

Orta Serebral Arter (OSA) Oklüzyonu Sonrası Fokal Serebral İskemi. Teknik ve Nöropatolojik İnceleme

Kaya AKSOY*
Ender KORFALI**
İmran SAFİ***
Muammer DOYGUN*
Tuna GÖKIRMAK****

ÖZET

Suptemporal kraniyektomi yapılarak orta serebral arter oklüzyonu meydana getirilen sıçanlarda infark sahası 2, 3, 5, Triphenyl Tetrazoliumchloride (TTC) ile boyanarak incelendi. Fokal serebral iskemi modelinin kolay temin edilebilen ucuz küçük laboratuvar hayvanlarında oluşturulmasının yararları ayrıca TTC ile boyanarak infarkt alanının kolaylıkla gösterilebilmesinin faydaları literatürle karşılaştırılarak tartışıldı.

SUMMARY

Focal Cerebral Ischaemia Following Middle Cerebral Artery Occlusion. Technique and Neuropathological Consequences

In the present study the infarct area which was produced in the rat by occluding the middle cerebral artery through a small subtemporal craniectomy was evaluated with 2, 3, 5 Triphenyl tetrazolium chloride (TTC) as an histopathological staining for identification of infarcted tissue. The advantage of occluding middle cerebral artery in small cheap reproducible experimental animals and the effectiveness and accuracy of staining with TTC for the detection of infarction in cerebral tissue were discussed with review of literature.

* Yard. Doç. Dr.; U. Ü. Tıp Fak. Nöroşirurji Anabilim Dalı.

** Prof. Dr.; U. Ü. Tıp Fak. Nöroşirurji Anabilim Dalı.

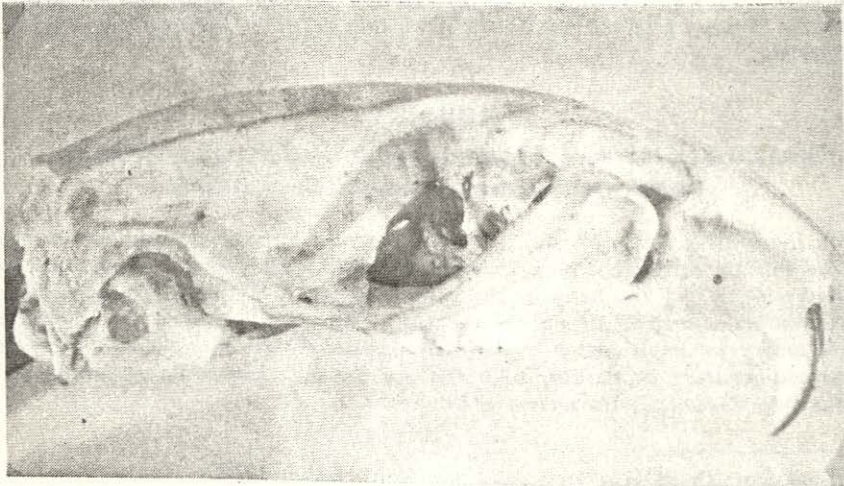
*** Dr.; U. Ü. Tıp Fak. Nöroşirurji Anabilim Dalı.

**** Stj. Dr.; U. Ü. Tıp Fak.

Retrospektif olarak yapılan çalışmalar stroke'da infarkt oranının % 75 olduğunu göstermektedir^{1.2.3}. Bu durum infarktın önemli bir olay olduğunu ve deneysel değişik infarkt modelleri geliştirilerek detaylı bir şekilde patolojinin incelenmesi gerektiğini göstermektedir^{4.5}. Deney hayvanlarında tek arter tıkanması ile oluşturulan infarkt modellerinde serebral kan akımı, beynin elektrik aktivitesi, infarktın biyokimyasal etkileri, kan-beyin bariyerine tesiri, intrakranial basınçta meydana getirdiği değişiklikler ve tedavide kullanılan veya yeni farmasetik ajanların etkilerini incelemek mümkün olabilmektedir^{5.6.7}. Bu çalışmada, sıçanlarda subtemporal kraniektomi yoluyla OSA oklüzyonu yapılarak ortaya çıkan infarkt sahası TTC ve diğer yöntemlerle boyanılarak araştırıldı.

MATERYAL VE METOD

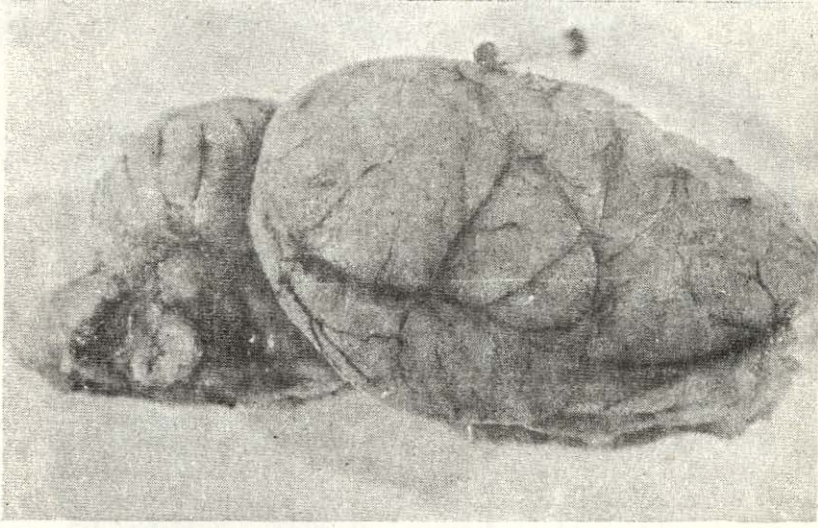
Erişkin Norvegicus/Albino cinsi erkek (200-250 gr) sıçanlar sodium pentotal (30 mgr/kg) intraperitoneal (İP) verilerek uyutulduktan sonra trakeotomi yapılarak volüm kontrollü ventilatöre bağlandılar ve PCO₂ 35-35 mm Hg, PO₂ 90-100 mm Hg seviyelerinde stabil kalacak şekilde solunum hızları ve volümleri ayarlandı. Femoral ven kateterize edilerek kan örnekleri alındı, gerektiğinde mayı infüzyonu yapıldı. Sıçanların vücut ısıları rektal termometre ile kontrol edilip ısıtıcı lamba ile 37-38 derecede korundu. Sıçanlar yüzükoyun pozisyona alınıp eksternal meatusdan orbitaya doğru oblik seyreden 1.5 cm lik cilt ensizyonu yapıldı. Temporal adele superior posterior bölümünden kesilerek subtemporal kemikten künt diseksiyonla sıyrıldı. Temporo- mandibuler eklem açılıp mandibulanın koronoid çıkıntısı görüldü. Zigma arkusu ile bu eklem arasından girilerek infratemporal fossa explore edildi. Bu safhada mikroskop kullanılarak pterigoid adele üzerinden geçen mandibular sinir görüldü mediale ve posteriora kadar takip edilerek foramen ovale görüldü (Resim: 1). 2 mm lik drill ucuyla foramen ovalenin 3 mm anterior ve 1 mm lateraline 2-3 mm lik kraniektomi yapıldı. Dura 23 no iğne ucuyla açılarak OSA görüldü. Olfaktor



Resim: 1

Sıçan kafatasında foramen ovale ve ön tarafında kraniektomi bölgesi

traktın lateral kısmını yapan myelinli beyaz band görülerek bunun üzerindeki rinal korteksin kortikal dalları ile lateral striate arterin arasındaki bölümden OSA ince uçlu bipolar forsepsle koagüle edilerek oklüze edildi (Resim: 2). Arterin tam oklüze olduğundan emin olunduktan sonra küçük bir gelfoam parçası ile beyin dokusu örtülerek cilt sütüre edildi.



Resim: 2

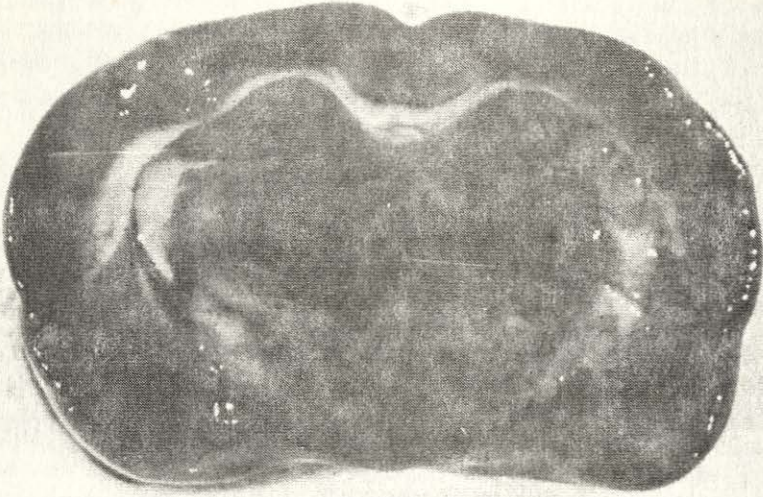
Sıçan beyininde vasküler dağılım, orta serebral arterin görünümü

Deney grubunu teşkil eden 10 sıçanda OSA arter oklüzyonu yapıldı. Kontrol grubunu teşkil eden 5 sıçanda ise bütün cerrahi girişimler deney grubunda olduğu şekilde yapıldı fakat OSA arterleri koagüle edilmedi. Her iki gruptada 4 saat beklendikten sonra sıçanların beyinleri dekapite edilerek çıkarıldı. Çıkarılan beyinler 2 lt distile su içinde 25 gr sodyum fosfat dibazik ve 0.25 gr sodyum fosfatın eritilmesiyle elde edilen ve sodyum hidroksilaz ile Ph'ı 8.5-8.6 ya ayarlanan fosfat tampondan 25 ml alınarak ve içine 25 mg TTC ilave edilen eriyik içerisinde 37-40 derecede 30 dak. tutuldu. TTC nin infarktlı sahada tutulmayıp normal perfüze olan kortikal ve derin beyin yapılarındaki kırmızı rengi almasına bakılarak infarktın olduğu sahalar ölçüldü. Resimler elde edildikten sonra beyin kesitleri 2.5 lt % 10 formalin + 17.8 gr sodyum klorürden oluşan formol-salin solüsyonu içinde bekletildi. Daha sonrada parafin bloklardan kesitler yapılarak histopatolojik incelemeye alındı ve boyaları yapıldı⁸.

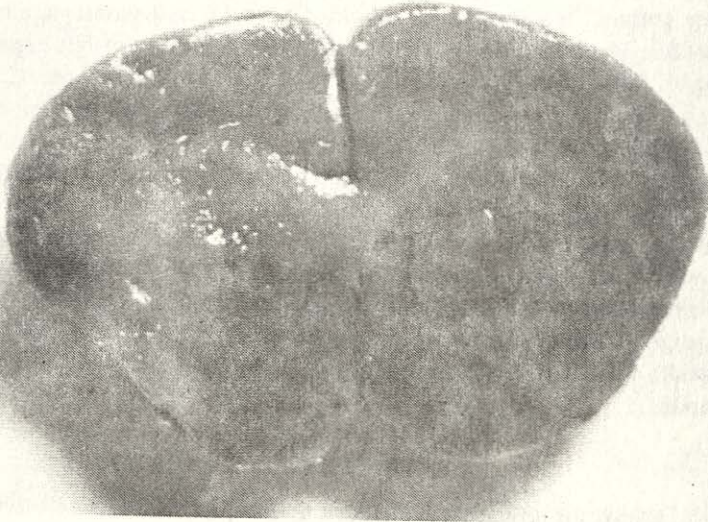
BULGULAR

Kontrol grubunu teşkil eden sıçanların hemisferlerinde hiçbir bölgede iskemi tespit edilemedi (Resim: 3). Orta serebral arter oklüzyonu yapılan gruptaki bütün sıçanlarda ise ipsilateral korteksin lateral konveksitesinde bütün yüzeyel ve derin yapı-

larda renk solukluğu TTC'den sonra gözlendi. TTC ile boyanan kesitler operasyon mikroskobu altında incelenerek infarktlı sahalarn genişliği saptandı. Ayrıca H&E ile boyama sonrası mikroskop altında infarkt genişliği görülerek korteks, sensori-motor, auditori korteks, bazal ganglionların tutuluşuna bakıldı. Koronel kesitlerde

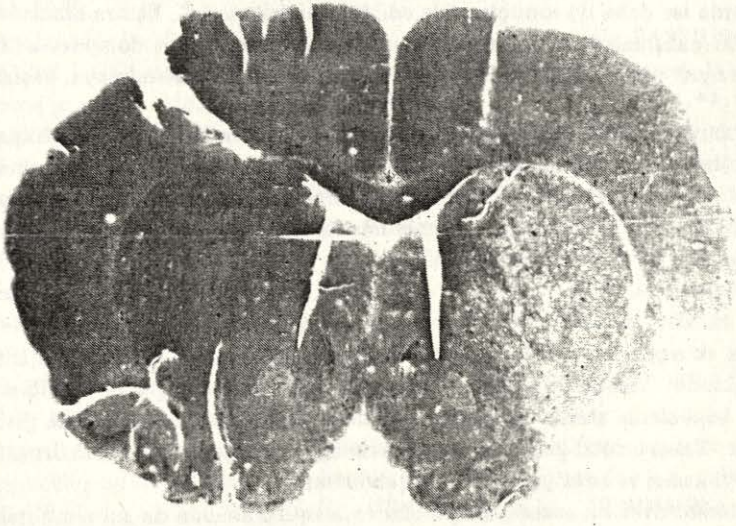


Resim: 3
TTC sonrası kontrol grubu koronel kesiti



Resim: 4
TTC sonrası infarktlı sahanın görünümü

frontal, sensorimotor korteks özellikle kaudat nukleusun lateral segmentini içeren bazal ganglionlarda infarkt gözlendi (Resim: 4-5). Hipotalamus, thalamus, subthalamik bölgeler, serebellum ve beyin sapında lezyona rastlanmadı. Histopatolojik kesitlerde kortikal yüzeyde koagülasyon nekrozu, içte glial proliferasyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve iskemik nöronal değişimler gözlendi. Koroner kesitlerde oluşan infarkttın genişliği açısından yapılan detaylı incelemede frontal bölgede % 100 (n: 10), senserimotor auditori kortekste % 70 (n: 7), kaudat nukleusun lateralinde % 100 (n: 10), medialinde % 40 (n: 4) infarkt gözlendi.



Resim: 5
*H*E sonrası infarkt sahası görünümü*

TARTIŞMA

Genel olarak iskemik modellerinde tercih edilen tek arterin kolayca çevre dokulara fazlaca travma yapılmadan oklüze edilebilmesi, insanda oluşan iskemiyeye yakın lezyon yapılabilmesi, beyin yüzeyinin dıştan hasarlanmadan ve atmosfer ile fazla teması olmadan oluşturulabilmesi, tedavi ajanlarının verilip sonuçların nörofarmakolojik ve histolojik olarak değerlendirilebilmesidir^{5,6}. Bu yönden genel olarak iskemik modellerinin gelişimine bakıldığında insana en yakın memeli hayvanlar öncelikle kullanılmış ve iskemik modeller bu tip hayvanlarda oluşturulmuştur^{6,9,10,11}. Daha sonra kedilerde, köpeklerde son yıllarda ise sıçanlarda aynı

modeller oluşturmaya çalışılmıştır^{4.6.7.12.13.14}. Ekonomik olarak ucuz ve kranial sirkülasyon anatomisi insana çok benzeyen sıçanlar iskemik model için denek olarak daha uygun görülmüştür^{4.15}. İskemik model geliştirmede başlangıçta memeli ve kemiricilerde ekstrakranial servikal arteriyel sistem ligasyonları kullanılmıştır^{4.6.16.17}. Unilateral arter ligasyonu ile kollateral dolaşım dolayısıyla yeterli infarkt elde edilememiş yalnız Merinos Unguiculatus'da posterior komminikan arterlerin yokluğu nedeniyle unilateral karotid ligasyonu ile hemisferik lezyon yaratılmıştır⁶. Birden fazla ekstrakranial arter ligasyonları ile infarkt oluşturulmaya çalışılmış fakat lezyonlu hemisferle, normal hemisfer kıyaslaması yapılamadığından bu yöntem geçerli olmamıştır^{13.18.19.20}. Bazı çalışmalarda homolog kan transfüzyonları ile kranial arter embolizasyonu tanımlanmıştır^{6.21.22}. Mortalite oranının fazlalığı, embolinin migrasyonu, infarkt sahasının genişliğindeki değişiklikler dolayısıyla tercih edilmemiştir. Küçük silikon parçaları kullanılarak yapılan embolizasyonlarda ise daha iyi sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir⁶. Ekstra kranial arterler üzerindeki çalışmalarla oluşturulan infarktların bu sakıncaları dolayısıyla intrakranial arteriyel oklüzyonlar memeliler ve kemiricilerde kullanılmaya başlanılmıştır^{11.23.24.25}.

Kranial olarak orta serebral artere yönelik cerrahi girişimler başlangıçta trans-orbital olarak yapılmıştır^{6.11}. Transkranial subtemporal kraniyektomi ile OSA oklüzyonu ise ilk defa 1981'de tanımlanmıştır⁴. Genç sıçanlarda orta serebral arterin oklüzyonu rinal fissürden denenmiş fakat yeterli infarkt oluşturulmamıştır²⁶. Sıçanlarda serebral hemisferik dolaşım genel olarak insanlara çok benzer olup anterior orta ve posterior serebral arterler kortikal ve bazal perforan branşları verirler. Her üç serebral damarda internal karotid arterden orijin alırlar^{15.21}. Bu benzerlik ve sıçanların kolay temin edilebilme özelliği bu girişimin avantajlarını teşkil etmektedir. Transkranial temporal yolun sıçanlardaki diğer bir tercih sebebi kedi ve köpeklerin aksine foramen ovalenin optik foramene göre daha geride yer almasıdır. Trans-orbital girişimde bu mesafe aşırı manipülasyon gerektirmekte, beyin yüzeyi hasarı ve arteriyel spazm oluşabilmektedir^{6.10.11}.

Literatürdeki bu avantajları yönünden araştırmamızda da subtemporal kraniyektomi yolu tercih edilmiştir. Bazı araştırmacıların aksine çalışmamızda, zigoma arkusu ve mandibulanın koronoid çıkıntısında alınmadan sadece temporal adele retraksiyonu ile temporal fossaya varılarak OSA oklüzyonu yapılmıştır. Bu yöntemin sağladığı diğer bir faydada mandibulaya dokunulmadığından sıçanların uzun zaman yatışılarak çeşitli ilaçların etkilerinin araştırılabilmesinin mümkün olmasıdır.

İlk defa 1894'de sentez edilen TTC 1958'den sonra infarkt sahasının tesbitinde kullanılmaya başlanmıştır. İrreversibl infarktın memeli dokularında kesin tesbiti TTC ile kolaylıkla yapılabilmektedir. Infarkt genişliğinin tesbiti açısından TTC ve HxE arasında önemli bir fark olmamasına karşın, erken dönemde infarktın tesbitinde TTC üstünlük göstermektedir⁸. 10 sıçanda OSA oklüzyonu sonucu oluşturulan infarkt sahası 4 saat sonrasında TTC ile % 100 tesbit edilebilmiştir. Ucuz ve kolay yapılabilirliği ve erken dönemdeki tesbit özelliği avantaj olarak görülmektedir.

Mongolian gerbilde oluşturulan iskemik modelde % 40 başarı şansı yanı sıra % 75 generalize epilepsi de yan etki olarak ortaya çıkmaktadır. Kedi ve köpeklerdeki OSA oklüzyonu lezyonun genişliğinin çok değişik olması, mortalite oranı fazlalığı ve zor bulunması sebebiyle sıçanlar tercih sebebi olmaktadır^{4.6}.

Mikroşirürjikal teknikle subtemporal kraniyektomi yapılarak temporal adele, zigoma, koronoid çıkıntı rezeksiyonu yapılmaksızın orta serebral arterin bulunup, oklüzyonu ile sıçanlarda iskemik model yaratılması diğer infarkt model yollarına göre istenilen sonucu yaratmakta ve kolay bulunabilen ucuz deneklerle istenilen çalışmalarla olanak sağlanmaktadır. TTC ile erken infarkt tesbiti yapılabilmektedir.

KAYNAKLAR

1. WALKER, G.B., MARX, J.L.: The national survey of stroke. Clinical findings. Stroke 12: 13-31, 1981.
2. ANDERSEN, G.L., WHISNANT, J.P.: A comparison of trends in mortality from stroke in the United States and Rochester, Minnesota. Stroke 13: 804-809, 1982.
3. KATZMAN, R., CLASEN, R., KLATZO, I., MEYER, J.S., PAPIUS, H.M., WALTZ, A.G.: Report of joint committee for stroke resources IV. Brain edema in stroke. Stroke 8: 512-540, 1977.
4. TAMURA, A., GRAHAM, D.I., MC CULLOCH, J., TEASDALE, G.M.: Focal cerebral ischemia in the rat. 1. Description of technique and early neuro pathological consequences following middle cerebral artery occlusion. J. of Cereb. Blood Flow and Metabol. 1: 53-60, 1981.
5. MOLINARI, G.F., MAURENT, J.P.: A classification of experimental models of brain ischaemia. Stroke 7: 14-17, 1976.
6. GARCIA, J.H.: Experimental ischemic Stroke. A review. Stroke 15: 5-14, 1984.
7. KOHURI, S., HEROS, R., WHYTE, T.H., VONSATTEL, J.P., MILLER, D., ZERVAS, N.: Comparison of the effect of fluosal DA and dextran 40 on regional cerebral blood flow, infarction size and mortality cats with temporary occlusion of the middle cerebral artery. Surg. Neurol. 26: 3-8, 1986.
8. BEDERSON, J.B., PITTS, L.H., GERMANO, S.M., NISHIMURA, M.C., DAVIS, R.L., BARTKOWKI, H.M.: Evaluation of 2, 3, 5-Triphenyl Chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. Stroke 17: 1304-1308, 1986.
9. ZABRAMSKI, J.M., SPETZLER, R.F., SELMAN, W.R., ROESSMANN, U.R., HERSHEY, L.A., CRUMRINE, R.C., MACKO, R.: Naloxone therapy during focal cerebral ischemia evaluation in a primate model Stroke 15: 621-626, 1984.
10. VAJDA, J., BRONSTON, N.M., LADDS, A., SYMON, L.: A model of selective experimental ischemia in the primate thalamus, Stroke 16: 493-500, 1985.
11. HUDGINS, W.R., GARCIA, J.H.: Transorbital approach to the middle cerebral artery of the squirrel monkey. A technique for experimental cerebral infarction applicable to ultrastructural studies. Stroke 1. 107-111, 1970.
12. WEINSTEIN, P.R., ANDERSON, G.G., TELLES, D.A.: Neurological deficit and cerebral infarction after temporary middle cerebral artery occlusion in unanesthetized cats. Stroke 17: 318-324, 1986.

13. KATAOKA, K., GRAF, R., ROSNER, G., HEISS, W.D.: Experimental focal ischemia in cats. Changes in multimodality evoked potentials as related to focal cerebral blood flow and ischemic brain edema, *Stroke* 18: 188-194, 1987.
14. COYER, P.E., LESNICK, J.E., MICHELE, J.J., SIMEONE, F.A.: Failure of the somatosensory evoked potential following middle cerebral artery occlusion and highgrade ischemia in the cat. Effects of hemodilution. *Stroke* 17: 37-43, 1986.
15. TYSON, G.W., TEASDALE, G.M., GRAHAM, D., MC CULLOCH, J.: Focal cerebral ischemia in the rat. Topography of hemodynamic and histopathological changes. *Ann. Neurol.* 15: 559-567, 1984.
16. EKLOF, B., SIESJO, B.: The effect of bilateral carotid ligation upon the blood flow and energy state of the rat brain. *Acta. Physiol. Scand.* 86: 155-165, 1972.
17. LEVINE, S.: Anoxia-ischaemic encephalopathy in rats. *Am. J. Pathol.* 36: 1-17, 1960.
18. CHEN, S.T., HSU, C.Y., HOGAN, E.L., MARICQ, H., BALENTINE, J.D., SCI, D.: A model of focal ischemic strokes in the rat. Reproducible extensive cortical infarction. *Stroke* 17: 738-743, 1986.
19. SALFORD, L.G., PLUM, F., BRIERLY, J.B.: Graded hypoxia-oligemia in rat brain. *Arch. Neurol.* 29: 227-233, 1973.
20. SIEGEL, B.A., MEIDINGER, R., ELLIOT, A.J., STUDER, R., CURTIS, C., MORGAN, J., POTCHEN, E.J.: Experimental cerebral microembolism. Multipl tracer assesment of brain edema. *Arch. Neurol.* 26: 73-77, 1972.
21. KANEKO, D., NAKAMURA, N., OGAWA, T.: Cerebral infarction in rats using homologous blood emboli. Development of a new experimental model. *Stroke* 16: 76-84, 1985.
22. HILL, N.C., MILLIKAN, C.H., WAKIM, K.G., SAYRE, G.P.: Studies in cerebro vascular disease. VII. Experimental production of cerebral infarction by intracarotid injection of homologous blood clot. Preliminary report staff meetings of the Mayo Clin. 30: 625-633, 1955.
23. SUNDT, T.M., WALTZ, A.G.: Experimental cerebral infarction. Retro-orbital, extradural approach for occluding the middle cerebral artery. *Mayo Clin. Proc.* 41: 159-168, 1966.
24. WALTZ, A.G.: Clinical relevance of models of cerebral ischaemia. *Stroke* 10: 211-213, 1979.
25. SUZUKI, J., YOSHIMOTO, J., TNAKA, S., SAKAMOTO, T.: Production of various models of cerebral infarction in the dog by means of occlusion of intracranial trunk arteries. *Stroke* 11: 337-341, 1980.
26. COYLE, P.: Middle cerebral artery occlusion in the young rat. *Stroke* 13: 855-859, 1982.

Yard. Doç. Dr. Kaya AKSOY
 Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi
 Nöroşirurji Anabilim Dalı
 BURSA