-5-8-10 ve 12. günlerin tümünde sağlıklı gruptaki sefalik yara alanları kontrol grubundakilere göre anlamlı olarak daha küçüktü ( $p<0.001$ ).

**Tablo 4.** Sağlıklı ve deney grubunun sefalik yara alanlarının karşılaştırılması.

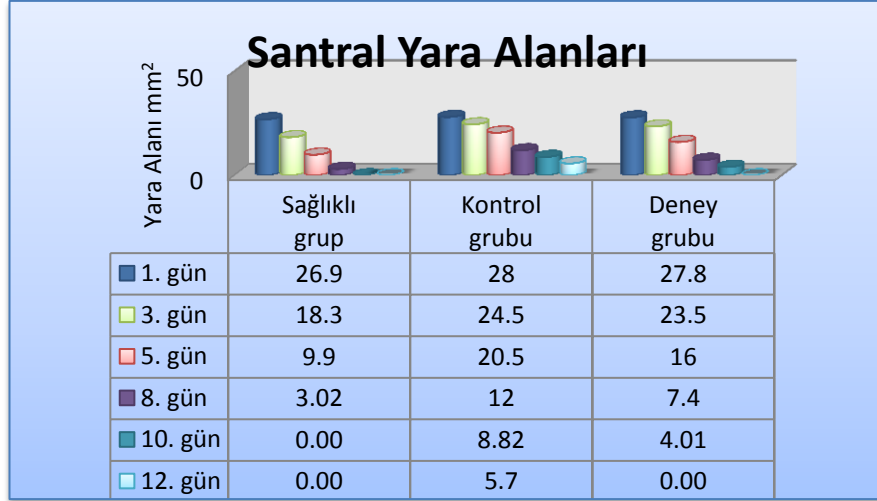
	Sağlıklı	Deney	p	t
<b>1.gün</b>	25,15	27,42	<0,001	6.884
<b>3.gün</b>	19,75	22,75	<0,001	6.371
<b>5.gün</b>	9,90	15,30	<0,001	15.584
<b>8.gün</b>	3,00	6,60	<0,001	15.825
<b>10.gün</b>	0,00	2,63	<0,001	9.456
<b>12.gün</b>	0,00	0,00	-	-

1-3-5-8 ve 10. günlerin tümünde deney grubundaki sefalik yara alanları kontrol grubundakilere göre anlamlı olarak daha küçüktü ( $p<0.001$ ). 12. günde her iki grupta da sefalik yaralar kapanmıştı.

#### **4.1.2. Santral Bölge Yara Alanları**

İskemiden kaudal ve safalik yaralara oranla, daha fazla etkilenmesi düşünülen santral bölge yara alanları ortalamaları kontrol ve deney gruplarında ölçüm günlerinde bir miktar fazla bulunmasına rağmen, istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. 1.gün ve 3. gün yapılan ölçümlerde kontrol ve deney grupları arasında anlamlı bir fark saptanmadı. 5. gün kontrol grubunda yaraların  $20 \text{ mm}^2$  olduğu, aynı dönemde deney grubunda  $15,3 \text{ mm}^2$  olan yara alanındaki azalmanın anlamlı olduğu bulundu.

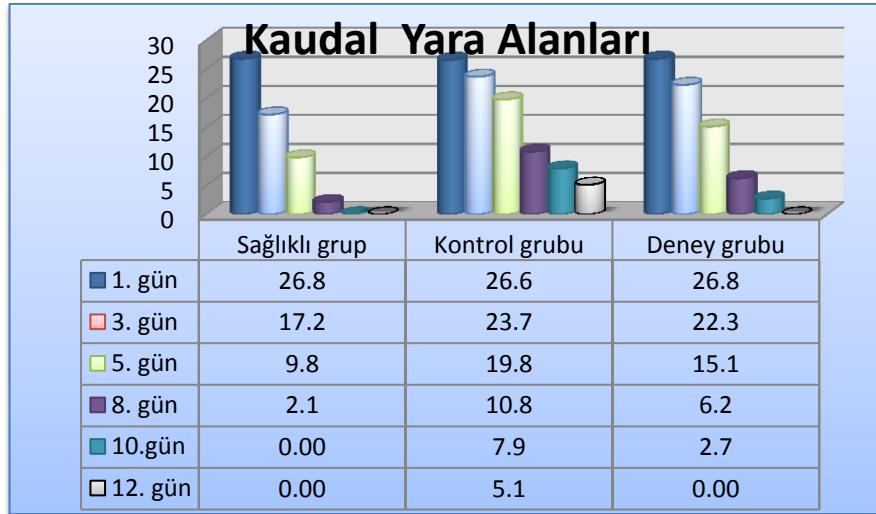
Gruplar kendi aralarında santral yara alanı yönünden incelendiğinde kaudal bölge sonuçlarına paralel sonuçlar çıktı. Sağlıklı grupta epitelizasyon 10.gün olurken deney grubunda 12.gün yaralar tamamen kapandı. Kontrol grubunda ise 12. günde yaranın tamamen kapanmadığı gözlenerek  $5,7 \text{ mm}^2$  lik bir iyileşmeyen alan ölçüldü.



**Tablo 5.** Santral bölge yara alanları.

#### 4.1.3. Kaudal Bölge Yara Alanları

Sefalik ve santral bölge alanlarına uyumlu ölçümler hesaplandı.

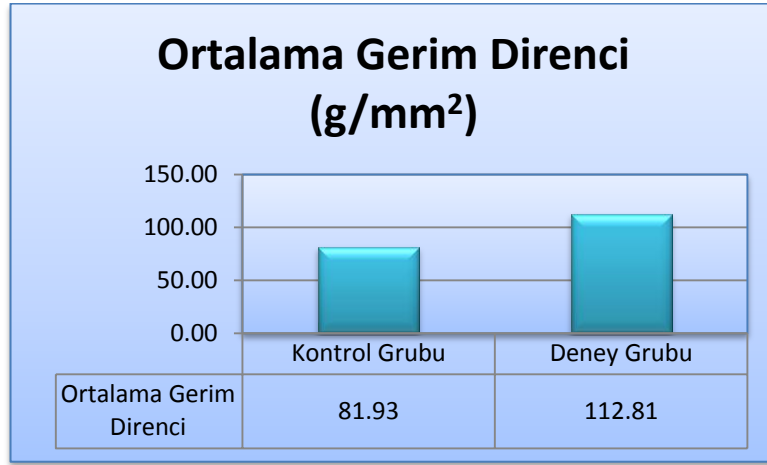


**Tablo 6.** Kaudal bölge yara alanları.

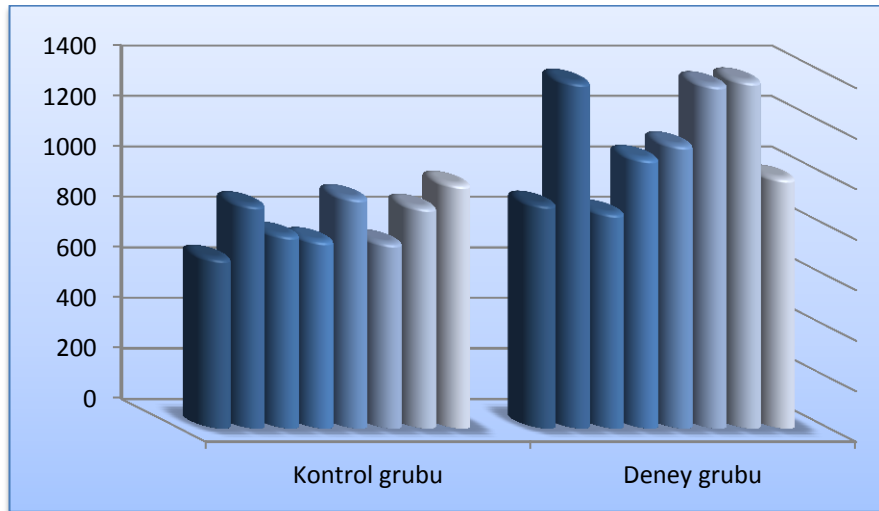
#### 4.2. Yara Gerim ve Kopma Kuvveti Sonuçları

3x1 cm'lik doku şeridinin ortasındaki insizyon hattının tam kopması sırasında bilgisayar yazılımından bulunan değer, gram cinsinden kopma kuvveti olarak değerlendirildi. Deney grubu ve kontrol grubuna ait sonuçlar tablo 8'de

gösterilmiştir. Kopma sırasındaki tepe değer, insizyonun ortasındaki deri kalınlığı değerinin, şerit eni ile çarpımına (kesit yüzey alanı) bölünerek birim alana düşen gerim direnci hesaplandı. Kontrol grubunda 81.93 g/mm<sup>2</sup>, deney grubunda ise 121,81 g/mm<sup>2</sup> 'dir. Ortalama gerim direnci deney grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha fazla idi (p=0.003, t=3.631) (Tablo 7).



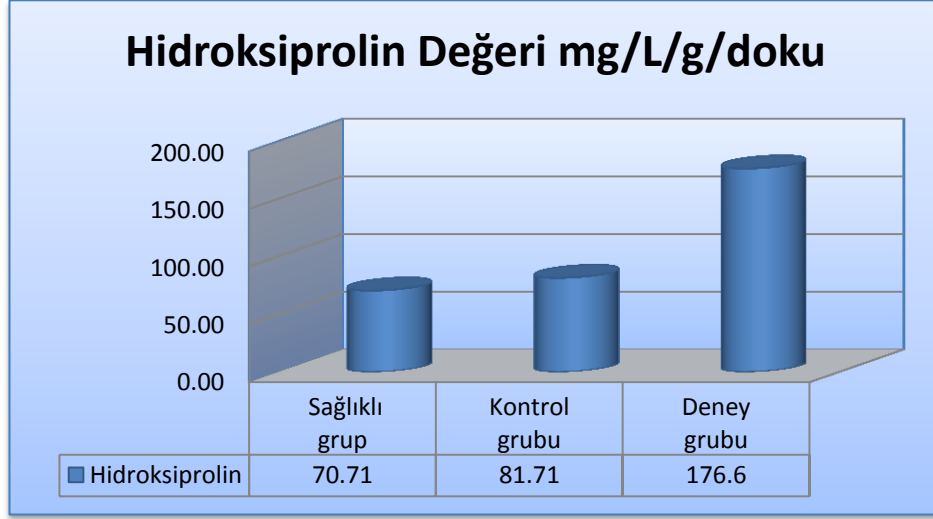
**Tablo 7.** Gerim direnci ölçümlerinin ortalama sonucu.



**Tablo 8.** Gruplar arasındaki kopma kuvveti değerlerinin göstergesi (gram).

### 4.3. Doku Hidroksiprolin Ölçümü Sonucu

12. gün sonunda alınan örneklerdeki değerler hesaplandığında; sağlıklı grupta hidroksiprolin değeri, 70.71 mg/L/g/doku, kontrol grubunda 81,71 mg/L/g/doku olarak ölçüldü. Deney grubunda ise hidroksiprolin değeri 176,6 mg/L/g/doku olarak ölçülmüştür. (Tablo 9).

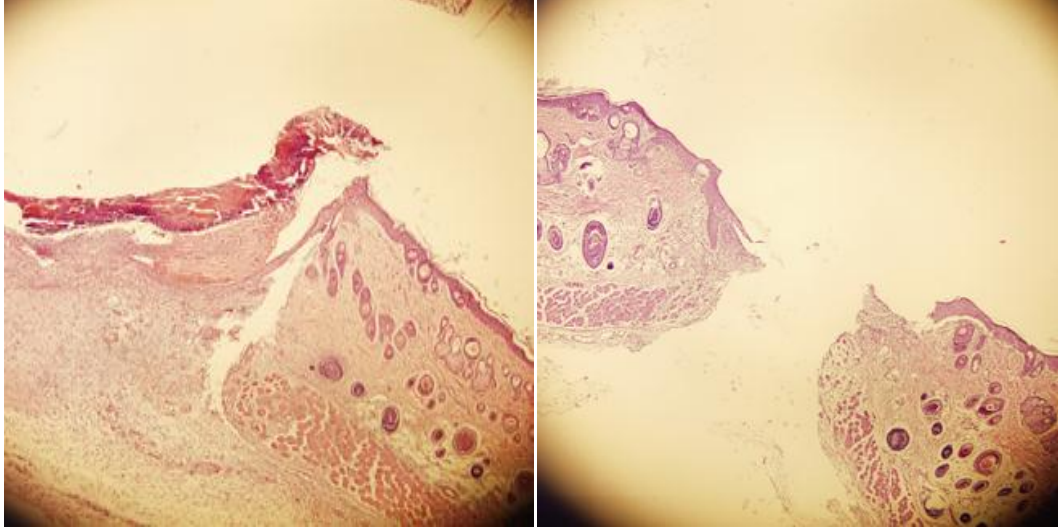


**Tablo 9.** Hidroksiprolin ölçüm sonuçları mg/L/g/doku.

Ortalama hidroksiprolin düzeyi deney grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha fazla idi ( $p=0.004$ ,  $t=3.437$ ). Aynı şekilde ortalama hidroksiprolin düzeyi deney grubunda sağlıklı gruba göre anlamlı olarak daha fazla idi ( $p=0.004$ ,  $t=3.722$ ). Kontrol grubu ile sağlıklı grubun hidroksiprolin değerleri arasında fark yoktu ( $p=0.715$ ,  $t=0.376$ ).

#### 4.4. Histopatoloji Bulguları

Yaralardan alınan kesitlerde, 3. Günde tüm gruplarda ülserasyon ve inflamatuvar hücre artışı gözlemlendi Şekil (12).



**a**

**b**

**Şekil 12.** 3.gün histopatolojik görünüm **a)** Sağlıklı grup. Ülser alanının kenarında başlamış olan reepitelizasyon. (HEx40) **b)** Deney grubu. Ülserasyon alanı (HEx100)

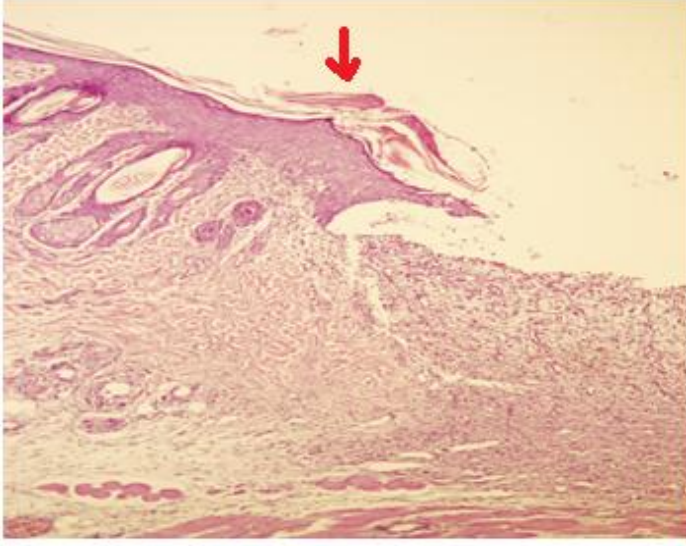
5. günde sağlıklı grupta azalmış inflamatuvar hücre ve belirgin ekstrasellüler matriks oluşumu mevcuttu (Şekil 13). Kontrol grubunda ise sağlıklı gruba oranla, artmış inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve daha az ekstrasellüler matriks mevcutken (Şekil 14), deney grubunda ise inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve yara dudağında reepitelizasyon başlangıcı gözlemlendi (Şekil 15).

Sağlıklı grupta 8. gün yara zemini granülasyon dokusu ile dolu iken düzenli bir reepitelizasyon varlığı gözlemlendi (Şekil 16). Deney grubunda inflamasyon oldukça azalmış ve yerini granülasyon dokusu doldurmuş olarak gözlemlendi (Şekil 17). Kontrol grubunda ise granülasyon dokusu gelişimi deney grubuna göre daha yavaştı. Reepitelizasyon devam etmekle birlikte daha düzensiz olarak gözlemlendi (Şekil 18).

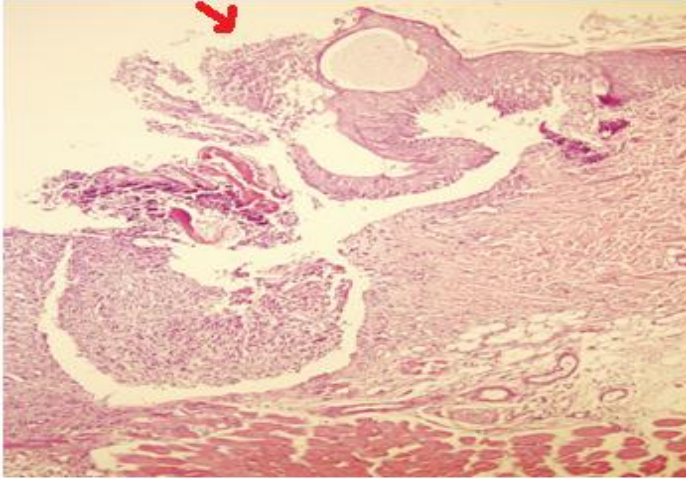
12. günde sağlıklı grupta epitelizasyon dzenli bir Şekilde tamamlanmıştı (Şekil 19). Kontrol grubunda hafif derecede inflamasyonla beraber granulasyon dokusu tarafından doldurulmuŐ durumdaydı. Reepitelizasyon dzensiz ve fragmente gdrnrimde izlendi. Santral ulserasyon devam etmekteydi (Şekil 20).

Deney grubunda yara alanında reepitelizasyon tamamen tamamlanmış ve granulasyon dokusu ile drtvlmüŐ durumdaydı. Yara zemininde fibröz doku ve yeni ekstrasellüler matriks hakimiyeti ile artmış neovaskularizasyon mevcuttu (Şekil 21).

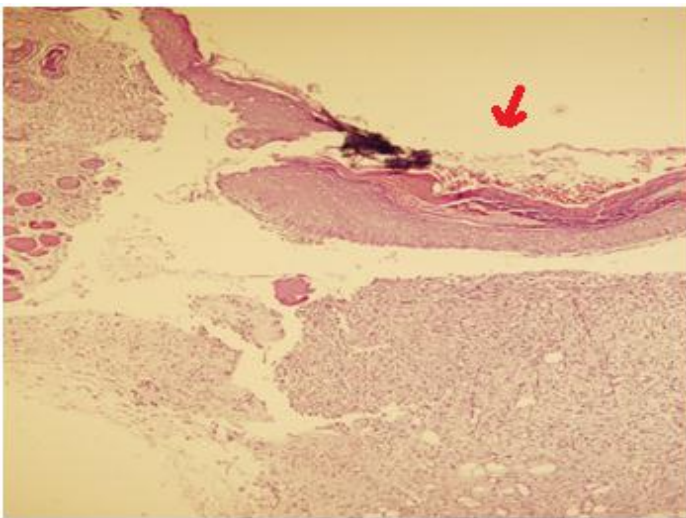




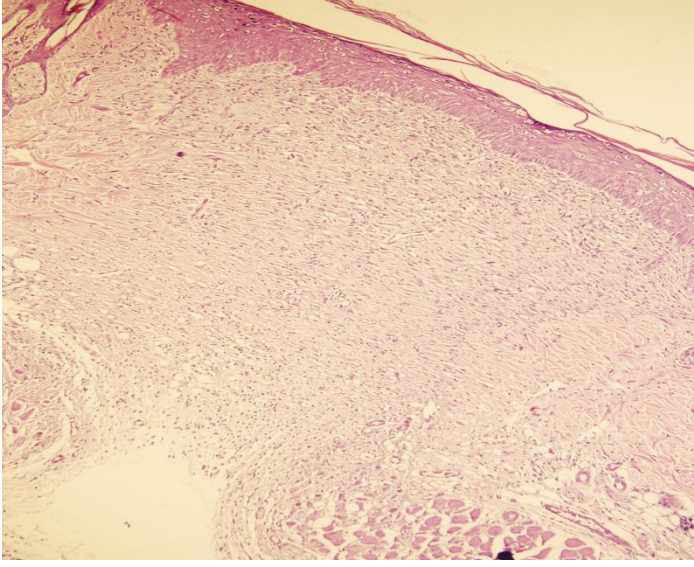
**Şekil 13.** Sağlıklı grupta 5. gün. Ülser alanın kenarında izlenmekte olan reepitelizasyon (HEx100)



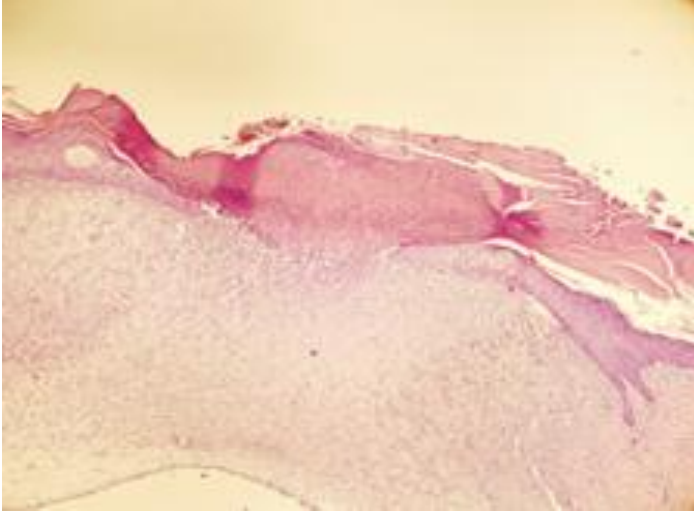
**Şekil 14.** Kontrol grubu 5. gün. Ülser kenarında başlamış olan reepitelizasyon. (HEx100)



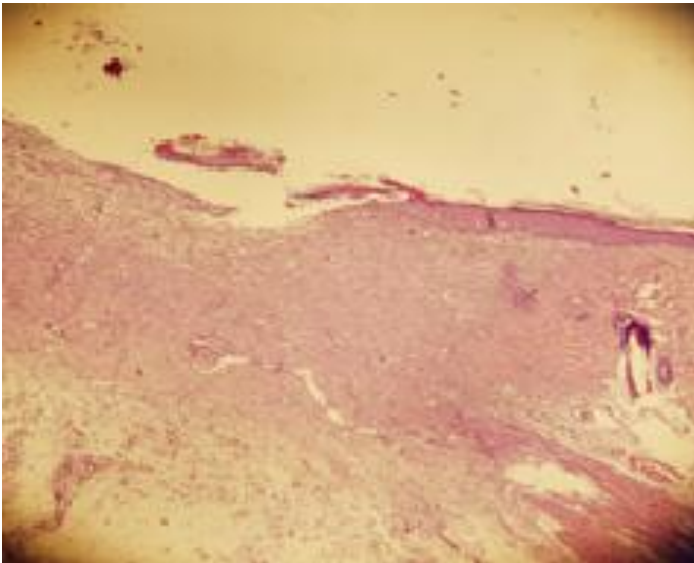
**Şekil 15.** Deney grubu 5.gün. Ülserasyon alanı üzerinde epitelizasyon ve keratinizasyon. (HEx100)



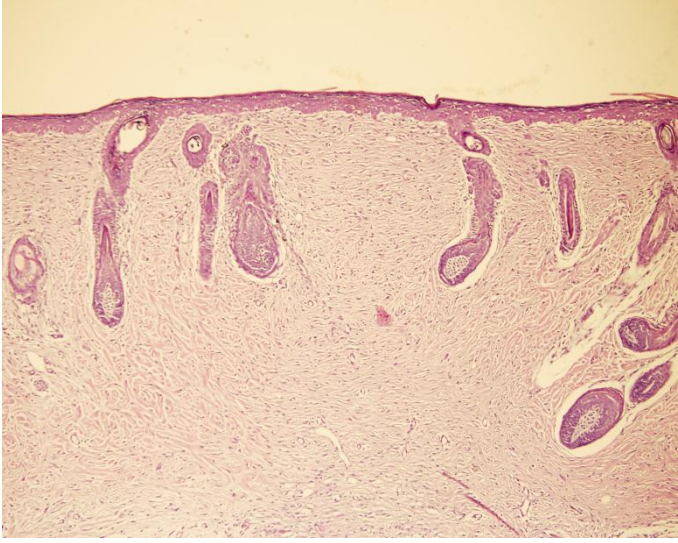
**Şekil 16.** Sağlıklı grup  
8. gün Tamamlanmış  
epitelizasyon ve epitel  
altı dokuda  
fibrozis.(HEx100)



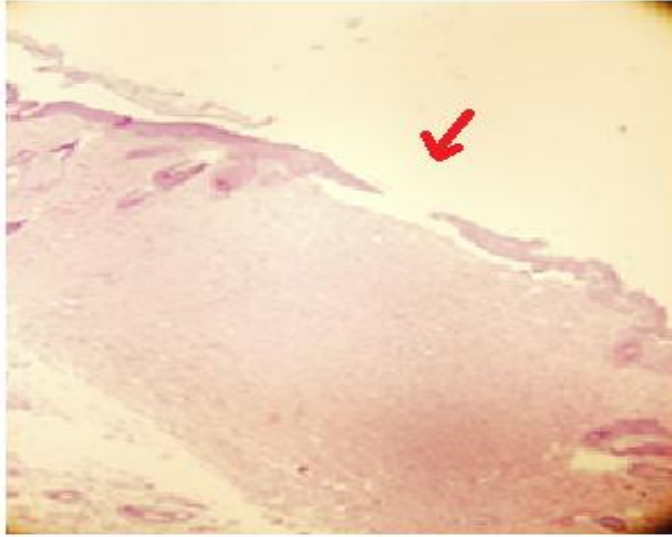
**Şekil 17.** Kontrol  
grubu 8. gün.  
Ülserasyon alanında  
tamamlanmamış  
reepitelizasyon.  
(HEx40)



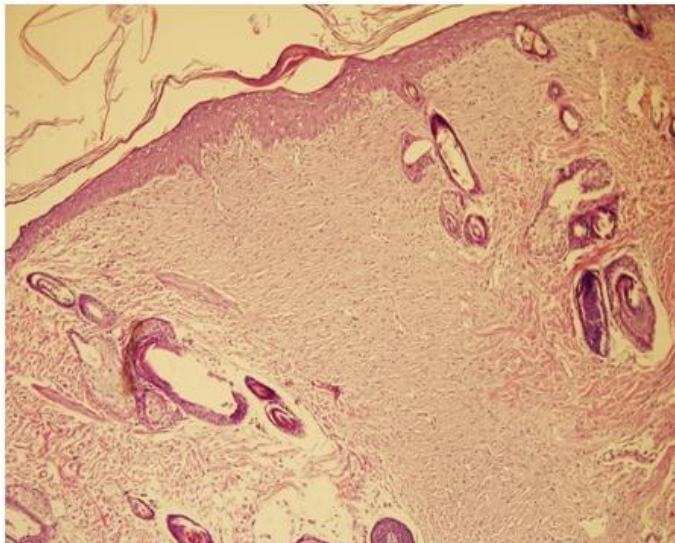
**Şekil 18.** Deney grubu  
8.gün. 5.günle benzer  
görünüm. (HE X40)



**Şekil 19.** Sağlıklı grup  
12. Gün tamamlanmış  
epitelizasyon 8. Güne  
göre azalmış fibrozis  
(HEx100)



**Şekil 20.** Kontrol  
grubu 12. gün. Ülser  
üzerinde tam olmayan  
reepitelizasyon ve  
epitel altında  
fibrozis.(HEx40)



**Şekil 21.** Deney grubu  
12.gün. Tam iyileşme  
gösteren deri dokusu.  
(HE x100)

## 5. TARTIŞMA

Travmatik bir doku hasarı sonucu, organizmanın bu hasarı onarmak için verdiği yanıt sonrası hasarlı dokunun yapı ve fonksiyonunun düzeltilmesi süreci yara iyileşmesini oluşturur. İyileşme süreci; yaralanma anından itibaren başlar, günler, aylar hatta yıllar sürebilen aktif dinamik bir süreçtir (1-4). Aslında iyileşme evreleri birbirinin içine geçmiş, karmaşık bir takım etkiler ile birbirini izleyen bir süreçtir (24). Yaralanmayı takiben, amacı devitalize dokuları uzaklaştırmak ve invaziv enfeksiyonun önüne geçmek olan inflamatuvar aşama başlangıçta yer alır. Bunun ardından, skar oluşumu ve doku rejenerasyonunun dengelenmesi sırasında ortaya çıkan bir proliferatif aşama gelir. Son olarak, yaranın yapısal bütünlüğünü ve dayanıklılığını maksimize etmek amacı olan, en uzun ve en az anlaşılmış aşaması olan yeniden şekillendirme ortaya çıkar.

Yaralar tiplerine ve etiyolojilerine göre akut ya da kronik olarak ikiye ayrılır. Farklı kaynaklarda ayrı yorumlanmasına rağmen, genellikle akut yara son 3 ila 4 hafta içinde oluşmuş bir yarayı tariflerken, eğer yara 4 ila 6 haftadan fazla iyileşmeden kalırsa kronik yara olarak değerlendirilir. Bu terim aylar ya da yıllardır var olan yaraları da kapsar. Ek olarak kronik yara ‘iyileşmeyen veya iyileşmesi gecikmiş ya da “granüle olan yaralar” olarak da adlandırılırlar.

Gecikmiş yara iyileşmesi, keratinositlerde proliferasyon ve migrasyonda yetersizlik, ekstrasellüler matrikste yetersiz kollajen depolanması ve matriksin yeniden şekillenmesinde ortaya çıkan düzensizlik ile birlikte kontraksiyon yetersizliği ile gözlenir (63,64). Rat iskemik yara modelinde de tartıştığımız gibi Rees ve ark. iskemik yarada gözlenen gecikmiş yara iyileşmesi, azalmış protein sentezi, artmış lökosit migrasyonu, artmış anjiojenik aktivite ve uygun olmayan ekstrasellüler matriks oluşumuna neden olarak inflamasyonun uzaması sürecinin, benzer şekilde iskemik yara modelinde de meydana geldiğini savunmaktadırlar (42). Bu bilgiler ışığında iskemik yara modeli için rat dorsal flebini kullanmayı uygun bulduk.

Tariflenen yara modelinde bipediküllü fleplerin elevasyonundan sonra en yüksek oksidan stresin geliştiğini gösterdikleri 4. gün punchlarla 4mm’lik yaralar oluşturmuşlardır. 8. gün bipedikül kaldırılmadan yaraların oluşturulduğu grupta

yaralar epitelize olurken, kontrol grubunda 12. günde epitelizasyon olmuştur (44). Biz punchları 4mm'lik yaraların 8. günde epitelize olacağı öngörüsü ile gerim kuvveti ve hidrokspirolin değerleri ölçümü için de daha anlamlı bir zaman dilimine kadar çalışma süremizi uzatmak için, Kopal'ın çalışmasında olduğu şekilde (45) yaraları 6 mm olarak planladık ve bulgularımızın literatür ile uyumlu olduğu gözlemlendi.

Sağlıklı erişkinlerde endojen arginin sentez düzeyi yeterli olduğundan arginin esansiyel bir amino asit değildir. Ancak katabolik stres durumlarında, çocukluk ve hamilelik döneminde ve ince bağırsak veya böbrek disfonksiyonlarında endojen arginin sentezi metabolik ihtiyaçları karşılayamaz ve arginin esansiyel hale gelir. Bu nedenle arginin “duruma göre esansiyel” olarak tanımlanmaktadır (21,22). Arginin, hücrede önemli roller oynayan temel amino asitlerden birisidir. Vücutta çeşitli proteinlerin yapısında yer almasının yanı sıra, üre, nitrik oksit (NO), poliaminler, agmatin ve kreatin fosfat gibi azotlu bileşiklerin sentezinde, lenfositlere cevapta ve mitogeneizde yararlı olduğu bildirilmiştir (23). Büyüme hormonu, prolaktin, insülin benzeri büyüme faktörü uyarımı gibi biyolojik etkileri de vardır (26).

Deneyi planlanma döneminde verilecek doz ve verilme şekli literatür bilgileri ışığında düzenlendi. Oral veya intravenöz yolla L-Arginin alımında, farklı miktarların, farklı zamanlarda plazmada maksimum değere ulaştığı gözlemlenmiş ve bu amaçla L-Arginin'in farmakolojisi ve farmakokinetiği üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Bode-Böger ve ark. İntravenöz ve oral yolla L-Arginin uygulayarak, L-Arginin'in farmakokinetik-farmakodinamik ilişkisini ve vazodilatatör etkisini incelemişlerdir. Sağlıklı 8 erkek bireye intravenöz yolla 6g ve 30g, ayrıca oral yolla 6g L-Arginin uygulamışlardır. İntravenöz yolla verilmesi ile plazmada en yüksek seviyesine 20-30 dk. içinde ulaşmaktadır. Oral yolla 6g uygulanma sonrasında ise plazmada en yüksek değere 90 dk. sonra ulaşmaktadır. L-Arginin'in başlangıç plazma değeri 0.8 mM/L olarak ölçülmüştür. İntravenöz 6g uygulama sonrası en yüksek plazma değeri 4.8 mM/L'a ve 30 g ile 8,0 Mm/L'e yükseldiği belirtilmiştir (46).

Arginin suplementasyonun denekler tarafından iyi tolere edildiği gözlemlendi. L-Arginin intravenoz veya oral yolla uygulanırken bir takım yan etkilerinin bulunduğu

görülmüştür (50,53,55,58). Günlük 30 gr. tolere edilebilir, çok nadiren kramp ve diyareyi de içeren gastrointestinal sistem yan etkileri karşımıza çıkmaktadır. %10'luk çözeltisi gibi yüksek doz intravenöz kullanımında aşırı sıvı yüklenmesine, böylece lokal doku yaralanmalarına ve nekroza neden olabilir (49). Hiçbir çalışmada ciddi bir yan etkiye rastlanmamıştır (47,48). Bizim çalışmamızda da deneklerde sıvı alımında azalma ya da diyare gibi yan etkilere rastlanmamıştır.

Evans ve ark. L-Arginin'in optimal yükleme dozunu belirlemek ve artan dozlara karşı değişen tepkilerini ölçmek amacı ile sağlıklı bireyler üzerinde 1 hafta süreyle bir çalışma yapmışlardır. 3g, 9g, 21g ve 30g/gün dozda yükleme yapılmış ve her haftanın başında ve sonunda üre ve kan açlık değerleri toplanmış, vücut ağırlıkları, diastolik kan basınçları ve sistolik kan basınçları kaydedilmiştir. 20 deneğin 10 tanesinde 21g ve 30g verilmesi durumunda hafif gastrointestinal yan etkiler görülmüştür. Yükleme sonunda kan basınçlarında ve vücut ağırlıklarında bir değişim olmamıştır. Biyokimyasal ölçümlerde sadece L-Arginin, glisin ve L-Ornitin konsantrasyonlarında anlamlı değişimler görülmüştür. En iyi L-Arginin konsantrasyonu artışı 9 g yükleme ile gözlenmiş, ancak bireysel bazda değişik tepkiler olduğu da raporlanmıştır (50).

Akut miyokard infarktüsü olan 792 hastalık vazodilatasyon üzerine olumlu etkilerinin gösterildiği geniş bir seride, 30 gün süreyle 9g/gün dozunda uygulama sonrası gastrointestinal sistem şikayetleri çok az bir oranda rapor edilmiştir (56). Hiperkolestrolemsisi olan 27 hastaya 4 hafta süresince 21g/gün verilerek endotel dilatasyonu üzerine etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada da ciddi bir yan etki gözlenmemiştir (57).

İnsanlar üzerinde yapılan klinik çalışmalarda, yayımlanmış en yüksek doz 42 g/gündür. 6 hafta süre ile kistik fibrozlu hastalar üzerinde çalışılmıştır (51). Yayımlanmış en uzun kullanım süresi 3 yıldır. Böbrek trasplantasyonu yapılmış hastalar üzerinde 9 g/gün şeklinde uygulanmıştır (52). Tsubuku 13 hafta süreyle %1,25, %2,5 ve %5 oral L-Arginin diyetiyle ciddi bir yan etki saptamamıştır.(53)

Hayvan çalışmalarında 2g/kg/gün dozunun tolere edilebildiğine dair çalışmalar vardır. Ratlarda toksik doz miktarı 16g/kg olarak bildirilmiştir (54).

Komorowska ve ark. ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada 8x8 cm'lik sağ proksimal epigastrik arter bazlı flep eleve etmiş, 8 gün boyunca %6'lık L-arginine solüsyonunu oral yoldan vermiş, flep distal uçtaki nekroz oranları karşılaştırmışlardır. Flep distal uçta L-Arginine alan grupta nekroz oluşumunda anlamlı bir azalma gösterilmiştir. Ancak günlük içilen sıvı göz önüne alındığında, rat başına alınan L-Arginin miktarı ortalama 5.42g/gün dozunda olduğu hesaplanmıştır. Bu miktar 70kg'lık bir insan için günde 350 gram alıma denk gelmektedir ve insan için tolere edilebilme sınırından çok yüksek bir dozdur (55).

Barbosa ve ark. yaptıkları çalışmada, içme suyuna 1.25g/l dozunda L-arginin eklenmesi ile 4 haftalık tedavi sonrası, ratların günde ortalama 27- 30 ml sıvı içtiklerini gözlemlemişler. Bu doz rat başına 35mg Arg/gün olarak hesaplanmıştır. Bu dozda büyüme hormonu düzeyini artırdığı ve insülin direncini düşürdüğü gözlenmiştir (58).

İnsanlar için 500mg/kg ve üzerindeki dozlarda gastrointestinal şikayetlerin olması nedeniyle bu doz üzerine çıkmamaya özen gösterdik. Literatür incelemeleri sonrasında 200-300g'lık bir ratın günde ortalama içmesini beklediğimiz su miktarı 25-30 ml kadardır. Çalışmamızda da günlük sıvı alımı ölçümü takip edildiğinde 28-35 ml arası olduğu gözlenmiştir. İntraperitoneal ve yükleme dozunda ya da infüzyon şeklinde verilme şekilleri daha sık uygulanmasına rağmen, daha uzun bir dönemde takip yapılması planlandığı, aynı zamanda klinikte de kullanımla korele olması öngörüldüğü ve invaziv olmadığı için oral yol tercih edildi. Doz olarak da %2'lik L-Arginin ratların kilo ve günlük alımları hesaplandığında, en ideal doz olarak saptandı.

Malnütrisyona bağlı protein alımındaki yetersizlik organizmada gerilim kuvvetinde azalma, T-hücre fonksiyonlarında bozulma ve yaranın enfeksiyonlara karşı direncinde düşme ile karakterizedir (76).

Yara kontraksiyonu iyileşme sürecinde fibroblastlar ve miyofibroblastların aktin filamentlerinden zengin kontraktıl elementlerinin ortaya çıkmasıyla yara kenarlarının merkeze doğru hareketiyle başlayan önemli bir özelliktir. İlerleyici kontraksiyon yara boyutunu küçültür, ilerleyen epidermis sonuçta granülasyon dokusunu tamamen

örter. Yara yüzeyinin örtülmesinin tamamlanmasını takiben epidermis keratinize olmaya başlar. Sekonder iyileşmede miyofibroblastlar anahtar rol oynarlar. miyofibroblastlar 3. günden sonra belirgin hale gelirler ve özellikle 10-21. günler arası aktiviteleri en üst düzeydedir. Rat bipediküllü dorsal flepler üzerinde oluşturulan yaralar, sağlıklı bireylere göre daha geç iyileşmektedir. Bizim çalışmamızda da bipediküllü flep kaldırılmayan sağlıklı grupta 10. günde epitelizasyonun tamamlandığı, histopatolojik ve makroskopik olarak gösterilmiştir. Oluşturmak istediğimiz iskemik ortamda, yani kontrol grubunda 12. günde histopatolojik olarak ülserasyonun devam ettiği ve yara alanı ölçümlerinde halen anlamlı oranda kapanmayan yaranın olduğu gösterilmiştir. Aynı koşullara maruz kalan deney grubunda L-Arginin desteği ile 12. günde epitelizasyonun tam anlamıyla tamamlandığını görmekteyiz. Bu iskemik olmayan sağlıklı gruba yakın bir iyileşmeyi göstermektedir.

İnsanda fibroblastik cevabı göstermeye yönelik bir mikromodel geliştirilmiştir. Subkutan olarak yerleştirilen 5-7 cm'lik politetrafloretilen tüp analiz için kullanılmıştır. Bu model kullanılarak yapılan bir çalışmada, Kirk ve ark. 65 yaş üzeri gönüllü, sağlıklı 30 kişi üzerinde 2 hafta süresince subkutanöz kateter yerleştirilmesi ardından grubun yarısına, 17g/gün arginini oral olarak vermişler. 2x2 cm'lik kısmi kalınlıkta deri grefti olarak yara oluşturmuşlar. Plasebo grubu ile karşılaştırıldığında kateter içeriğindeki hidroksiprolin seviyesinin ve insülin benzeri büyüme faktörünün düzeyinin artmış olduğunu rapor etmişler (59). Benzer bir çalışma Barbul ve ark. tarafından yapılmış, 36 sağlıklı gönüllüye 2 hafta süreyle 24.8g arginine aspartat verilerek deltoid bölgeye yerleştirilmiş subkutan kateter ölçümlerinde hidroksiprolin artışı anlamlı bulunmuştur (60).

Yara iyileşmesinde, yara kenarından köken olarak yaraya göç eden fibroblastlar kollajen üretiminden primer olarak sorumlu hücrelerdir (17) ve yaralanmadan sonraki 3. günde yarada kollajene rastlanır (18). Kollajenin yapısında % 35 oranında glisin, % 11 oranında ise alanin bulunmaktadır. Kollajen diğer proteinlerden farklı olarak % 12 oranında prolin ve % 9 oranında ise hidroksiprolin içermektedir (13). Özellikle hidroksiprolin kollajenin üçlü heliks yapısının stabilizasyonunda önemlidir. 5 ila 7. günlerde daha fazla olmak üzere, 3 ila 4 hafta artış devam eder. Dört haftadan



sonra yavaş yavaş azalır ve sonunda kollajenazın neden olduğu yıkımı dengeleyen bir düzeye iner (19).

Hidroksiprolin kollajen sentezi hakkında bilgi veren güvenilir bir biyokimyasal veridir. Çalışmamızda da 12. gün sonunda epitelize olan yara zemininden alınan dokularda hidroksiprolin ölçümü yapılmıştır. Ortalama hidroksiprolin düzeyi deney grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha fazla idi ( $p=0.004$ ,  $t=3.437$ ). Aynı şekilde ortalama hidroksiprolin düzeyi deney grubunda sağlıklı gruba göre anlamlı olarak daha fazla idi ( $p=0.004$ ,  $t=3.722$ ). Kontrol grubu ile sağlıklı grubun hidroksiprolin değerleri arasında fark yoktu ( $p=0.715$ ,  $t=0.376$ ). Argininin kollajen sentezindeki artışa olumlu etkisini, hidroksiprolin yapısına katılan prolin amino asiti için substrat olmasıyla ilişkilendirmekteyiz.

Paget 1853 yılında yaptığı çalışma ile gerim kuvvetinin, yara iyileşmesi değerlendirilmesindeki rolünü tavşan tendon modeli üzerinde göstermiştir. 1929 yılında Howes'in ölçüm için sistematik bir teknik tanımlamasıyla çalışmalarda ölçüm kriteri olarak devreye girmiştir (6).

Yara gerim direnci, yarayı kopartmak için kesit alanının her birimine gerekli gücü ifade ederken, kopma kuvveti ise, yarayı kopartmak için gerekli kuvveti ifade eder. İnsize yaraların iyileşmesinde, rejenerasyon hızı ve kalitesi en iyi gerilim kuvvetinin ölçülmesiyle belirlenir. Yaranın kollajen içeriği ile koreledir ve en önemlisi klinik durumu tam yansıtır. Yara direnci, iyileşme esnasında ekstrasellüler ortamdan salgılanan hücresel ürünler arasındaki biyokimyasal etkileşim ile kazanılmaktadır. Kollajenin olgunlaşması ile yara gerim direnci artar. Kollajenin olgunlaşması 15. günde başlar ve 12 ay kadar sürer (20). Yara direncinin artması, kollajen fibrillerin çapraz bağlanmasından kaynaklanmaktadır. Kollajenin kovalent bağlarının artması ile gerim direncinde artış olur (17). Çalışmamızda literatür bilgileri doğrultusunda gerilim direnci ve gerilim kuvveti için insizyondan sonraki 16. Günde ölçümleri yapmayı planladık. Çalışmamızda deney grubundaki gerim direncinin, kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığını saptadık. Bu bulgumuz da L-Arginin'in prolin üzerinden kollajen metabolizmasına olan olumlu etkilerini desteklemektedir.

Erçöçen ve ark. yaptığı bir çalışmada, 60 dk süre ile intravenöz arginine ve iloprost (prostasiklin PGI2 analogu ) infüzyonu verilerek 9x3 cm'lik random paternli cilt flebinin yaşayabilirliğini floresan boyama ile test etmişler. L-arginine ve iloprost kombinasyonu verilen ratlarda distal flep nekrozunda anlamlı azalma olduğu saptanmış. Nekrozdaki azalmanın nedeni olarak iki ajanın kombinasyonunun vazodilatasyon üzerine olan etkisi savunulmuştur (61).

Yara iyileşmesini engelleyen fizyopatolojik durumlar incelendiğinde, enfeksiyon, iskemi, anormal büyüme faktörü seviyeleri, metalloproteinaz ve doku metalloproteinaz inhibitörleri arasındaki dengesizlik (MMP/TIMP), anormal keratinosit migrasyonu ve iskemi-reperfüzyon göze çarpmaktadır. Yapılan çalışmalarda iskeminin yara iyileşmesini olumsuz olarak etkilediği, reaktif oksijen radikallerinin oluşumuyla oksidatif stres meydana getirdiği gösterilmiştir.

Meldrum ve ark. İskemi reperfüzyon hasarı üzerinde nitrik oksitin etkilerini araştırdıkları çalışmalarında ratlarda rektus femoris kas perforatörünü 4 saat süresince klempledikten sonra bir gruba plasebo, ikinci gruba bir nitrik oksit sentaz inhibitörü (L-NAME) ve diğer gruba da arginin infüzyonu verip, 24 saat sonra kastaki nekrozu değerlendirmişler. Arginin verilen grupta kontrol ve nitrik oksit sentez inhibitörüne oranla kas nekrozunun anlamlı olarak daha az olduğunu bildirmişlerdir (66). İskemi reperfüzyon hasarına nitrik oksitin etkilerinin değerlendirildiği diğer çalışmalarda, nitrik oksitin trombosit agerasyonu ve adezyonunu azalttığı (67), nötrofillerin endotelial adezyonunu önlediği (67), süperoksit anyon üzerine inhibe edici özelliklerinin olduğu (68) ve damar kontraksiyonunu azalttığı (69) rapor edilmiştir.

Tavşanlar üzerinde yapılan çalışmada, 150 mg/kg dozunda intravenöz olarak iskemiden 20 dk önce verilen L-Argininin renal arter klemplesini takip eden 2 saat sonraki reperfüzyon ölçümleri ile tubular ve glomerular fonksiyonları koruduğu rapor edilmiştir (65).

11 araştırmalık meta-analiz sonucu; 2 ila 24 hafta arası, ortalama 4 hafta kullanım süresiyle, 4 ila 24 g/gün ortalama 9g/gün dozunda uygulanan L-argininin hem sistolik hem de diastolik basıncı düşürmede etkili olduğu gösterilmiştir (70).

Nitrik Oksitin yara iyileşmesinde olumlu etkilerinin başında, güçlü bir vazodilatatör olması gelmektedir. Aynı zamanda lökosit adezyonunun azaltır. Mast hücrelerinin aktivasyonunu inhibe ederek, anti-inflamatuvar etki gösterir. Oksidatif stres koşullarında serbest radikalleri temizler (37). İskemi reperfüzyon hasarının önlenmesinde olduğu gibi nitrik oksit hücrel hasarı azaltmaktadır. Nitrik oksit sentazın inhibe edildiği flep nekrozu araştırmalarında da nitrik oksit miktarının düşmesi ile nekrozun arttığı gösterilmesi NO'nun yara iyileşmesine olan olumlu etkilerini kanıtlamaktadır (66). L-Arginin nitrik oksitin için tek substrattır. Bu da argininin NO üzerinden yara iyileşmesine olan katkılarını göstermektedir.

20 kronik (11 enfekte 9 enfekte değil) ve 10 akut yarası olan hastanın, yara sıvısında ve plazmadaki nitrit/nitrat oranı, aminoasit miktarı ve arginaz düzeyi ölçülmüş. Enfekte yaralarda arginin değerinin enfekte olmayan yaralara oranla daha fazla düştüğü, bu durumun kronik enfekte yaraların, arginaz ile olan metabolizasyon yolağında bozulmaya neden olabileceğini öne sürmüşlerdir (62).

8 hastada yapılan çalışmada 5g, 9g ve 13g L-arginin oral yoldan verilmesi ardından 30 dk sonra Büyüme hormonu seviyesinin yükselmeye başladığı ve 60 dk sonra maksimum düzeye ulaşabildiği rapor edilmiştir. 5 ve 9 gramlık dozlarda Büyüme hormonunda anlamlı yükselme olmakla birlikte 13g da gastrointestinal şikayetler bildirilmiştir (71).

Hipofizektomi yapılan ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada, bir gruba büyüme hormonu diğer gruba plasebo verilmesi ardından bu gruplar 2 alt gruba daha ayrılarak yarısına 1%'lik arginine verilerek yapılan insizyon yaralarının gerim kuvveti ve kollajen miktarı ölçülmüş. Büyüme hormonu verilip verilmemesinden bağımsız olarak hipofizektomili deneklerde argininin hiçbir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Bu sonuca göre ratlarda argininin etkisini gösterebilmesi için normal bir hipotalamo hipofzier aksın olması gerektiğini savunmuşlardır (73).

Poliaminler (putresin, spermidin ve spermin) proliferatif etkilere sahip, hücre büyümesi, inflamasyonun düzenlenmesi ve homeostazis için gerekli olan küçük katyonik moleküllerdir. Ekstrasellüler matriks tamiri, hücre adezyonu ve sinyal

iletim süreçlerinde de görevleri vardır. Poliamin eksikliği hücre proliferasyonunu ve hücre göçünü baskılar veya kusurlu embriyo gelişimine neden olur. Poliaminlerin fazla birikimi apoptozis ve hücre transformasyonuna neden olur. Poliamin biyosentez yolu hücrenin organik katyonlarının üretiminden sorumludur. Poliaminler yara iyileşmesi sürecinin belirteçleridir (31). Arginin poliamin sentezinde de substrat görevi üstlenerek poliaminlerin yara iyileşmesi üzerine olumlu etkilerinde rol alır.

Arginin metabolizması ile ilgili az da olsa negatif görüş bildiren yayınlar da vardır. Debats, 30g/gün dozda 5 gün boyunca infüzyon şeklinde uygulama sonrası 16 denek hasta ve 9 plasebo hastanın greft donör sahasını incelendiğinde, anjiogenez ve reepitelizasyon açısından bir fark izlenmediğini rapor etmiştir (72).

Histopatolojik değerlendirilmeler yara iyileşmesi çalışmalarında önemli bir parametre olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Biz de inflamasyonla proliferasyon aşamalarının iç içe geçtiği 3. gün ilk örnekleri aldık. 5. günde proliferasyon aşamasındaki değişiklikleri gözlemlemek, keratinosit göçü, anjiyogenez, ekstrasellüler matriks miktarı hakkında karşılaştırma yapabilmek için örnekler aldık. Literatür bilgilerine göre sağlıklı grupta epitelizasyonun tamamlanmasının planlandığı 8. gün de tüm gruplardan örnek alınmasını uygun gördük. Deney grubunda tam iyileşmenin olduğu 12. Gün son örnekler alındı.

Çalışmamızda 3. günde tüm gruplarda inflamatuvar hücre artışı ve ülserasyon bulguları birbirine yakın sonuçlar vermektedir. 5. günde sağlıklı grupta azalmış inflamatuvar hücre ve belirgin ekstrasellüler matriks oluşumu mevcuttu. Kontrol grubunda ise sağlıklı gruba oranla, artmış inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve daha az ekstrasellüler matriks mevcutken, deney grubunda ise inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve yara dudağında reepitelizasyon başladığı gözlemlendi.

Sağlıklı grupta 8. gün yara zemini granülasyon dokusu ile dolu iken düzenli bir reepitelizasyon varlığına karşın deney grubunda inflamasyon oldukça azalmış ve yerini granülasyon dokusu doldurmuş olarak gözlemlendi. Kontrol grubunda ise granülasyon dokusu gelişimi deney grubuna göre daha yavaştı. Reepitelizasyon devam etmekle birlikte daha düzensiz olarak gözlemlendi.

12. günde sağlıklı grupta epitelizasyon dzenli bir Şekilde tamamlanmıştı. Kontrol grubunda yara hafif derecede inflamasyonla beraber granulasyon dokusu tarafından doldurulmuŐ durumda ve reepitelizasyon dzensiz ve fragmante g6r6n6mde izlendi. Santral 6lserasyon devam etmekteydi. Deney grubunda yara alanında reepitelizasyon tamamen tamamlanmış ve granulasyon dokusu ile 6rt6lm6Ő durumdaydı. Yara zemininde fibr6z doku ve yeni ekstrasell6ler matriks hakimiyeti ile artmış neovaskularizasyon izlendi.

12. günde kontrol grubunda 6lserasyonun devam etmesi deney grubunda ise tam olarak iyileşmenin tamamlanmış olması L-Arginin verilmesinin yara iyileşmesi 6zerine olumlu etkisini desteklemektedir.

## SONUÇ

Sonuç olarak, elde ettiğimiz makroskopik, histopatolojik, biyomekanik ve biyokimyasal inceleme sonuçları L-Arginin alan grupta, kontrol grubuna göre yara iyileşmesini anlamlı şekilde artırdığını göstermektedir. Argininin yara iyileşmesini artırmadaki olası etkilerini özetlemek gerekirse;

Arginin kollajen yapısında bulunan prolin için substrat görevi görmektedir. Kollajen sentezini prolin üzerinden artırmaktadır (4,26,73,74).

Büyüme hormonu benzeri etkileri vardır. Plazmada İnsülin benzeri büyüme hormonu seviyesini artırmaktadır (58,59).

T lenfositler normal yara iyileşmesinde önemli rol oynar. T lenfositlerin inhibitörler aracılığıyla (monoklonal antibody) fonksiyonunun bozulduğu durumlarda yara iyileşmesinde gecikme saptanmıştır (18). L-Argininin metabolizması makrofajlar ve T lenfositleri için çok önemlidir. Sitotoksik T hücre sayısını azaltarak, Th/CD8 oranını artırır. Makrofajlar enfeksiyonla NO salınımı ve peroksi nitrit oluşumu üzerinden savaştığı için, ciddi enfeksiyonlar ile mücadelede argininin önemli işlevleri vardır (74).

Arginin poliamin sentezinde de substrat görevi üstlenerek poliaminlerin yara iyileşmesi üzerine proliferatif etkilerinde, hücre büyümesi, inflamasyonun düzenlenmesi, homeostazis, ekstrasellüler matriks tamiri, hücre adezyonu ve sinyal iletim süreçlerindeki görevlerinde rol alır (28,31).

Argininden Nitrik Oksit (NO) sentezlenir. Nitrik oksit için tek substrattır. Nitrik oksit sentez (NOS) inhibitörleri verildiğinde yara iyileşmesi olumsuz yönde etkilenmektedir. Nitrik oksitin vazodilatasyon, anti oksidan, antiinflamatuvar etkileri yara iyileşmesine önemli katkı sağlamaktadır (4,24,26).

Çalışmamızın sonucunda, son dönemde literatürde yapılan çalışmaların büyük bir kısmını destekleyici sonuçlar elde edildi. Kronik iskemik bir yarada L-Arginin desteğinin yara iyileşmesini olumlu yönde etkilediği, klinik kullanımda ek bir destek tedavi olabileceği kanaatindeyiz.

## RAT İSKEMİK YARA MODELİNDE L-ARGİNİN TEDAVİSİNİN YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

### ÖZET

**Giriş:** Normal koşullarda yetişkinler için non-esansiyel olan Arginin, çocuklar ve gençler için esansiyel bir amino asittir. L-Arginin gereksinimi büyüme döneminde, travma ya da enfeksiyon durumunda artar. Bu bağlamda argininin “koşullara bağlı esansiyel bir amino asit” olarak değerlendirilmesi daha doğaldır. L-Argininin oral yoldan yara iyileşmesi üzerine olan etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla daha önce Rees ve ark. tariflediği “rat bipediküllü dorsal flebi” ile kronik bir yara ortamına benzer bir model hazırlanarak makroskopik, histopatolojik, biyomekanik ve biyokimyasal incelemeler yapılmıştır.

**Gereç ve Yöntemler:** Çalışmada, deney hayvanı olarak toplam 20 adet (186-213) gram ağırlığında dişi Sprague-Dawley cinsi rat kullanıldı. Sağlıklı grupta 4, kontrol ve deney grubunda 8'er adet olacak şekilde rastgele seçilen hayvanlardan 3 adet grup oluşturuldu. Kontrol ve deney grubunda rat dorsumunda 10x4 cm'lik bipediküllü flepler iskemik yara oluşturmak üzere, pannikulus karnosusu da içerecek şekilde eleve edildi. 4 gün sonra hazırlanmış flep üzerine 6 adet 6 mm'lik punchlarla tam kat yaralar oluşturuldu. Sağlıklı gruptaki ratların dorsalinde bipediküllü flep hazırlanmadan 4.günde diğer gruplarla beraber punchlarla yaralar oluşturuldu ve herhangi bir tedavi verilmedi. Kontrol grubunda bipediküllü flep oluşturulup, yaralar oluşturuldu ve herhangi bir tedavi verilmedi. Deney grubu bipediküllü flep oluşturulduktan sonra ve deney süresince %2'lik L-Arginin içme suyuna karıştırılarak oral yoldan verildi. Yara yüzey alanını değerlendirmek için 1,3,5,8,10 ve 12. günlerde flep alanlarının görüntüleri alındı. 16. gün insizyon hattından alınan örneklerin biyomekanik ölçümleri tensiometri cihazı ile yapıldı. Her üç gruptan da 12. gün sonunda santral yaralarından alınan dokuda hidroksiprolin ölçümü yapıldı. Oluşturulan yaraların, yara kenarını ve yara zeminini içeren her gruba ait 3, 5, 8. ve 12. günlerdeki doku örnekleri histopatolojik olarak incelendi.

**Bulgular:** 1.günde kontrol ve deney grubunun yara alanları arasında fark yoktu ( $p=0.356$ ). 3-5-8-10 ve 12. günlerin tümünde deney grubundaki sefalik santral ve

kaudal yara alanları kontrol grubundakilere göre anlamlı olarak daha küçüktü ( $p<0.001$ ). Ortalama gerim direnci kontrol grubunda  $81.93 \text{ g/mm}^2$ , deney grubunda ise  $121,81 \text{ g/mm}^2$  ölçüldü. Deney grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha fazla olduğu saptandı ( $p=0.003$ ,  $t=3.631$ ). 12. gün sonunda alınan örneklerdeki değerler hesaplandığında; sağlıklı grupta hidroksiprolin değeri,  $70.71 \text{ mg/L/g/doku}$ , kontrol grubunda  $81,71 \text{ mg/L/g/doku}$  olarak ölçüldü. Deney grubunda ise hidroksiprolin değeri  $176,6 \text{ mg/L/g/doku}$  olarak ölçülmüştür. Ortalama hidroksiprolin düzeyi deney grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha fazla idi ( $p=0.004$ ,  $t=3.437$ ). Aynı şekilde ortalama hidroksiprolin düzeyi deney grubunda sağlıklı gruba göre anlamlı olarak daha fazla idi ( $p=0.004$ ,  $t=3.722$ ). Kontrol grubu ile sağlıklı grubun hidroksiprolin değerleri arasında fark yoktu ( $p=0.715$ ,  $t=0.376$ ). Sağlıklı grupta 8. Günde tamamlanan reepitelizasyona karşılık deney grubunda 10. günde epitelizasyon düzenli bir şekilde tamamlanmıştı. 12. günde kontrol grubunda yaranın reepitelizasyonu düzensiz ve fragmente görünümde izlendi. Santral ülserasyon devam etmektedir.

**Sonuç:** Arginin kollajen yapısında bulunan prolin için substrat görevi görmektedir. Kollajen sentezini prolin üzerinden artırmaktadır. Büyüme hormonu benzeri etkileri vardır. Arginin poliamin sentezinde ve Nitrik Oksit sentezinde de substrat görevi görmektedir. Deney grubundaki yara iyileşmesindeki artışın bu yollar üzerinden olduğunu düşünmekteyiz. Literatürde yapılan çalışmaların büyük bir kısmını destekleyici sonuçlar elde ettik. Kronik iskemik bir yarada L-Arginin desteğinin yara iyileşmesini olumlu yönde etkilediği, klinik kullanımda ek bir destek tedavi olabileceği kanaatindeyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Yara iyileşmesi, L-Arginin, iskemi



## EVALUATION OF EFFECTS OF L-ARGININE ON WOUND HEALING IN RAT ISCHEMIC WOUND MODEL

### SUMMARY

**Introduction:** Under normal conditions arginine is a non-essential amino acid for adults, that is essential for children and adolescents. L-Arginine requirement increases, in case of trauma, infection or in growth. In this context, arginine is an "essential amino acid depending on the conditions " to be considered natural. Oral administration of L-Arginine in order to evaluate the effects on wound healing was studied in Rees et al. bipedicle rat dorsal flap definition, a similar model to the chronic wound environment, macroscopic, histological, biomechanical and biochemical investigations were carried out.

**Materials and Methods:** In this study, a total number of 20 test animals (186-213) grams female Sprague-Dawley rats were used. From the healthy group 4, from the control and the experimental group 8 rats were randomly selected to make 3 groups. In the control and the experimental groups 10x4 cm bipedicle flaps which includes panniculus carnosus were elevated on the dorsum of the rats to make ischemic wound model and four days after the flaps were designed 6 full-thickness 6 x 6 mm wounds were created with punches and no remedy was given. In healthy group without harvesting bipedicle flaps on the same fourth day similiar wounds were created on the dorsum without giving treatment. L-Arginin 2% mixed with drinking water was given to the experimental group by oral during the whole experiment. To evaluate the wound surface area in the 1,3,5,8,10 and 12<sup>th</sup> days the flaps photos were taken. In the 16th day, samples taken from the incision lines were evaluated by tensiometry to determine the biomechanical measurements. In each of the three group wounds tissue hydroxyproline content was measured at the end of the 12<sup>th</sup> day. Tissue samples which includes wound edges and grounds from each group were examined histopathologically in the 3, 5, 8 and 12<sup>th</sup> days.

**Findings:** There was no difference in scar areas between control and experimental group initially 1st day (p = 0356). 3-5-8-10 and 12 central cephalic and caudal wound areas in all of the days in the experimental group was significantly lower than

in the control group ( $p < 0.001$ ). Average tensile strength was  $81.93 \text{ g/mm}^2$  in the control group and was  $121.81 \text{ g/mm}^2$  in the experimental group. In the experimental group was significantly higher than the control group ( $p = 0.003$ ,  $t = 3.631$ ). At the end of the 12<sup>th</sup> day values were calculated from the samples of healthy group value of hydroxyproline,  $70.71 \text{ mg / L / g / tissue}$  in the control group,  $81.71 \text{ mg / L / g / tissue}$ , respectively. In the experimental group, hydroxyproline value was  $176.6 \text{ mg / L / g / tissue}$ . Average hydroxyproline levels were significantly higher in the experimental group than the control group ( $p = 0.004$ ,  $t = 3.437$ ). Likewise, the average hydroxyproline levels were significantly higher in the experimental group compared to healthy group ( $p = 0.004$ ,  $t = 3.722$ ). Hydroxyproline levels were not differ between the control group and the healthy group ( $p = 0.715$ ,  $t = 0.376$ ). In healthy group epithelialization was completed by day 8, in the experimental group completed in the 10 day. In the twelfth day, irregular and fragmented view of reepithelialization was observed in the control group wounds. Central ulceration was persisted.

**Conclusion:** Arginine serves as a substrate for proline in the structure of collagen. It increases collagen synthesis by effecting proline. Arginine has the Growth hormone-like effects. In the polyamine and Nitric Oxide synthesis arginine serves as a substrate. We suggest that these pathways increase the wound healing in the experimental group. Our results support a large part of the studies in the literature. In chronic ischemic wounds L-Arginine supplementation has a positive effect on wound healing, this treatment can make an additional support in clinical practice.

**Keywords:** Wound healing, L-Arginine, ischemia

## KAYNAKLAR

1. Witte M.B., Barbul A.; General principles of wound healing. Surg. Clin. North Am.1997; 77(3): 509-28.
2. Rees RS., Smith DJ., Adomson B.; Oxidant stress: The role of the glutathione redox cycle in skin preconditioning. J. Surg. Research 1995;58,395-400.
3. Kirsner RS., Eaglstein W. H.; The wound healing process. Dermatol Clin. 1993;1:629-640.
4. Jeremy Z. Williams MD, Barbul A; Nutrition and wound healing Surg. Clin. N. Am 83 (2003) 571-596.
5. Kaya E: Yara iyileşmesi. Genel Cerrahi. Ed: Bilgel H. Avrupa Tıp Kitapçılık. İstanbul 2007:169-191.
6. Ballantyne GH; Intestinal suturing. Review of experimental foundations for traditional doctrines. Dis. Colon Rectum 1983; 26:836-843.
7. Orgill D, Demling RH.; Current concepts and approaches to wound healing. Crit Care Med. 1988; 16:899-908.
8. Clark RA.; Wound repair. Curr. Opin. Cell Biol. 1989;1:1000-1008.
9. Rodrich R, Robinson J.; Wound Healing. Selected Readings in Plastic Surgery, 1999.
10. Saglam M (1987). Genel Histoloji, 3. baskı, Emel Matbacılık Sanayi, Ankara
11. Glat P. M., Longaker M., T, Wound healing In: Aston S.J., Beasley R.W., Thorne C.H.M., eds: Grabb and Smith's Plastic Surgery.5. edition Philadelphia Lippincott-Raven Publishers 1997:3-12.
12. Champe P.C. Biochemistry Lippincott's Illustrated Reviews (Çeviri) Tokullugil A. Biyokimya Nobel tıp Kitapevleri 1997;3: 25-38.

13. Engin A (2004). Yara iyileşmesi, in “Temel Cerrahi”, 3. Baskı, Sayek, Güneş Kitabevi, Ankara.
14. Woessner J.B.; The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. Arch. Biochem. Biophys 1961; 93: 440-447.
15. (Bergmann I., Loxley R. Two improved and simplified methods for the spectrophometric determination of hidroxyproline Ann. Chem. 1963;35:1961-65.
16. Lawrence WT: Physiology of the acute wound. Clinics in Plastic Surgery 1998: 25/321-340.
17. Jones TC, Hunt RD and King NW (1997). Veterinary Pathology, 6nd Ed., Williams & Wilkins, Pennsylvania.
18. Regan MC and Barbul A (1994). The cellular biology of wound healing, in “WoundHealing” Editors, Schlag G, Redl H, Vol:1 pp: 3-17 Springer-Verlag Berlin.
19. Calvin M (1998). Cutaneous wound healing, Wounds, 10, 1, 12-32.
20. Gourley IM and Gregory CR (1991). Atlas of Smal Animal Surgey, chapter 1,Gower Medical, New York.
21. Murray R.K, Mayes P.A, Granner D.K, and Rodvell V.W. (1993). Harper’ın Biyokimyası. A Lange Medical Book. 22.Baskı. Çeviren Mentec G, Esöz B. Baris Kitabevi. Konu 31. Proteinlerin ve Aminoasit Azotunun Katabolizması.340 -353.
22. Nikumb S.K, Santhanam K, Rama K, Rao M.V. (1987). Hepatic and Serum Arginase and Ornithine Transcarbamyase.
23. Satriano J.: Arginine pathways and the inflammatory response: Interregulation of nitric oxide and polyamines. Amino Acids, 26, 321–329 (2004).
- 24 Wiesinger H. : Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. Progress in Neurobiology, 64, 365–391 (2001).

25. Mori M., Gotoh T.: Regulation of Nitric Oxide Production by Arginine Metabolic Enzymes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 275, 715–719 (2000).
26. Wu G., Morris SM.: Arginine metabolism : nitric oxide and beyond. *Biochem. J.*, 336, 1-17(1998).
27. Visek, W. J. (1986). Arginine needs, physiological state and usual diets. *Journal of Nutrition* 116: 36–46.
28. Poremska Z., Luboinski G., Chrzanowska A., Mielczarek M., Magnuska J., Baranczyk-Kuzm A.: Arginase in patients with breast cancer. *Clinica Chimica Acta*, 328, 105– 111 (2003).
29. Cederbaum SD., Yu H., Grody W., Kern RM., Yoo P., Iyer RK.: Arginases I and II: do their functions overlap? *Molecular Genetics and Metabolism*, 81, 38–44 (2004).
30. Liu P., Smith PF., Appleton I., Darlington CL., Bilkey DK.: Potential involvement of NOS and arginase in age-related behavioural impairments. *Experimental Gerontology*, 39,1207–1222 (2004). 117. Yu H., Iyer RK., Kern RM., Rodriguez WI., Grody W., Cederbaum SD.: Expression of Arginase Isozymes in Mouse Brain. *Journal of Neuroscience Research*, 66, 406–422 (2001). 86
31. Morris SM., Bhamidipati D., Kepka-Lenhart D.: Human type II arginase: sequence analysis and tissue-specific expression. *Gene*, 193, 157–161 (1997).
32. Edwards AD (1995). The pharmacology of inhaled nitric oxide. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed.* 72 (2) : 127 -30.
33. Known N.S, Stuehr D.J, Nathan C.F. (1991). Inhibition of Tumor Cell Ribonucleotide Reductase by Macrophage Derived Nitric Oxide. *J. Exp. Med.* 174:761-8.
34. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 16;333(6174): 664-6.

35. Grillo MA., Colombatto S.: Arginine revisited: Minireview article. *Amino Acids*, 26, 345–351 (2004).
36. Cross RK., Wilson KT.: Nitric Oxide in Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 9 (3),179–189 (2003).
37. Radomski M W, Palmer R M S, Moncada S. (1990). Characterization of the LArginine: Nitric oxide pathway in human platelets. *Br J Pharmacol*.101: 325-8.
38. Loscalzo J, Welch G. (1995); Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis (USA)*. 38 (2): 87-104.
39. Lowenstein C.J, Dinerman J.L, Synders S.H. (1994). Nitric oxide: A physiologic messenger. *Ann. Intern. Med.* 120: 227 -237.
40. Nathan CF, Hibbs JB (1991). Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.* 3 (1): 65-70.
41. McFarlen RM, Heagy FC, Radin S, Aust JC, Wermuth RE, A study fort he delay phenomenon in experimental pedicle flaps. *Plast. Recons. Surg.* 1965;35:245-62.
42. Schwarz DA., Lindblad WJ., Rees RS.: Altered collagen metabolism and delayed healing in a novel model of ischemic wounds. *Wound Repair and Regeneration* 1995; 3:2,204-212.
43. Rees R.S., Adamson B., Schwarz B. ;Delated repair;The role of glutathione in a rat incisional wound model. *Journal of surgical research* 1996; 62,159-164.
44. Raynaud-Simon A, Belabed L, Le Naour G, Marc J, Capron F, Cynober L, Darquy S. Arginine plus proline supplementation elicits metabolic adaptation that favors wound healing in diabetic rats; *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012 Oct 3.
45. Kopal C. Rat iskemik yara modelinde topikal glutatyon tedavisinin yara iyileşmesi üzerine etkilerinin değerlendirilmesi. Ankara-2000.

46. Bode-Böger SM, Böger RH, Galland A, Tsikas D, Frölich JC. L-arginine-induced vasodilation in healthy humans: pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1998 Nov;46(5):489-97.
47. Hambrecht, R., Hilbrich, L., Erbs, S., Gielen, S., Fiehn, E., Schoene, N., Schuler, G., (2000) Correction of endothelial dysfunction in chronic heart failure: additional effects of exercise training and oral l-arginine supplementation. *Journal of the American College of Cardiology*;35(3):706- 713.
48. Anderson S., Raiten D. (1992) Safety of amino acids used as dietary supplements: Life sciences research office; FDA Contract No. 223-88-2124. p. 117-125.
49. Baker, G.L., Franklin, J.D. (1991). Management of arginine monohydrochloride extravasation in the forearm. *South Med. J.*,84:381-84.
50. Evans, R.W., Fernstrom, J.D., Thompson, J., Morris Jr., S.M., Kuller, L.H., 2004. Biochemical responses of healthy subjects during dietary supplementation with L-arginine. *J. Nutr. Biochem.* 15, 534–539.
51. Grasemann, H., Grasemann, C., Kurtz, F., Tietze-Schillings, G., Vester, U., Ratjen, F., 2005. Oral L-arginine supplementation in cystic fibrosis patients: a placebo-controlled study. *Eur. Respir. J.* 25, 62–68.
52. Alexander, J.W., Metze, T.J., McIntosh, M.J., Goodman, H.R., First, M.R., Munda, R., Cardi, M.A., Austin, J.N., Goel, S., Safdar, S., Greenberg, N., Chen, X., Woodle, E.S., 2005. The influence of immunomodulatory diets on transplant success and complications. *Transplantation* 79, 460–465.
53. Tsubuku, S., Hatayama, K., Mawatari, K., Smriga, M., Kimura, T., 2004a. Thirteen-week oral toxicity study of L-glutamine in rats. *Int. J. Toxicol.* 23, 107–112.
54. Wu, G., Bazer, F.W., Cudd, T.A., Jobgen, W.S., Kim, S.W., Lassala, A., Li, P., Matis, J.H., Meininger, C.J., Spencer, T.E., 2007. Pharmacokinetics and safety of arginine supplementation in animals. *J. Nutr.* 137, 1673–1680.

55. Komorowska-Timek E, Timek TA, Brevetti LS, Szuba A, Stuehlinger M, Hardesty RA, Buncke HJ. Oral administration of L-arginine decreases necrosis of the epigastric skin flap in the rat. *Ann. Plast. Surg.* 2004 Jul;53(1):73-8.
56. Bednarz, B., Jaxa-Chamiec, T., Maciejewski, P., Szpajer, M., Janik, K., vGniot, J., Kawka-Urbaneck, T., Drozdowska, D., Gessek, J., Laskowski, H., 2005. Efficacy and safety of oral L-arginine in acute myocardial infarction. Results of the multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial. *Kardiol. Pol.* 62, 421–427.
57. Clarkson, P., Adams, M.R., Powe, A.J., Donald, A.E., McCredie, R., Robinson, J., McCarthy, S.N., Keech, A., Celermajer, D.S., Deanfield, J.E., 1996. Oral L-arginine improves endothelium-dependent dilation in hypercholesterolemic young adults. *J. Clin. Invest.* 97, 1989–1994.
58. Thais de Castro Barbosa, Leonice Lourenço Poyares, Ubiratan Fabres Machado, Maria Tereza Nunes Chronic oral administration of arginine induces GH gene expression and insulin resistance *Life Sciences.* 79 (2006) 1444–1449.
59. Kirk SJ, Hurson M, Regan M; Arginine stimulates wound healing and immune function in elderly human beings. *Surg.* 1993; 114-155-60.
60. Barbul A, Lazarou SA, Efron DT; Arginine enhances wound healing and lymphocyte immune responses in humans. *Surg.* 1990;108:331-6.
61. Erçöçen AR, Apaydin I, Emiroğlu M, Gültan SM, Ergün 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 Mar;32(1):19-25.
62. Iris B. J. G. Debats, M.D., Darren Booi, M.D., Nicolaas E. P.; Infected Chronic Wounds Show Different Local and Systemic Arginine Conversion Compared With Acute Wounds *Journal of Surgical Research* 134, 205–214 (2006).
63. Lazarous G.S., Cooper D.M., Kington D.R., Margolis D.J., Pecoraro R.E., Rodeheaver G., Robson M.C.: Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Arch. Dermatol.* 130:489-493, 1994



64. Nwomeh BC., Yager DR., Choen IK.: Physiology of the chronic wound. *Clinics in plastic surgery* 25(3):341-356, 1998.
65. Dagher F., Pollina M., Rogers D., M. Gennaro, M. Ascer, The value and limitations of L-arginine infusion on glomerular and tubular function in the ischemic/reperfused kidney. *Journal of vascular surg.* 1995 Mar;21(3):453-458.
66. Meldrum David G, Linda L, William A. Effects of L-Name and L-Arginine on ischemia-reperfusion in rat skeletal muscle. *Plast. Reconstr. Surg.* 1999 Mar;103(3):935-40.
67. Billiar, T. R. Nitric oxide: Novel biology with clinical relevance. *Ann. Surg.* 221:339, 1995.
68. Kurose I, Wolf R, ; Modulation of ischemia/ reperfusion induced microvascular dysfunction by nitric oxide. *Circ. Res.* 76:30, 1995.
69. Huk I, Nanobashvili J; L-Arginine treatments alters the kinetics of nitric oxide and superoxide release and reduces Ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. *Circulation* 96:667, 1997.
70. Dong JY, Qin LQ, Zhang Z, Zhao Y, Wang J, Arigoni F, Zhang W.; Effect of oral L-arginine supplementation on blood pressure: a meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials *Am Heart J.* 2011 Dec;162(6):959-65.
71. Collier SR, Casey DP, Kanaley JA.; Growth hormone responses to varying doses of oral arginine *Growth Horm IGF Res.* 2005 Apr;15(2):136-9.
72. Debats IB, Koeneman MM, Booi DI, Bekers O, van der Hulst RR.; Intravenous arginine and human skin graft donor site healing: A randomized controlled trial *Burns.* 2011 May;37(3):420-6.
73. Barbul, A. Rettura G, Levenson S.; Wound healing and thymotropic effect of arginine: A pituitary mechanism of action. *Am.J.Clin.Nutr.* 37:786,1983.
74. Witte MB, Barbul A.; Arginine physiology and its implication for wound healing. *Wound Repair Regen.* 2003;11(6):419e23.