

TAVŞANLARDA MEZENSEFALON İSKEMİSİ MODELİ

A RABBIT MODEL OF MESENCEPHALIC ISCHEMIA

Tansu MERTOL, Ünal KİRİŞOĞLU, M. Şerefettin CANDA, Metin GÜNER

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroşirürji (TM,ÜK,MG) ve Patoloji Anabilim Dalları (MSC),
İnciraltı, İZMİR

Türk Nöroşirürji Dergisi 2 : 101-105, 1991

ÖZET : Bu çalışmada, tavşanda modifiye iskemi tekniğiyle oluşan nöronal lezyonun dağılımı gözden geçirilmiştir. Kontrol grubu olarak kullanılan tavşanlarda, sadece sağ karotid arter bağlanmıştır. Diğer iki grupta ise sağ karotid arter bağlanması yanında sol karotid artere de anevrizma klipleriyle 6 ve 12 dakikalık geçici klipaj uygulanmıştır. Bu şekilde mezensefalonda oluşan geç nöronal lezyon tetrazolium boyaması ve histopatolojik inceleme ile gösterilmiştir. Tanımlanan teknik beyin sapı iskemisi için bir model olup, bu modelin avantajları ve patofizyolojisi tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Arteria Karotis Kommunis, Beyin Sapı İskemisi, Ligasyon, Tavşan.

SUMMARY : In this study, the distribution of neuronal damage following modified ischemia technique in the rabbit was demonstrated. In rabbits serving as control, only the right common carotid artery was ligated. In the other two groups, the right carotid artery of the rabbits was ligated and the left one was transiently occluded with aneurysmal clips for 6 and 12 min respectively. Delayed neuronal damage occurred in mesencephalon was shown by tetrazolium staining and histopathological examination. The technique described here is a model for the study of brain stem ischemia and pathophysiology and advantages of this model were discussed.

Key Words: Brain stem ischemia, Common carotid artery, Ligation, Rabbit.

GİRİŞ:

Bugüne kadar uygulanan iskemi modellerinin hemen hemen tamamı kortikal iskemiyeye yönelik olmasına rağmen, farmakolojik ajanların potansiyel terapötik etkilerini incelemek için kronik serebral iskemi modeli halen bulunamamıştır (8,12). Uygulanan çeşitli yöntemlerden bazıları global iskemiyeye yol açarken uzun süreli çalışmalar için gerekli olan sürviye de uygun düşmemektedir (12).

Bu yöntemler içinde vasküler oklüzyonla gerçekleştirilen eksperimental serebral iskemi modelleri, embolizasyon veya direkt vasküler oklüzyonla sağlanmıştır (12,14,18). Fakat fokal iskemi hemen daima görülmediği gibi lezyonun boyutları ve etkilenen beyin alanları da değişebilmiştir. Tek veya iki taraflı servikal karotid arter ligasyonu ise çoğu hayvan türlerinde kollateraller iyi çalıştığından iskemiyeye de yol açmamıştır (8). Yalnız, Willis poligonu yetersiz olan (posterior kommunikan arterlerin yokluğundan dolayı) mongol cinsi gerbillerde ligasyonla % 50 oranında iskemik beyin lezyonu oluşturabilmiştir (11).

Eksperimental iskemi modellerinde, tavşan deney hayvanı olarak birkaç çalışmada yer almaktadır (19,20,21). Bu nedenle Anabilim Dalımızda tavşanlarda iskemi modeli oluşturma çalışmalarına başlanmıştır. Tek taraflı servikal karotid arter ligasyonu ve karşı taraf karotid arterin geçici klipajıyla tavşanlarda göz-

lenen geç beyin sapı iskemisi modeli aşağıda sunulularak, modelin avantajları ve geç iskeminin patofizyolojisi tartışılmıştır.

MATERYAL VE METOD

Deneylerde cins ayırımı yapılmaksızın İzmir Veterinerlik Aşı Kontrol Merkezinden temin edilen 15 adet Ankara tavşanı kullanıldı. Ortalama ağırlıkları 2-2.5 kg arasında değişmekteydi. Tavşanlar beşerli gruplar halinde üçe ayrılarak hepsinde preoperatif kan tetkiki, kan gazı ve rektal ateş ölçümleri yapıldı. Bir kulak veni İV sıvı ve gerekirse de sodyum bikarbonat vermek, sağ femoral arter ise kan gazı ölçümleri için kanüle edildi. Supin pozisyonda yatırılarak lokal anestezi altında orta hat insizyonu ile boynun iki tarafında A. karotis kommunisler açığa çıkarılarak çevresinden iki taraflı 3/0 ipekler geçirildi. Spontan oda havası soluyan hayvanlarda, fizyolojik parametrelerin stabilizasyonu için 5-10 dakika beklenerek aralıklı kan gazı ölçümleri yapıldı. Kontrol grubunda (Grup1), sadece sağ karotid arter iki taraflı bağlanarak kesildi. Diğer gruplarda ise buna ek olarak sol karotid artere 6 (Grup2) ve 12 (Grup3) dakikalık geçici klipaj (geçici Yaşargil anevrizma klipi ile) uygulandı. Deney süresince rektal ateş ısıtıcı lamba ile 37 C ile korundu. Metabolik asidoz ise BE_{Ex}0.3 formülüne göre sodyum bikarbonat verilerek düzeltilti. Deney sonrası tavşanlar normal postürlerine

birakılarak aralıklı nörolojik muayeneleri yapıldı.

Nörolojik değerlendirme: Tavşanlar, şuur, ayakta duruşlarına ve ekstremitelere kuvvetine bakılarak operasyon öncesi, operasyondan hemen sonra, 2, 24, 48 ve 72 saat sonra değerlendirilmişlerdir.

Tetrazolium ile boyama: Ligasyondan 72 saat sonra İV sodyum pentobarbitat (50 mg/kg) verilerek tavşanların beyinleri çıkarıldı. Kollikuluslar seviyesinden başlanarak öne ve arkaya doğru 4–5 mm lik koronal kesitler alındı. Kesitler non-spektrik NADH aktivitesini açığa çıkartmak için Nitroblue tetrazolium ile inkube edildi. İnkubasyon solusyonu, 10 ml 0.2 M Tris-Hcl, 10 ml % 0.4 Nitroblue tetrazolium, 4 ml %1 Magnezyum klorid ve 8 ml distile su içeriyordu. Tetrazolium bu solusyona katılmadan önce 0.5 ml N,N Dimetil formamid içinde çözündürüldü. Bu solüsyonda 30 dk tutulan kesitler boyandıktan sonra 48 saat süreyle %10 formaldehit içinde bekletildi. Daimi kayıt için fotoğrafları alındı.

Histopatolojik inceleme: Tetrazolium boyamasında iskemi görülen kesitler ile kontrol grubundaki aynı yerden geçen kesitler histopatolojik inceleme için alındı. Kesitler parafine yatırılarak, alınan ince kesitler hematoxilen-eosin ile boyanarak mikroskopik tetkikleri yapıldı.

İstatistik metod: Sonuçlar Student-t testine göre karşılaştırıldı.

SONUÇLAR

Kan parametreleri: Her üç gruptaki tavşanların ortalama hemoglobini (Hb), Hematokrit (Htc), Eritrosit (E) değerleriyle pre- ve post-operatif kan gazları tablo 1'de gösterilmiştir. Aynı grubun pre- ve post-operatif pO₂, pCO₂ ve pH değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmadığı gibi kontrol grubuyla diğer gruplar arasında da anlamlı farklılık görülmemiştir (p>0.05). Sadece I. ve III. grupların Hb değerleri arasında p<0.05 bulunmuş olmasına rağmen iskemi oluşan grupta Hb daha yüksek olduğundan sonucu etkileyeceği düşünülmemiştir.

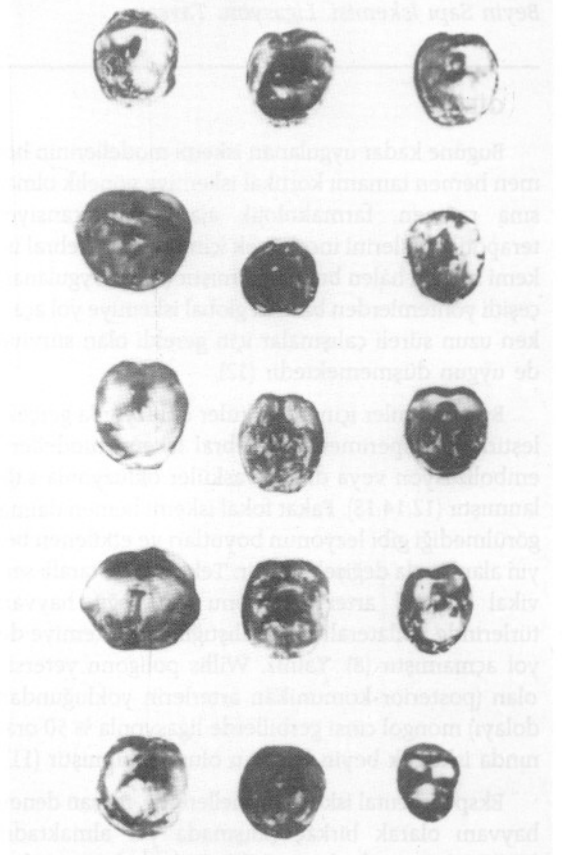
Nörolojik değerlendirme: Operasyondan hemen sonra bile şuuruları hiç bozulmayan tavşanların post-operatif 30–60 dakika kadar bir köşede sakin durdukları gözlenmiştir. İlk saatlerde ön veya arka ekstremitelerinde görülen minimal pareziler daha sonradan ortadan kalktığından operasyon sırasında supin pozisyonda yapılan tesbite bağlanmıştır. Bunun dışında şuur, kuvvetsizlik ve postür açısından kayda değer bir değişikliğe rastlanmamıştır.

Tablo 1 : Kan Parametrelerinin karşılaştırılması

	GRUP I	GRUP II	GRUP III
Eritrosit (x 1 milyon)	4.86 + 0.30	5.12 + 0.10	5.43 + 0.16
Hb	10.7 + 0.60	11.1 + 0.30	12.2 + 0.27
Htc	32.5 + 1.58	33.6 + 0.66	35.5 + 0.10
pre-op pO ₂	84.1 + 5.17	92.1 + 5.85	87.4 + 2.08
post-op pO ₂	83.8 + 5.38	90.0 + 4.88	87.4 + 1.70
pre-op pCO ₂	30.8 + 2.73	29.8 + 0.92	28.6 + 1.08
post-op pCO ₂	31.0 + 2.83	30.9 + 0.57	28.3 + 1.00
pre-op pH	7.43 + 0.01	7.46 + 0.01	7.39 + 0.02
post-op pH	7.43 + 0.01	7.46 + 0.01	7.40 + 0.13

* Ortalama + standart hata olarak verilmiştir.

Tetrazolium ile boyama: Nitroblue tetrazolium ile boyanan koronal kesitlerde kollikulus kaudalis düzeyinde normal boyanan mor renklerin yanında açık pembe renkte uniform olmayan iskemiye gösteren alanlar Şekil 1'de gösterilmiştir. Kontrol grubunda



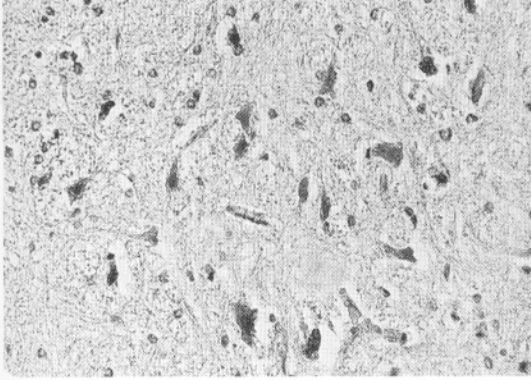
Şekil 1 : tetrazolium boyama ile kollikulus kaudalis düzeyinden geçen kesitlerde daha az boyanmış (Açık renkte görülen) yerler iskemi alanlarını göstermektedir.

Grup I (kontrol) ortada, Grup II (6 dk geçici klipaj) solda, Grup III (12 dk geçici klipaj) ise sağda görülmektedir.

(ortada görülenler) bu bölgede boyanma azlığı görülmezken, grup II'de (solda görülenler) 4. grup III'te ise 5 tavşanda iskemi alanları görülmüştür. Diğer kesit alanları normal olup iskeminin sadece mezensefalonda olduğu gözlenmiştir. İskemi görülme oranları karşılaştırıldığında (kontrol grubuyla) anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p < 0.01$).

Histopatoloji: Tetrazoliumla daha açık renkte boyanan kesitlerde sitoplazmanın koyu eozinofilik, nükleusun ise koyu bazofilik olduğu ve perikaryonun bu bölgelerde daha çok üçgen şeklinde hakimiyeti iskekiye uyar bulgular olarak değerlendirilmiştir (Şekil 2). Kontrol grubunda ise bu değişiklikler gözlenmemiştir.

Yapılan çalışmada mortalite görülmemiştir.



Şekil 2 : Histopatolojik incelemede stoplazmada homojenizasyon ve asidofilisinde artış, hücrede büzülme, koyu kromatinize nükleus ve Nissl cisimciklerinin belirsiz olması iskekiye uyumludur (HE, x50)

TARTIŞMA

Fokal serebral iskemi, serebral vasküler hastalıkta, serebral kan akımının intraoperatif geçici olarak kesilmesinde veya lokalize bir kitlenin beyine kompresyonunda görülebilen ve bölgesel iskemik ödemden infarkt gelişimine kadar bir dizi olaylar zincirini başlatan tetik mekanizmasıdır (6). Nörolojik lezyonun derecesi, kollateral kan akımının etkinliğine bağlı olduğundan ana serebral arterin bile ani oklüzyonu hemen daima serebral enfarkta yol açmamaktadır (9). Bu nedenle fokal iskemide komplet iskemi olabildiği gibi iskeminin hiç olmaması da olağan bulgudur (6,9).

Tetik mekanizması oluşturduğundan patofizyoloji ve farmakolojik ajanların etkilerini incelemek için fokal serebral iskemi modelleri üzerine çalışmalar uzun yıllardır devam etmektedir (8,18). Tercih edilecek modelde; uygulamanın kolay olması, anestezieye bağlı değişikliklerin minimuma indirilmesi, geçici oklüzyon oluşturabilme yeteneği, iskeminin aynı bölgede olu-

şabilmesi ve patofizyolojik çalışmalar için hayvanların yeterli süre hayatta kalabilmeleri aranan özelliklerden birkaçıdır. Uygulamanın kolay olduğu ve anestezie gerektirmediği tek girişim şekli servikal karotid arter ligasyonu olmasına rağmen çoğu hayvan türlerinde kollateraller iyi geliştiğinden sadece ligasyonla beyin sirkülasyonunda belirgin değişiklik ve iskemi oluşturulamamıştır (7,13,17). Sadece bazı cins gerbillerde Willis poligonu yetersiz olduğundan uniform olmayan hemisferik iskemi gözlenmiştir (5,11).

Tavşanlarda iskemi modelleri az çalışıldığından karotid ligasyonu modifiye edilerek çalışmamızda uygulanmıştır. Uygulama genel anestezie gerektirmemektedir. Böylece anestezinin riskleri, anestetik maddelerin iskemi üzerindeki etkileri ve post-operatif erken dönemde nörolojik değerlendirmeleri engellemesi ortadan kalkmaktadır. Tavşanlarda, diğer hayvanlarda problemleri olan İV serum takılması ve femoral arter kateterizasyonu bile sadece lokal anestezie ile rahatlıkla yapılabilir. Hayvanlar genellikle şuur ve ayakta duruşlarına göre değerlendirildiklerinden anestetik ilaç ve kas gevşeticiler ters etki yaratmaktadır (17). Trakeostomi ve entübasyon gerekmediğinden post-operatif dönem daha rahat geçmiştir. Sadece karotis diseksiyonu sırasında bazen trakea irritasyonuna bağlı geçici solunum etkilenmesi olabildiğinden ligasyon öncesi bir süre beklenilerek kan gazlarıyla takip etmek gerekmektedir. Özellikle iskemi modeli çalışmalarında kan gazı ölçümleri oldukça önem kazanmıştır. Ayrıca bu modelde, direkt girişim söz konusu olmadığından operasyona bağlı lokal cevap değişikliği, kan/beyin engelini permeabilite değişikliği ve direkt kortikal hasar da olmamaktadır (13,17).

Boyamada kullanılan tetrazolium, dehidrojenazların histokimyasal tayininde yaygın kullanılan bir endikatördür (3). Havanın bulunduğu ortamda O₂ radikali tetrazolium tuzlarının gerçek redüktanıdır. NADH aktivasyonu varsa tetrazoliumla boyanma olmaktadır. İnfarkta hiç boyanma olmazken iskemide daha az boya almaktadır. TTC (Trifenil tetrazolium klorid) ve diğer tetrazolium tuzları daha önceleri kullanılmıştı (1). Daha kolay temin ettiğimiz için biz çalışmamızda Nitroblue tetrazoliumu Lye ve ark. (12) nin bahsettiği inkubasyon solusyonunda kullandık. Bu metod iskemi alanlarının makroskopik görünmesini sağladığından iskemi çalışmalarını daha kolaylaştırmıştır. Çalışmamızda da bu boyama metodu ile patolojik değerlendirme arasında tam bir uygunluk bulunmuştur.

Asidofilik nöronların görülebilmesi için iskemik olaydan sonra en azından 16 - 18 saatin geçmesi gerekmektedir (14).

Geç nöronal lezyonda ise hücrel değişiklikler açısından 3-4 günlük bir sürenin geçmesi uygundur (5). Servikal karotid arter end-arter olmadığından ve diğer ligasyon çalışmalarında da infarkt görülmediğinden geç iskemiyi gözlemek amacıyla çalışmamızda beyinin kesitlerinin incelenmesini üçüncü günün sonunda yapmayı tercih ettik.

Patofizyolojik açıdan bakıldığında bu geç iskemi iki şekilde açıklanabilmektedir : geç iskeminin nedeni ya geç bir hipoperfüzyondur, ya da bu lokalizasyondaki nöronlar iskemiyeye daha çok hassastır. Resirkülasyonun iki taraflı karotid oklüzyonu sonrası geçici klipaj uygulanan tarafta sağlanmasıyla o tarafta normal perfüzyon basıncının temini, geçici olarak, akımın yeniden oluşmasına bir engel oluşturacak veya geçici hiperemiden dolayı doku perfüzyonunda sekonder azalmaya yol açacaktır. Bu geç hipoperfüzyonun bir nedeni ise de, bazıları bunun doku asidozundan kaynaklanan vazo paralizi ile açıklamaktadır (10). Pulsinelli ve arkadaşları (15) ise serebrovasküler lümenin, ödeme bağlı olarak glial, endotelial, perivasküler astroglial süreçlerin şişmesinden ve platelet veya astrositlerin agregasyonunun artmasından dolayı komprese olabileceğini ve artmış düz kas tonusunun da bunda etkili olabileceğini belirtmişlerdir.

Bu lokalizasyondaki nöronların iskemiyeye daha çok hassas (vulnerabilite) olması da patofizyolojide diğer bir açıklama tarzıdır. Nöronlar arasında iskemik nöronal yaralanma açısından bir hiyerarşi söz konusudur. Selektif olarak iskemiyeye hassas nöronlar öncelikle etkilenerek iskemik nöronal yaralanmanın oluşmasında anahtar rol oynarlar. Nitekim Araki ve ark. (2) gerbillerde iki taraflı geçici karotis klipajı sonrası inferior kollikulus ve hipokampusun CA1 sektörünün ilk 5 dakikalık klipaj sonrasında etkilendiğini ve buraların en hassas bölgeler olduklarını belirtmişlerdir. Lezyonun ilerlemesi gözönüne alındığında da medial genikülat cisim ve inferior kollikulusunda daha hızlı ilerlediğini göstermişlerdir.

Yaptığımız çalışmada görülen geç iskemiyi detaylı açıklamak için gerekli kan akımı ve 45 Ca otoradyografik çalışmaları ne yazık ki yapılamamıştır. Yalnız bu bulgularla yine de bir açıklama yapabilmek olanağı vardır. Brehmer ve ark. (4) tek taraflı karotis arterin bağlandığı tavşanlarda, ön sirkülasyondan çok arka sirkülasyonun çalıştığını ve o tarafta kaudal kommunikan arterin genişlediğini göstermişlerdir. Yaptığımız çalışma düşünülecek olursa ligasyonun yapıldığı sağ tarafta kaudal kommunikan arter sağ hemisfere daha çok kan taşıyacağından beyin sapı daha az kan almaktadır. Diğer taraftan geçici klipaj uygulanan sol tarafta perfüzyona olanak sağlanınca yukarıda bahsedilen resirkülasyona bağlı değişiklikler olacaktır. Nö-

ral ve vasküler dokulardaki değişiklikler hem iskemi dönemi hem de resirkülasyon dönemindeki selüler olaylardan etkilenmemektedir (15). Yaptığımız hipotansiyonlu ikinci bir iskemi çalışmasında iki taraflı karotis arterin bağlandığı tavşanlarda bu bölgede iskemiyeye rastlamadığımızdan bu çalışmada görülen iskemik nöronal değişikliklerin tek başına karotid ligasyonundan kaynaklanmayıp bunda reperfüzyonun da etkileri olduğu inancındayız.

Sonuç olarak, bazı bölgelerden kollateral akım olduğu için serebral kan akımındaki artışın iskemide etkisi olabileceği ve iskemi dansitesinde değişiklik görülebileceği gibi bazı dezavantajlarından bahsedilmesine rağmen, işlemin anestezi gerektirmeden yapılabilmesi, iskeminin aynı bölgede yer alması, diğer büyük hayvanlara nazaran daha kolay ve ucuz temin edilmesi gibi avantajları da sözkonusudur. Üstelik, bugüne kadar genellikle hemisferik iskemi çalışmaları yapıldığından beyin sapı iskemisi çalışmalarına ön - ayak olması açısından da önemli olduğu inancındayız.

Yazışma Adresi: Yrd. Doç. Dr. Tansu MERTOL,
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Nöroşirürji Anabilim Dalı
35340, İnciraltı / İZMİR.
Tel: (9 - 51) 59 59 59 / 33 02.

KAYNAKLAR

1. Aksoy K, Korfali E, Safi İ ve ark.: Orta serebral arter oklüzyonu sonrası fokal serebral iskemi. Teknik ve nöropatolojik inceleme. U.Ü.T.F. Dergisi 15:127-134, 1988
2. Araki T, Kato H, Kogure K: Selective neuronal vulnerability following transient cerebral ischemia in the gerbil: distribution and time course. Acta Neurol Scand 80:548-553, 1989
3. Astrup J, Srensen PM, Srensen HR: Inhibition of cerebral oxygen and glucose consumption in the dog by hypothermia, pentobarbital, and lidocaine. Anesthesiology 55:263-268, 1981
4. Brehmer VA, Beleites B: The morphology of the circulus arteriosus cerebri of the rabbit and its changes following unilateral ligation of the common carotid artery. Anat Anz Jena 167:297-300, 1988
5. Crain BJ, Westerkam WD, Harrison AH, et al: Selective neuronal death after transient forebrain ischemia in the mongolian gerbil: A silver impregnation study. Neuroscience 27:387-402, 1988
6. Dempsey RJ, Roy MW, Meyer KL, et al: Indomethacin-mediated improvement following middle cerebral artery occlusion in cats. J Neurosurg 62:874-881, 1985
7. Eklöf B, Siesjö BK: The effect of bilateral carotid artery ligation upon the blood flow and the energy state of the rat brain. Acta Physiol Scand 86:155-165, 1972
8. Garcia JH: Experimental ischemic stroke: A review. Stroke 15:5-14, 1984
9. Hossman KA, Schuier FJ: Experimental brain infarcts in cats. I. Pathophysiological observations. Stroke 6:583-592, 1980
10. Kagstreöm E, Smith ML, Siesjö BK: Cerebral circulatory responses to hypercapnia and hypoxia in the recovery period following complete and incomplete cerebral ischemia in the rat. Acta Physiol Scand 118:281-291, 1983
11. Levy DE, Brierley JB: Communication between vertebral and carotid arterial circulations in the gerbil. Exp Neurol 45:503-508, 1974

12. Lye RH, Shrewsbury GJ, Slater P et al: Rat middle cerebral artery occlusion: use of evoked potentials and tetrazolium staining to assess chronic ischemia. *J Neuroscience Methods* 22:133-139, 1987
13. Mendelow AD, Graham DI, Moculloch J et al: The distribution of ischemic damage and cerebral blood flow after unilateral carotid occlusion and hypotension in the rat. *Stroke* 15:704-710, 1984
14. Nedergaard M: Mechanisms of brain damage in focal cerebral ischemia. *Acta Neurol Scand* 77:81-101, 1988
15. Pulsinelli WA, Brierly JB, Blum F: Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* 11:491-498, 1982
16. Pulsinelli WA, Levy DE, Duffy TE: Regional cerebral blood flow and glucose metabolism following transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* 11:499-509, 1982
17. Smith ML, Bendek G, Dahlgren N et al: Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2.A 2-Vessel occlusion model. *Acta Neurol Scand* 69: 385-401, 1984
18. Suzuki J, (Ed): *Treatment of cerebral infarction: Experimental and clinical study*. Wien: Springer-Verlag 1987, pp 9-13
19. Takashima S, Ando Y, Takashita K: Hypoxic-ischemic brain damage and cerebral blood flow changes in young rabbits. *Brain Dev* 8:274-277, 1986
20. Taşdemiroğlu E, Şekerci Z: İskemi sonrası kan beyin bariyeri permeabilitesinin kantitatif olarak ölçülmesi. *Türk Nöroşirürji dergisi* 1:57-64, 1989
21. Yamamoto K, Yoshimine T, Yanagihara T: Cerebral ischemia in rabbit: A new experimental model with immunohistochemical investigation. *J Cereb Blood Flow Metabol* 5:529-536, 1985