

ORTOPEDİK DENEYSSEL ÇALIŞMALARDA TAVŞANIN KULLANILMASI

Dr. Güven YÜCETÜRK

Ö Z E T

Ortopedik deneysel çalışmalarda, deney hayvanı olarak kullanılan
mesi konusunda genel bilgiler verildikten sonra anestezisi ve cerrahî
girişimler için gerekli koşullar belirtilmeye çalışılmıştır. Bunun dışında,
tavşan kemiğinin mikroskobik incelenmeye hazırlanmasında ve mik-
roskobik kantitatif değerlendirmede kullanılabilcek basit yöntemler
verilmiştir.

AMAÇ

İlk defa bir deney hayvanı ile çalışmaya başlayan herkesi oldukça karmaşık sorunlar beklemektedir. Deneysel çalışma merkezler ve bu işte yetişmiş uzmanların sınırlı olduğu ülkemizde, bireysel çalışmalar genellikle büyük zorluk ve karamsarlık içinde yapılabilmektedir. Bu zorlukları tatmış bir kişi olarak, bu konuda yeni çalışmaya başlayacak olanlara deneyimlerimi veya hiç olmazsa konu ile ilgili toplu literatür bilgisini aktararak yardımcı olmayı istedim .

TAVŞANIN DENEY HAYVANI OLARAK SEÇİLMESİNİN NEDENİ

Tavşan, uysal, temiz ve sessiz bir hayvandır. Aynı cins, ağırlık ve seksü bulmak, hattâ istenilen akrabalık derecesinde (F_1 , F_2 gibi) hayvan elde etmek olasıdır. Bakımı fazla güçlük göstermez. Ancak, bir deney hayvanı olarak bazı olumsuz yönleri de mevcuttur. Kemirgenler grubunun ne oranla aşırı hızı, uzun kemiklerin geniş medullaları ile genel olarak zayıflığı her zaman dikkate alınmalıdır. Diğer tüm hayvanlarda da olduğu gibi hamileliğin hormonal nedenlerle özellikle kemikler üzerinde yaratacağı değişiklikler düşünülerek erkek hayvanlar tercih edilmelidirler.

* Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Kürsü Doçenti

TAVŞANIN GENEL ÖZELLİKLERİ

Tavşanın hayvanlar arasındaki yeri;

Class : Mammalia

Order : Lagomorpha

Family : Leporidae

Genus : Oryctolagus

Species : Cuniculus şeklinde belirlenmektedir (4).

Yaklaşık 28 cins ve 77 çeşidi vardır. Özellikle orta boy tavşanlardan olan Beyaz Yeni Zelanda cinsi (yetişkin ağırlığı 2,5 Kg.) ile küçük boy tavşanlardan olan Hollanda ve Polonya tavşanları araştırmalar için elverişlidir. Yurdumuzda bol olarak yetiştirilen "British Angora" cinsi de rahatlıkla kullanılabilir.

Tavşanın üreme devresi 6 ay ile 3-4 yaş, hayat süresi 6-7 yıl kadardır.

TAVŞAN KEMİKLERİNİN ANATOMİK YAPISI

Ekstremiteler kemiklerinin anatomisi konusunda detaya inilmeyecektir. Disseksiyon ile gerekli bilgi sağlanabilir. Ancak konu ile ilgili geniş bilgi BENSLEY'in "Practical Anatomy of The Rabbit" isimli kitabından elde edilebilir (1).

Yapılacak deneysel çalışmanın gereğine göre daha önceden ölü birkaç tavşan üzerinde, kullanılacak bölgenin cerrahi girişim yer ve yönteminin planlanması uygun olur.

Tibia, ulaşılmasında ve internal tesbitindeki kolaylık, büyüklük ve düzgünlüğü nedeni ile kemik üzerinde yapılacak deneysel çalışmalar için önerilebilir. Tibia'ya orta bölümünde yapışık ve ince bir kemik olan fibula

Tavşanda vertebralar genel olarak C7, Th12, L7, S4, Co16 şeklinde formüle edilebilir (7). 12 çift costası vardır.

Eklem kıkırdağının yapısı mikroskobik olarak insanlardakini andırır. Kemikler aynen insanda olduğu gibi kartilajöz (ekstremiteler, gövde) veya membranöz (kafatası, yüz, klavikula) orijindir. Uzun silindirik kemiklerde ince bir kompakt korteks, ortada geniş bir medulla'yı, uçlarda ise kanselöz kemiği çevreler. Histolojik olarak karşılaştırıldığında göze çarpan en büyük farklılık, insan kemiğinde ana yapının osteonlardan, tavşan kortikal kemiğinde ise intertisiyel lamellalardan oluşmasıdır. Bunun dışında Haversian sistem ve osteositler, insan kemiğine oranla biraz daha büyük olarak bulunurlar (8).

TAVŞANIN BAKIMI VE BESLENMESİ

Tavşanlar, tabanları tavşan pisliğinin aşağı düşmesine izin veren 2,5 X 1 Cm. veya 1 X 0,5 Cm. çaplı, paslanmaz, delikli feslerde tutulmalıdırlar. İdeal olarak 2 Kg. lık bir tavşan için 0.14 m²., daha büyük olanlar için de 0.28 m². lik bir yere gerek vardır.

6-29 C. dereceleri arasında sıcaklıkta bulundurulabilirler. 18-25 C. dereceleri arası optimaldir (4).

Kafes altındaki pislikler hergün temizlenmelidir. Haftada bir defa, alkali olması nedeni ile bol kristal taşıyan ve kafese bulaşan idrari temizlemek üzere deterjan kullanılmalıdır.

Tavşanların eşit koşullarda beslenmesi deney sonucu yönünden önem taşır. Bunun için standart yemler kullanmak gereklidir. Biz, hayvanlarımızı "Yemta" yem farikası yapımı, "Palet" isimli standart hazır yemleri ile beslemekteyiz. Yem, tavşanın her 100 gramı için günde 5 Gm, (ortalama, günde 100-120 gm.) olacak şekilde hesaplanmalıdır. Su ise, vücut ağırlığının her 100 gramı için 10 mililitre/günde olacak şekilde ve kafese asılı özel emzikler yardımı ile verilmelidir.

TAVŞANIN ÖNEMLİ HASTALIKLARI

En önemli ve öldürücü hastalığı olan Coccidiosis, ishal, ateş, hızlı kilo kaybı ile seyreder. Büyük salgınlar yapar. Gaita muayenesi ile tanı konur. Tedavi için 15 gün süre ile "Sulfaquinaxaline Soluble" % 1 oranında, korunma için suyu içinde verilmelidir. Aynı şekilde, "Sulfameraz su içine ilâve edilebilir.

Üst solunum yolu infeksiyonlarında aşağıdaki antibiotikler belirtilen dozlarda kullanılabilir (4,5);

Chloramphenicol Succinate	30 mg/Kg/gün	I.M.
Peniciline G	40.000 Ü/Kg/gün	I.M.
Tetracycline	5 mg/Kg/gün	içme

su veya yem ile

TAVŞANIN ANESTEZİSİ

Ether ve Thiopental (Pentothal)'e karşı tavşan solunum merkezi fazla duyarlı olduğu için yüksek riskli anesteziklerdir. Ketamine 25 mg/Kg. muayene ve radyolojik incelemeler için kullanılabilir.

Entübasyonu oldukça zordur ve özel deneyim gerektirir. Seçilen en iyi genel anestezi, Pentobarbital (Nembutal) olup, 30 mg/Kg. intravenöz veya 40 mg/Kg. intraperitoneal verildiğinde yaklaşık 1,5-2 saatlik iyi bir anestezi sağlar (5). İntravenöz verilmiş daha etkili olmaktadır.

Operasyon için anestezi derinliğinin araştırılmasında bazı kriterler vardır. Solunum dakikada 18-24 olmalıdır (Normal 32-60). Bundan başka, karın kaslarının gevşemesi, ağız, konjektiva ve ayak parmak (toe pinch) reflekslerinin kaybı esastır. Fazla anestezi, göz yuvarlarındaki protrisyon, pupil dilatasyonu ve siyanoz ile anlaşılır (4).

TAVŞANIN DENEYE HAZIRLANMASI ve AMELİYATI

Deneeye alınacak tavşanlar en az bir hafta süre ile gözetimde kalmalı, hastalıklı olanlar ayrılmalıdır.

Ameliyat edilecek tavşan, önce yalnız başının dışarıda kalmasına izin veren özel tesbit kutuları içine yerleştirilir. Her iki kulağının dış tarafları ortadan başlayarak başla birleştiği bölüme kadar alkolle silinir ve tüyler bir bistüri yardımı ile kazınır. İki parmak ile kulak kökü sıkıştırılarak kulaktaki venlerin belirginleşmesi sağlanır. 23-25 gauge enjektör iğnesi ile önce deri altına sonra vene dikkatle girilir. İlaç deri altına kaçırılmamalıdır. Aksi halde kulağın nekrozuna, hattâ düşmesine neden olabilir.

Tavşanın ağırlığına göre hesaplanan total Nembutal dozunun 1/3'ü ven içine ağır ağır verilir. Böylece uyur hale geçen hayvan kuttandan çıkarılarak ameliyat bölgesindeki tüyleri rahatça temizlenir.

Tüyleri temizlemek için elde bu kinası (Oster Animal Clipper. Blade No: 40) yoksa, eğri bir ameliyat makası ile tüyler olabildiğince dipten kesilir, daha sonra Zefiran ile ıslatılarak bir bistüri ile kazınır. Bu işlem çok dikkat ve alışkanlık ister. Deri çok ince olduğu için kolaylıkla yırtılabilmektedir.

Bundan sonra tavşan ameliyat masasına alınır ve bölge tercihan Mersol ile boyanır, örtülür. Bu arada geri kalan Nembutal yine kula veninden yavaşça verilir. Anestezi altındaki tavşanın gözleri, serumla ıslatılmış küçük petlerle kapatılmalıdır. Bu yapılmazsa sonradan göz problemleri, hattâ körlük gelişebilmekte ve bu nedenle tavşan beslenememektedir.

Bu hazırlıklardan sonra planlanan ameliyata geçilir. Kemikler incede olduğu için önerilebilir. Bizim deneyimlerimize göre, yaranın arad Rifocyn'li serum ile yıkanması ve postoperatif 3 gün süre ile tavşanın içme suyuna bu ilacın konulması (200 cc suya 125 mg. Su her gün değiştirilerek) lokal infeksiyon olasılığını en aza indirmektedir.

Cilt dikişi ince ipek veya tel ile yapılmalıdır. Dikiş separe olmalı ve kısa kesilmelidir. Uzun kesilen ipeklerin tavşan tarafından koparılması ve yenmesi olasıdır.

Ameliyat bittikten sonra yara yerinin sarılması zordur. Çünkü çoğu zaman hayvan tarafından hemen parçalanmaktadır. Sprey Kollodyum kullanmak en uygundur. Biz bunu temin edemediğimiz zaman, "UHU" ve benzeri yapışkanları kullandık ve yara yerinde bu maddelere bağlı bir infeksiyon veya toksik reaksiyon görmedik.

Deney hayvanlarının işaretlenmesinde en iyi yöntem kuşkusuz, her hayvanın ayrı ve işaretli kafeslerde tutulmasıdır. Bu yapılamıyorsa hayvanın doğrudan kendisini işaretlemek gerekir. Özel işaret yüzüklerinin sıklıklı çıktığı veya hayvanın ayağında nekroza neden olduğu görüldüğü için biz deney yaptığımız tavşanların kulak diplerine içten tel dikişle küçük plâkalar dikme yolunu seçtik. Tel dikişin çok sıkı veya gevşek olmaması ve kulak damarlarını ezmemesi gerekir.

TAVŞANDA RADYOLOJİK İNCELEME

Bazı yazarların belirttiği gibi, sessiz bir yerde tavşanı okşayarak onu sakinleştirmek ve ağrı vermeyen pozisyonlarda tutmak olasıdır (4). Bunun dışında 10 mg/Kg.. Nembutal intraperitoneal verilerek bu tip uygulamalar yapılabilir.

Yerine göre değişmekle birlikte, 2 Kg. lık bir tavşanda örneğin alt ekstremité kemikleri için uygun Rontgen dozu ; 35 KV., 21 MAS., 1/30 saniye şeklinde verilebilir (8).

TAVŞAN KEMİKLERİNİN MİKROSKOBİK İNCELEME İÇİN HAZIRLANMASI

Yüksek doz intravenöz Pentothal enjeksiyonu ile tavşan öldürülür. Deney bölgesi çevre doku ile birlikte ayrılır. Daha seksiyon ile yumuşak dokulardan temizlenir. Gereğinden büyük kemikler bir kıl testeresi ile istenilen boyutta kesilebilir.

Eğer özel bir inceleme için hazırlanmıyorlar ise, bu parçalar numaralı şişeler içine alınır. Tesbit, dekalsifikasyon ve mikroskopik kesit için verilmiş bir çok formül vardır. Bunlardan en uygun iki tanesi aşağıda gösterilmiştir (6,8).

İlk formül :

- | | |
|---|---------|
| 1 — Bouin Solüsyonu (Satüre pikrik Asit 75.0 ml., % 40 lık Formaldehid 25.0 Ml., Asetik Asit 5.0 ml.) | 24 saat |
| 2 — Sulfosalisilik Asit | |
| 3 — Su | 24 saat |
| 4 — % 70 Alkol | 24 saat |
| 5 — % 80 Alkol | 24 saat |

6 — % 95 Alkol	24 saat
7 — Absolü Alkol	24 saat
8 — Ksilol	4 saat

Daha sonra parça parafin blok, kesit ve Hemotoksilin-Eosin boyası için hazırdır.

Diğer bir formül :

1 — % 10 Formaldehid	24 saat
2 — 0.6 N HCL	48-60 saat (Her gün asit değiştirilerek)

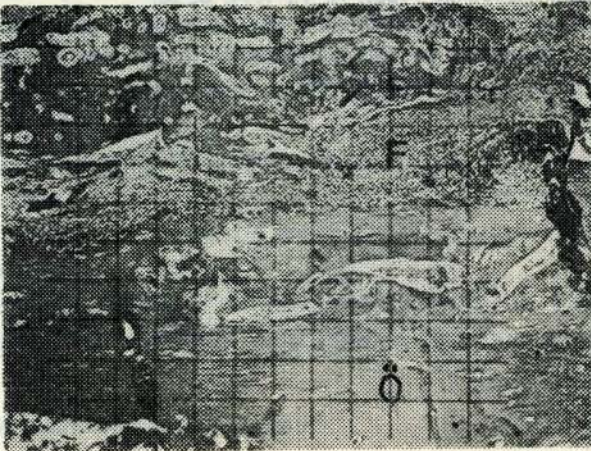
3 — Diğer basamaklar ilk formüldekinin aynıdır.

MİKROSKOBİK KANTİTATİF DEĞERLENDİRME

Mikroskopik görüntünün kantitatif olarak değerlendirilmesi araştırma sonucuna kesinlik kazandıracaktır. Bunun için pahalı ve özel cihazlar gerektiren bir çok karmaşık yöntemler varsa da, eldeki ışık mikroskobu ile yapılabilen verebilmektedir.

Değişik tip doku parçalarının bir arada bulunduğu mikroskopik kesitlerde kantitatif değerlendirme için, ana çizgileri ve matematiksel yapısı CHALKLEY (2) tarafından kurulan ve GARNER ve BALL (3) tarafından geliştirilen "Nokta Sayma Yöntemi" kullanılabilir. Bu yöntemde temel, hareketsiz noktalar altına düşen doku tiplerinin sayılması ve değişik bölgelerde işlemin tekrarlanarak sayılan toplam noktaya göre o doku tipinin yüzdesinin bulunmasıdır.

Mikroskopta belirli nokta görüntüsü elde etmek üzere, oküler içine, üzerinde 4 dikey, 4 yatay çizginin kesişmesi ile ortaya çıkmış 16 noktası bulunan bir cam disk yerleştirilir (3). Biz deneylerimizde 11 dikey 11 yatay çizginin kesişmesi ile 121 nokta bulunduran bir disk kullandık (8) (Tablo 1). Kesitin tümü, belirli bir plan dahilinde



küçük kaydırmalarla taranarak çok iyi bir sonuç elde edilebilir. Doku tipinin iyi tanınabilmesi için X 10 oküler ve X 3.2 objektif kullanılması önerilir.

S U M M A R Y

The purpose of this paper is to give some basic knowledges about the rabbit as an experimental animal, to the Orthopaedic Surgeons who work on this matter first.

In the first part of the paper, the anatomy, physiology and the husbandry of the rabbit was given.

In the second part, the preparation of the rabbit to the experiment, the methods of the anesthesia and operations, and the histological preparation methods of the rabbits bone were explained.

A method for quantitative appreciation of the cubic slide was showed in the last part.

K A Y N A K L A R

- 1 — BENSLEY, B. A. : Practical Anatomy of The Rabbit. 6. ed., P. Blakiston's Son and Co. Inc., Philadelphia, 1968. S. 173.
- 2 — CHALKLEY, H. W. : Method For The Quantitative Morphologic Analysis of Tissues. J. Nat. Cancer Inst., 4: 47-53, 1943.
- 3 — GARNER, A., BALL, J. : Quantitative Observation on Mineralised and Unmineralised Bone In Chronic Renal Azothemia and Intestinal Malabsorbtion Syndrome. J. Path. Bact., 91:545, 1966.
- 4 — HARKNESS, J. E., WAGNER, J. E. : The Biology and The Medicine of Rabbits and Rodents, Lea and Febiger Inc., Philadelphia, 1977.
- 5 — HEALTH CENTER ANIMAL REOURCES DEPT. : Information Guide, 2. ed., University of Florida, Gainesville, 1976.
- 6 — MELBY, E. C. : Handbook of Laboratory Animal Science, Vol. II., C.R.C. Press. Ohio, 1976, S. 119.
- 7 — WEISBROTH, S. E., FLATT, R. E., KRAUS, A. C. : The Biology of The Laboratory Rabbit, Academic Press, N. Y., 1974, S. 50.
- 8 — YÜCETÜRK, G. : Otoklavize Otojenik ve Otoklavize Allojenik Kortikal Kemik İmplantları, Docentlik Tezi, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği, Bornova, İzmir, 1979.