

**Tavşanlarda Homolog Kan Embolisi Kullanılarak
Oluşturulan Bir Serebral İskemi Modeli**

Dr. Osman ACAR*, Dr. S.Serpil KALKAN**

Dr. Erdal KALKAN***, Dr. Hamiyet PEKEL****

Dr. Ahmet Candan DURAK*****

ÖZET

Bu çalışmada, tavşanlarda embolizan madde olarak homolog kan pıhtısının kullanıldığı modifiye bir embolik serebral iskemi modeli sunulmuştur. 16 adet tavşanın kullanıldığı çalışmada sağ karotis komminis arteri içine homolog kan pıhtısı enjekte edilmiştir. Tavşanların tümünde embolizasyon öncesi ve sonrası dönemlerde aralıklı olarak göz dibi muayene edilmiş, dördünde de embolinin ilerlemesini izlemek amacı ile karotis angiografi yapılmıştır. Embolizasyondan 24 saat sonra intrakardiyak formaldehit verilerek öldürülen tavşanların beyinleri çıkartılmış ve alınan seri kesitlerde infarkt sahalarının lokalizasyonları ile volümleri saptanmıştır.

-
- * : S.Ü.T.F. Nöroşirürji ABD. öğretim üyesi, Yrd. Doç. Dr.
** : S.Ü.T.F. Morfoloji ABD. Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı araştırma görevlisi, Dr.
*** : S.Ü.T.F. Nöroşirürji ABD. araştırma görevlisi, Dr.
**** : S.Ü.T.F. Göz Hastalıkları ABD. öğretim üyesi, Yrd. Doç. Dr.
***** : S.Ü.T.F. Radyoloji ABD. araştırma görevlisi, Dr.
-

SUMMARY

A Cerebral Ischemia Model in Rabbits, Performed Using Homologous Blood Emboli.

In this study, a modified model of embolic cerebral ischemia in rabbits with homologous blood clot has been presented. In the experiments including 16 rabbits, homologous blood clot was injected into the right common carotis arteries of the rabbits. In the pre and post embolization steps, fundus in all rabbits was examined and in four of them carotis angiography was performed to determine distal migration of emboli. 24 hours after the embolization, the brains of the rabbits that were killed by applying intracardiac formaldehyde, were extracted and in the provided serial sections, the localization and volumes of infarct areas were determined.

GİRİŞ

Serebral iskemi ve infarkt ile sonuçlanan serebral embolizm önemli bir klinik sorundur. Bu klinik tabloyu taklit etmek için çeşitli deneysel modeller geliştirilmiştir (1). Bu modellerde serebral sirkülasyonun insaninkine benzer olması ve ucuzluğu gibi nedenlerle sıklıkla ratlar kullanılmıştır (2,3). Ancak tavşan serebral yapısının da emboli çalışmaları için insaninkine oldukça benzediği bilinmektedir (4).

1982 de Kudo ve arkadaşları (5) ratlarda yaptıkları çalışmalar sonucunda homolog kan pıhtısı ile yapılan bir serebral embolizasyon modelini bildirmişlerdir. Daha sonra çeşitli araştırmacılar bu yöntemi homolog kan pıhtısını pterigopalatin arteri ligate ettikten sonra rat internal karotis arteri içine enjekte ederek modifiye etmişlerdir (6,2). Denek olarak

tavşanın kullanıldığı çalışmamızda ise pıhtı hazırlama yönteminde, enjeksiyon volümünde değişiklikler olduğu gibi diğer araştırmacılarından farklı olarak kan pıhtısı karotis komünüs arter içine enjekte edilmiştir.

MATERYAL ve METOD

Araştırmamızda, 2-3 kg ağırlığında, 16 adet erkek NZW tavşanı kullanıldı. Tavşanlar 1 g/kg İ.P üretan kullanılarak uyutulduktan sonra kardiyak ponksiyon yolu ile 1.5 ml kan alındı ve pıhtı oluşması için 3 saat oda sıcaklığında bekletildi. Pıhtı oluşma süresince anestezide ara verildi. 3 saatlik sürenin sonunda oluşan pıhtının serumu tamamen atıldı, kalan kısım 21 nolu enjektör iğnesinden geçirilerek inceltildi ve içinde 0.4 ml izotonik sodyum klorür solüsyonu bulunan enjektöre bu inceltilmiş pıhtıdan 0.4 ml çekildi. Bu yöntemle hazırlanan pıhtı parçalarının mikroskopik ölçümünde uzunluklarının 0.3-2 mm olduğu görüldü. Bu işlemler sonunda tavşanlar tekrar uyutuldu ve anestezisi esnasında tavşanların vücut ısısı elektrik lambası ile korundu. Daha sonra sol femoral artere bir kateter konarak arteriyel kan basıncı poligraf aracılığı ile takip edildi. Saha temizliği sonrası tavşanların sağ ön servikal bölgesine yapılan vertikal bir insizyon yardımı ile sağ karotis komünüs arter ortaya çıkartıldı ve proksimalinden klipe edildi. Daha sonra karotis komünüs artere 21 nolu intravasküler kateter sokularak karotis bifurkasyonuna kadar itildi. Bu kateter aracılığı ile hazırlanan pıhtı 2 dakikalık sürede karotis arter içine enjekte edildi. Pıhtının enjeksiyonu sonunda kateter çıkartıldı ve damar duvarındaki defekt 8-0 ipek ile dikilerek tamir edildi. Daha sonra karotis komünüsteki klip kaldırılarak kan akımının tekrar başlaması sağlandı. 16 tavşanın dördünde embolizasyon işlemi sonrası 10,30,

300. dakikalarda serebral angiografi yapıldı. Tek yan grafi ile yetinilen angiografi çalışmalarında 0.1 ml % 300 mg Iopromid karotis komminis arter içine enjekte edildi. Ayrıca angiografi yapılmayan tavşanlarda emboli öncesi ve sonrası sık aralıklarla fundoskopik muayene yapıldı.

Serebral angiografi yapılan 4'ü dışında 12 tavşan embolizasyondan sonra 24 saat yaşatıldı ve 24 saatin sonunda intrakardiyak % 4'lük formaldehit solüsyonu verilerek öldürüldü. Embolizasyon sonrası 24 saat yaşamayan denekler araştırmaya dahil edilmedi. Ölümünden hemen sonra tavşanların beyinleri çıkartılarak % 20'lik formaldehit solüsyonu içinde bir hafta bekletildi. Bu işlemler sonrası beyinler hemisferlerine ayrıldı. Her bir hemisfer, korpus kallozumun genu'sunun önü ile temporal polün önünden geçen bir kesi ve sulkus parietookspitalisten geçen ikinci bir kesi ile ön-orta ve arka - beyin olmak üzere üç bölüme ayrıldı. Bu işlemlerden sonra tüm beyinden 5 mikro metre kalınlığında koronal seri kesitler alındı ve H.E ile boyanarak infarkt alanları ışık mikroskopunda oküler mikrometresi aracılığı ile hesaplandı. Alan hesabının sonunda $V = \frac{A \cdot d}{L^2}$ (V= infarkt Hacmi, A= infarkt Alanı, d= Kesit Kalınlığı, L= Objektif büyütmesi) formülü kullanılarak nekroz hacimleri hesaplandı (7).

BULGULAR

Angiografik Bulgular: Embolizasyon öncesi yapılan sağ karotis angiografilerde eksternal karotis arter ve dalları ile internal karotis arterin proksimal kısmının oldukça iyi görüldüğü; internal karotis arterin distali ile uç dallarının ise muhtemelen arter çaplarının inceliğine bağlı olarak iyi takip edilemediği saptanmıştır (Resim I). Emboli sonrası 10. dakikada yapılan angiografide internal karotis arter ile

eksternal karotis arterin ilk dalı olan oksipital arterin tam olarak tıkanıdığı gözlenmiştir (Resim II). 30 dakika sonraki angiografide embolinin biraz daha distale ilerlediği, internal karotis arter başlangıcının görölür hale geldiği, fakat oksipital arterin görülemediği, eksternal karotis arterin superfisial temporal arter bifurkasyonundan hemen önce tıkanıdığı saptanmıştır (Resim III). Emboliden 300 dakika sonraki angiografide ise embolizasyon öncesininkine benzer bir görüntü elde edilmiş, hiç bir tıkanıklık saptanmamıştır (Resim IV).

Fundoskopi Bulguları: Emboli öncesi dönemde oftalmoskop yardımı ile fundoskopik muayene yapılan tavşanların embolizasyon sonrasında sık aralıklar ile fundus muayenesi yapılmıştır. Embolizasyondan ortalama 25 dakika sonra retina arterlerinin incelendiği, devamlılıklarının bozulduğu, retinanın solduğu gözlenmiştir. Embolizasyondan yaklaşık 45 dakika sonra retinanın tekrar kanlanmaya başladığı, arterlerin devamlılığının ve dolgunluğunun kısmen yeniden oluştuğu görülmüştür. Bu tavşanların ikisinde fundus değişiklikleri biomikroskop yardımı ile fotograflanmıştır (Resim V, Resim VI, Resim VII).

Histopatolojik Bulgular: Alınan kesitlerin mikroskopik incelemesinde saptanan infarkt alanlarında nöronların stoplazmalarının eosinofilik boyandığı, çekirdeklerinde piknoz ve erime olduğu, parankim nekrozu ile mikroglia proliferasyonunun geliştiği, endotel proliferasyonunun belirgin olarak seçildiği, damarların lümenlerindeki eritrositlerin sınırlarının bozulduğu, fibrin oluşumu ile taze trombus yapısının geliştiği saptanmıştır (Resim VIII). Ayrıca tavşanların tümünde her iki hemisferde de multipl infarkt alanlarının mevcut olduğu ancak sağ hemisferdeki lezyon alanlarının daha geniş hacimde olduğu ve her iki hemisferde de infarkt alanlarının orta beyin bölgesinde yoğunlaştığı gözlenmiştir. Yapılan volüm hesaplamaları

sonucunda tavşan beyinlerinde görülen infarkt hacimlerinin 7.20 mm^3 ile 10.47 mm^3 arasında değiştiği ve ortalama infarkt hacminin 8.670 mm^3 olduğu saptanmıştır. Lezyon hacimlerinin sağ ve sol hemisferlere göre dağılımı incelendiğinde ise sağ hemisferlerdeki lezyonların total hacimlerinin 4.050 mm^3 ile 6.320 mm^3 arasında değiştiği ve ortalama infarkt hacminin 5.094 mm^3 olduğu görülmüştür. Bu değerlerin sol hemisfer için sırasıyla 3.000 mm^3 , 4.394 mm^3 , 3.585 mm^3 olduğu hesaplanmıştır. Sağ hemisferde gözlenen ortalama 5.094 mm^3 'lük infarkt hacminin beyin bölgelerine göre dağılımı incelendiğinde ön bölgede ortalama 0.951 mm^3 , orta bölgede 2.415 mm^3 , arka bölgede 1.725 mm^3 'lük bir dağılım gösterdiği görülmüştür. Bu değerler sol hemisfer için sırasıyla 1.092 mm^3 , 2.110 mm^3 , 0.383 mm^3 olarak hesaplanmıştır.

TARTIŞMA VE SONUÇ

İstatistiksel çalışmalar, serebrovasküler hastalıkların kronik sakatlık yaratan nedenler arasında birinci, ölüm nedenleri arasında üçüncü sırayı aldığını göstermektedir. Okluziv serebrovasküler hastalıklar içinde önemli bir yer tutan serebral embolizm beyin infarktları yaratan nedenler arasında en sık görülenidir (8).

Böylesine önemli bir klinik problem olan okluziv serebrovasküler hastalıkları daha iyi anlamak için çeşitli deneysel iskemi modelleri geliştirilmiştir. Deneysel serebral iskemi yaratmak için genellikle direkt vasküler oklüzyon yöntemi veya embolizasyon yöntemi kullanılmaktadır. Direkt vasküler oklüzyon yöntemi çoklukla kraniektomi yapılmasını gerektirmektedir ki bu işlem fizyolojik ve biokimyasal değişikliklere, direkt kortikal yaralanmalara neden olabilmektedir. Embolizasyon yönteminde bu sakıncaların olmaması yanında perforan

arterler yolu ile anastomozlar oluşmadığı için direkt vasküler oklüzyon yöntemine göre daha ağır bir iskemi tablosu gelişmektedir (9). Beyin infarktlarının başlıca nedeninin serebral embolizm olduğu gözönüne alındığında embolizasyon ile yaratılan deneysel serebral infarktların klinik tabloları daha iyi taklit edebileceği anlaşılabacaktır.

Major serebral arter içinde tutulabilecek büyüklükteki emboli posterior sirkülasyondan on kez daha sık olarak anterior sirkülasyona girer ve daha sonra yaygın bir biçimde orta serebral arter içine ilerler. Embolik oluşumların yerleşimi genellikle damar bifurkasyonlarında veya major arter dallarında olur. Mikroemboliler geniş ölçüde beyine yayılır. Bu yayılım damar bölgesindeki kan akımının gücü ile orantılıdır. İntravasküler fibrinolizis ile trombozis arasındaki denge embolinin kaderini tayin eder. Trombozis distal damar yapılarını tıkar, kollateraller ile olan kan akımını azaltır ve serebral infarktları genişletir. Fibrinolizis ise embolinin çözülmesini sağlayarak reperfüzyona neden olur (8).

Amorozis fugakslı hastalarda yapılan klinik çalışmalarda retinal sirkülasyondaki mikroembolinin parçalanması ve yer değiştirmesi gösterilmiştir (10). Ayrıca T.İ.A'nın pathogenezi ve stroke geçiren hastalarda küçük damar oklüzyonlarının kaybolması aynı mekanizma ile açıklanmaktadır (11). Bir çok araştırmacı ise serebral embolizm sonucu geliştiğini düşündükleri serebral infarkt sahalarında arteriyel oklüzyonun bulunmamasını embolinin lizisi ile açıklamaktadırlar (8).

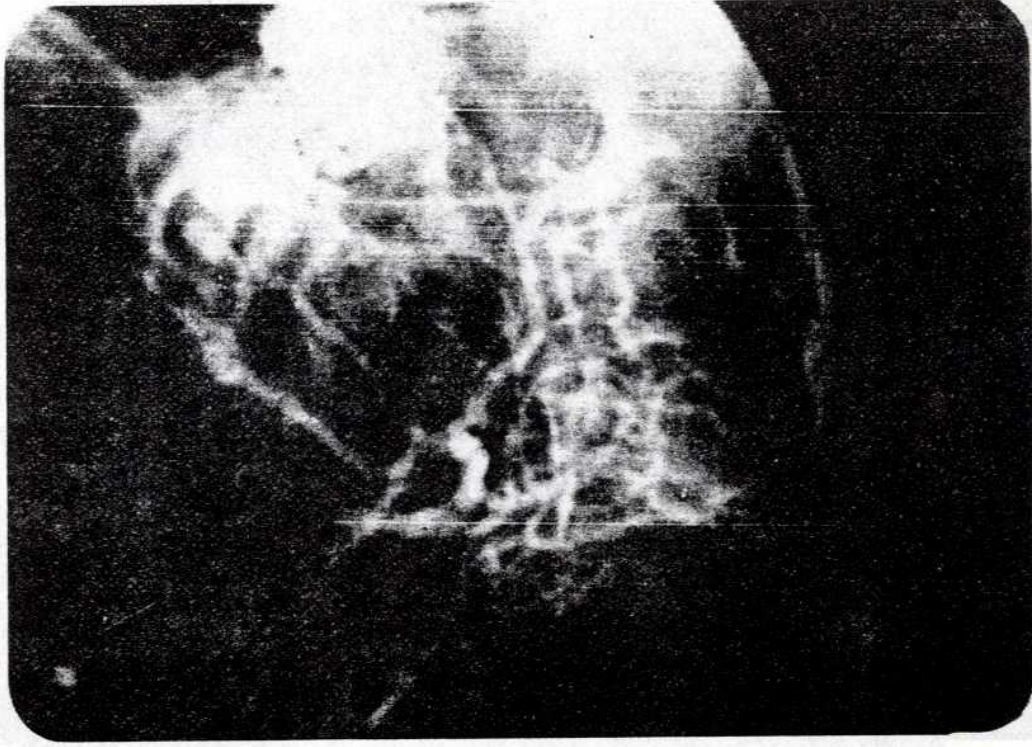
Ekstravasküler kuagülasyon yolu ile oluşturulan kan pıhtısı sirkülasyonda intravasküler olarak oluşan trombustan histolojik olarak farklı olmakla birlikte kan pıhtısının parçalanma ve distale hareket özelliği kısmen de olsa sirkülasyonda intravasküler olarak oluşan trombusunkine benzemektedir

(6). Bu benzeyiş kan pıhtısı ile yapılan embolizasyonların mikrosferlerle yapılanlara üstünlüğünü oluşturur.

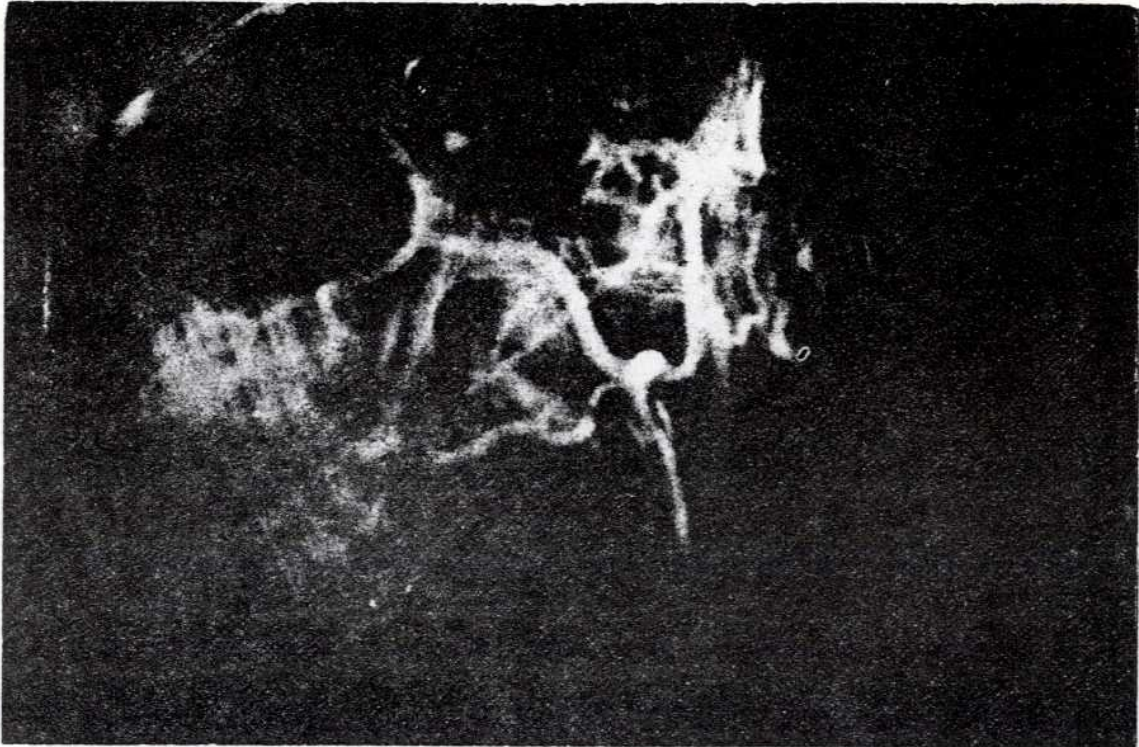
Kan pıhtısının embolik materyal olarak kullanıldığı çalışmamızda, embolik materyalin parçalanmasını ve distale ilerlemesini gözlemek amacı ile angiografik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmada embolinin başlangıçta tıkadığı damarların daha sonra embolinin distale ilerlemesi sonucu açıldığı görülmüştür. Geç dönemde ise angiografik olarak tıkalı hiçbir damar gözlenememiş ve bu bulgunun embolik kan pıhtısının lizisine bağlı olduğu düşünülmüştür. Ayrıca fundoskopik muayenelerde emboli sonrası tıkanan retina damarlarının ve solan retinanın bir süre sonra eski dolgunluk ve renklerine ulaşmalarında embolik materyalin distale ilerlemesi ve lizisi lehine değerlendirilmiştir.

Penar (2) ile Kaneko ve arkadaşları (6) ratlarda homolog kan embolisi ile geliştirdikleri serebral iskemi modellerinde emboliyi direkt internal karotis arter içine enjekte etmişlerdir. Stroklerin, T.I.A'ların ve amorozis fugaksların önemli bir kısmının karotis bifurkasyonundan gelişen atheroembolizme bağlı olduğu gerçeğinden hareket ederek çalışmamızda karotis komminisartere emboli enjeksiyonu yöntemi kullanılmıştır.

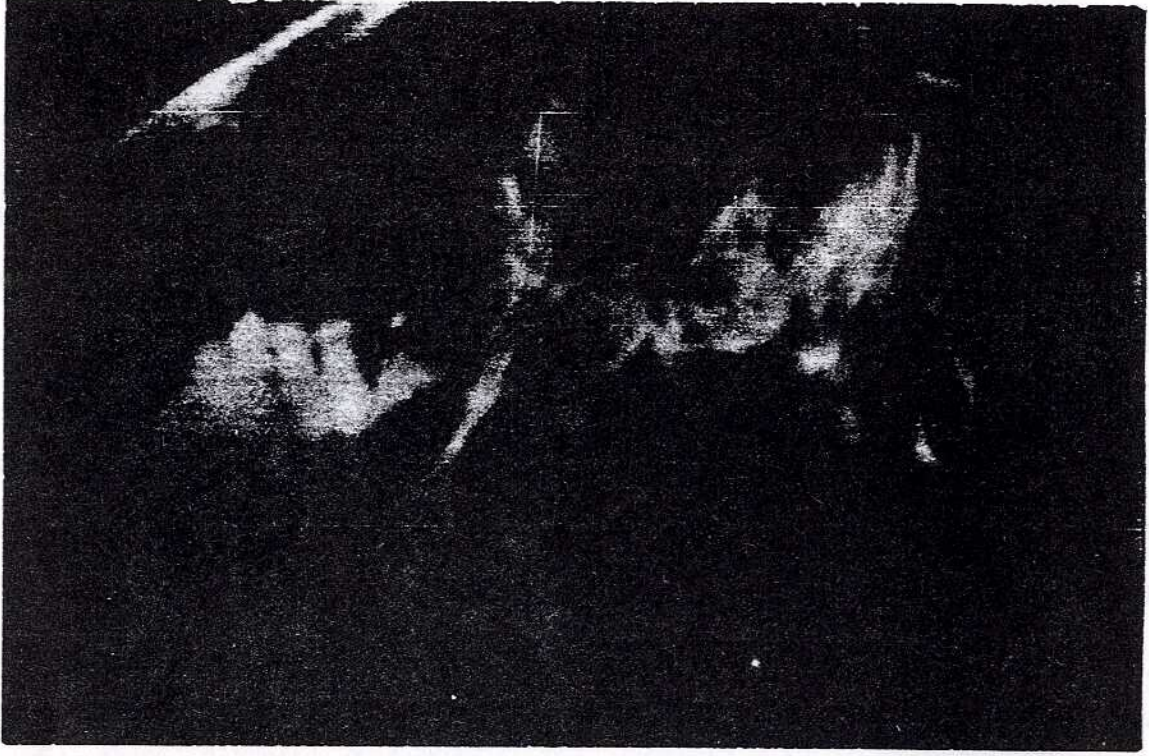
Kogure ve arkadaşları (12) ratlarda internal karotis arteri içine mikrosfer enjeksiyonu ile yaptıkları çalışmalarda kontrlateral hemisferde hiç mikrosfere rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Kaneko ve arkadaşları (6) ise rat internal karotis arterine homolog kan pıhtısı enjekte ederek yaptıkları çalışmada embolizasyondan 4 saat sonra kontrlateral hemisferde % 30 oranında embolik kan pıhtısına rastladıklarını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise kan pıhtısı aranmamış olmakla birlikte tüm tavşanlarda kontrlateral hemisferde düşük oranlarda da olsa infarkt sahalarına rastlanılmıştır. Bu farklılıkların embolizan maddelerin özellikleri ile miktarı-



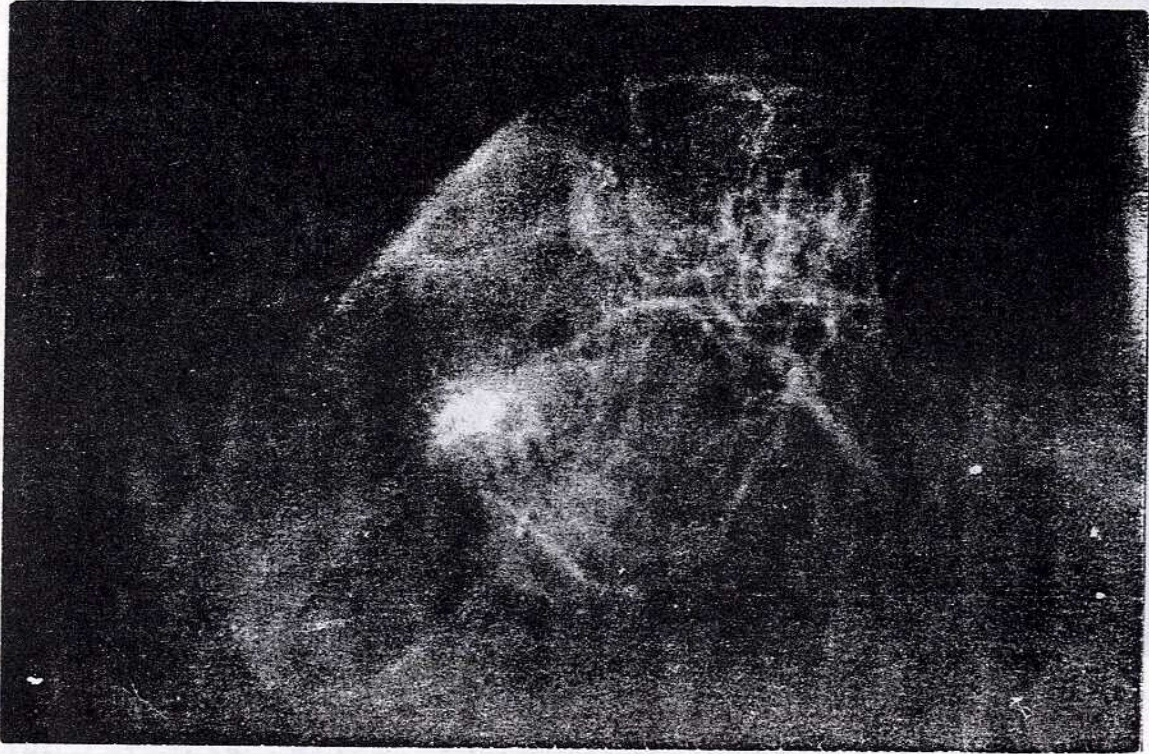
Resim I- Emboli öncesi Tavşanda sağ karotis angiografi görünümü.



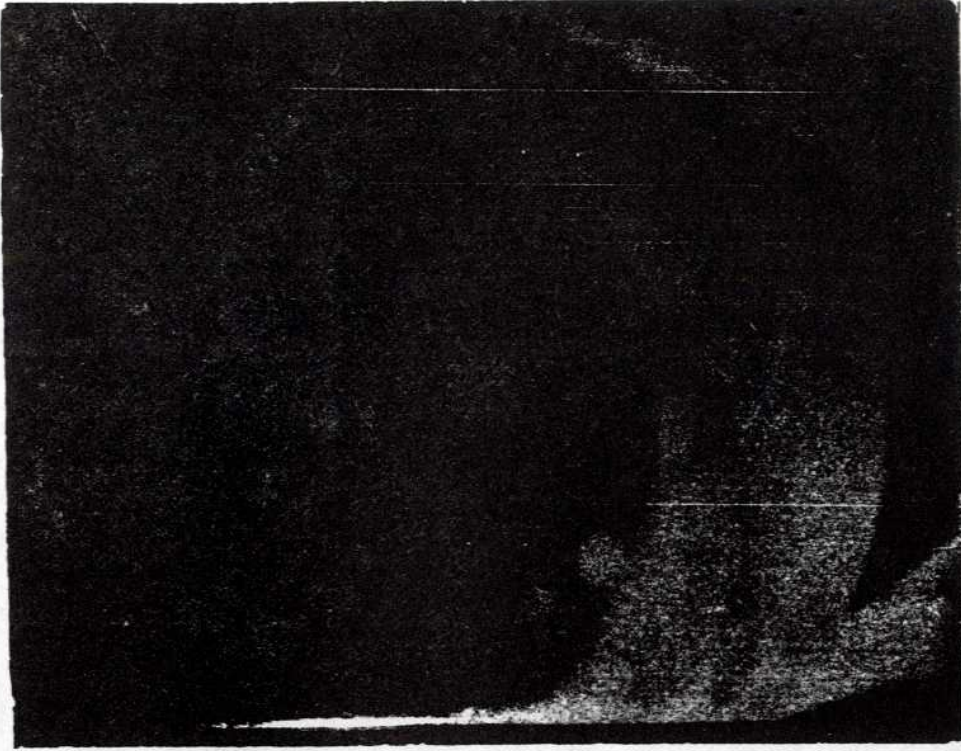
Resim II- Emboliden 10 dakika sonraki angiografide a. oksipitalenin ve internal karotid arterin dolmadığı gözleniyor.



Resim III- Emboliden 30 dakika sonraki angiografide internal karotis arter proksimali görülebilmektedir, eksternal karotis arterin superfisial temporal arter proksimalinden tıkanığı gözleniyor.



Resim IV- Emboliden 300 dakika sonra normal angiogram.



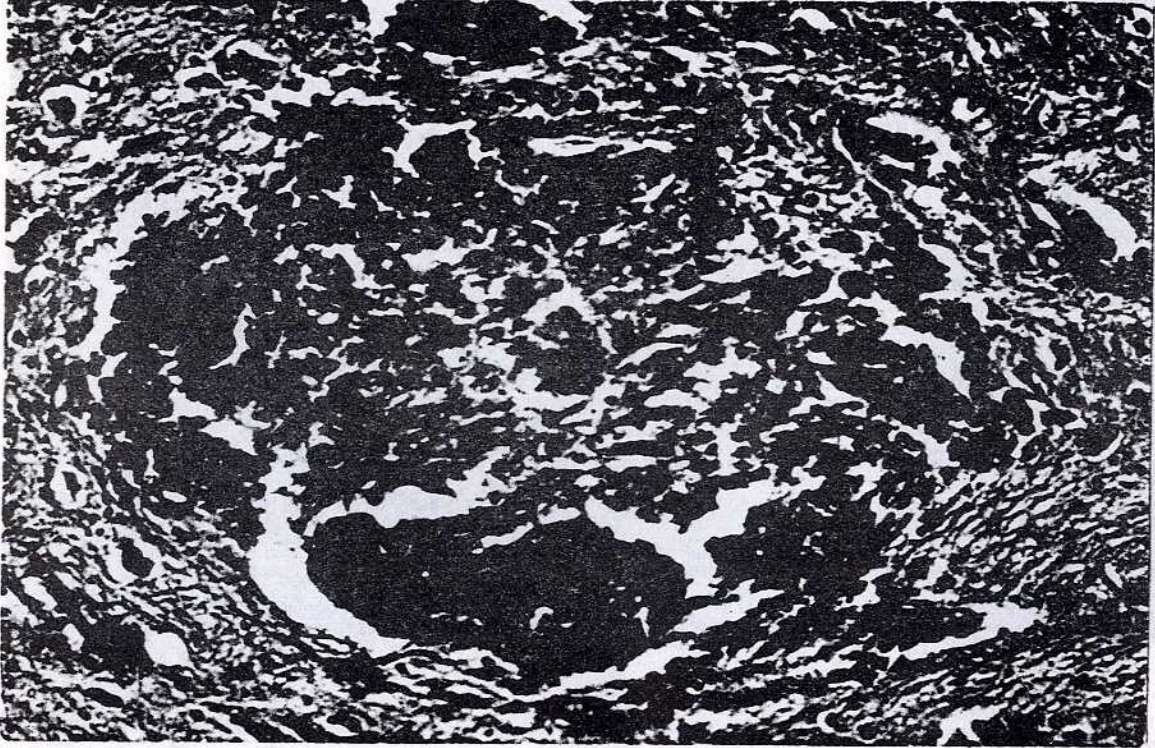
Resim V- Emboli öncesi tavşanda fundoskopik görünüm



Resim VI- Emboliden 25 dakika sonraki fundoskopik görünüm.



Resim VII- Emboliden 45 dakika sonraki fundoskopik görünüm.



Resim VIII-İnfarkt alanının histopatolojik görünümü.

(H.E., 10X)

na, enjeksiyon tekniklerine ve embolizasyon sonrası deneklerin yaşam süresine bağlı olduğu düşünülmektedir. Nekroz hacimlerini karşılaştırmak için ise embolizasyon tekniği, embolizasyon sonrası yaşam süresi, infarkt hacim ölçüm yöntemi aynı olan araştırmalar bulunamadığı için sağlıklı karşılaştırmalar yapılamamıştır.

Mevcut çalışmada sunulan deneysel serebral embolizm modelinin ucuz, pratik ve kliniğe uygun olması nedeni ile özellikle serebral iskemi tedavisi için yapılacak araştırmalarda faydalı bir yöntem olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- 1- Molinari, G.F., Laurent, J.F.: A classification of experimental models of brain ischemia. Stroke. 7:14-17, 1976
- 2- Penar, P.L.: A model of embolic cerebral ischemia in the Rat. Experimental Neurology. 96: 393-405, 1987.
- 3- Yamori, Y.T., Horie, H.H., Sato, M., Fukase, M.: Pathogenic Similarity of Strokes in Stroke-prone Spontaneously Hypertensive Rats and Humans. Stroke. 7: 46-53, 1967.
- 4- Jeynes, B.J., Warren, B.A., Cerebral Atheroembolism: An Animal Model. Stroke. 13:312-318, 1982.
- 5- Kudo, M., Aoyama, A., Ichimori, S., Fukunage, N.: An Animal Model of Cerebral Infarction: Homologous blood clot emboli in rats. Stroke. 13:505-508, 1982.
- 6- Kaneko, D., Nakamura, N., Ogawa, T.: Cerebral Infarction in Rats Using Homologous Blood Emboli: Development of a New Experimental Model. Stroke. 6:76-84, 1985.

- 7- Nedergaard, M.: Transient Focal Ischemia in Hyperglycemic Rats in Associated with Increased Cerebral Infarction. Brain Research. 408: 79-85, 1987.
- 8- Burrow, D.D., Toole, J.F.: Pathophysiology and clinical Evaluation of Ischemic Vascular Disease. Transmission. Youmans, J.R (ed), Neurological Surgery 2 nd. ed, Volume 3. Philadelphia, W.B. Saunders Company 1511-1558, 1982.
- 9- Okada, Y., Shima, Y., Yokoyama, N., Uozumi, T.: Comparison of Middle Cerebral Artery Trunk Occlusion by Silicone Cylinder Embolization and by Trapping. J. Neurosurgery. 58:492-499, 1983.
- 10- Fisher, C.M.: Observation of the fundus Oculi in the transient monocular blindness. Neurology. 9:333-347, 1959.
- 11- Dalal, P.M., Shah, P.M., Alyar, R.R.: Angiographic study of Cerebral Embolism. Lancet. 2: 358-361, 1965.
- 12- Kogure, K., Busto, R., Scheinberg, P., Reinmuth O.M.: Energy Metabolites and Water Content in Rat Brain During the Early Stage of Development of Cerebral Infarction. Brain. 97: 103-114, 1974.
