

SIÇANDA AKUT FOKAL SEREBRAL İSKEMİ OLUŞTURULMASI VE BU DENEYSSEL MODELİN UYGUNLUĞUNUN ÇEŞİTLİ YÖNTEMLER İLE ARAŞTIRILMASI

M. İMER¹, N. ATEŞ², N. İZGİ³, Ç. BAYINDIR⁴, Z. ZIYLAN²

ÖZET

Santral Sinir Sisteminde nöronların normal fizyolojik fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri ancak, nöronları çevreleyen iç ortamın dengesi ile sağlanır. Kan-beyin bariyerinin çeşitli maddelere karşı seçici geçirgenlik göstermesi bu dengenin korunmasında önemli bir faktördür. Kan-beyin bariyeri fonksiyonunu bozan çeşitli patolojik süreçlerden önemli biri de iskemidir. Bunun için beyin iskemisinin patofizyolojisinin, özellikle iskemi sonucu ortaya çıkacak sekonder değişikliklerin aydınlatılması; bunları engelleyebilecek tedavilerin geliştirilmesini mümkün kılacaktır.

Bu amaçla, çalışmamızda sıçanda; OS 2 mm proksimalinden VCI'e kadar olan ACM parçasının bipolar koagülasyon yardımıyla oklüzyonu gerçekleştirildi. Uygulanan bu modelin fokal serebral iskemi oluşturması; nörolojik olarak Bederson Derecelendirme Sistemi ile izlendi. Kan-beyin bariyeri geçirgenliğindeki değişimler makroskopik olarak Evans Blue kullanılarak gözlemlendi. Ayrıca morfolojik değişimler, ışık mikroskobu yardımıyla değerlendirildi. Beyin dokusunda su oranının saptanması ve spesifik gravitenin ölçülmesiyle de iskemi sonucu gözlenen beyin ödeminin erken ve geç fazdaki oluşum mekanizması araştırıldı.

Bu yöntemlerle elde edilen sonuçların değerlendirilmesi, akut fokal serebral iskemi oluşturulmasında, kullandığımız modelin uygun ve yeterli olduğunu, ilerideki çalışmalarda da kullanılabileceğini gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Fokal Beyin İskemisi, Sıçan, Orta Serebral Arter

SUMMARY

ACUT FOCAL CEREBRAL ISCHEMIA IN THE RAT; EARLY AND LATE NEUROPATHOLOGICAL CHANGES

The normal physiological functions of the neurons in Central Nervous System are possible if there is equilibrium interior media around the neurons. Selectivity of the

1 T.Ü. Tıp Fakültesi Nöroşirürji A.B. Dalı, EDİRNE

2 İ.Ü. Tıp Fakültesi Fizyoloji A.B. Dalı, Çapa/İSTANBUL

3 İ.Ü. Tıp Fakültesi Nöroşirürji A.B. Dalı, Çapa/İSTANBUL

4 İ.Ü. Tıp Fakültesi Nöroloji A.B. Dalı (Nöropatoloji), Çapa/İSTANBUL

Blood-Brain barrier against to some substances is a very important factor to keep this equilibrium. Ischemia is one of the pathological process disturbing function of the Blood-Brain barrier. For this reason, the most recent studies related to the pathophysiology of brain ischemia, especially secondary changes following ischemia will help to create new treatment modalities.

We occluded part of the ACM from 2 mm. above OS to the VCI with bipolar coagulation in 30 rats. We followed focal cerebral ischemia neurologically by Bederson Scaled System and changes of Blood-Brain barrier using Evans-Blue dye. Morphological changes was evaluated with light microscope. Formation of the brain edema in early and late stages was found out to be present by determining water ratio in brain tissue and measuring of the spesific gravity.

As a result of our study, we showed that, this model is appropriate and sufficient to create acut focal cerebral ischemia and can be used further studies.

Key Words: Focal Brain Ischemia, Rat, Middle Cerebral Artery

GİRİŞ

Santral Sinir Sistemi travma ve hastalıklarında iskeminin oluşturduğu değişikliklerin önemli klinik sonuçlara yol açtığı ve bu değişikliklerin büyük kısmının sekonder olarak geliştiği bilinmektedir.

İskemi sonrası oluşacak değişikliklerin önlenmesi; bu olaylar zincirindeki fizyopatolojik mekanizmaların aydınlatılması ve bunlara yönelik çeşitli tedavilerin geliştirilebilmesiyle mümkündür.

Bu amaç ile, araştırmacılar bir çok hayvan türünde çeşitli iskemi modelleri oluşturmaya ve geliştirmeye çalışmışlardır (2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10). Modeller yardımıyla gerçekleştirilen araştırmalarla beyin iskemisinin ve sonuçlarının daha iyi anlaşılması sağlanmış, ancak hala alınacak çok yol olduğu da görülmüştür.

Biz de; kliniğimizde bir deneysel serebral iskemi modelini yerleştirmek, oluşturulan iskemi sonucu kan-beyin bariyerindeki yıkım derecesinin etkinliğini araştırmak, erken ve geç dönemde ortaya çıkan histopatolojik değişiklikleri ışık mikroskobu ile yorumlamak ve oluşan enfarkt alanını ölçülebilir bir değer olarak saptamak düşüncesinden yola çıkarak, bu çalışmayı gerçekleştirdik.

MATERYAL VE METOD

Çalışmamızda ağırlıkları 300-350 gr. arasında değişen 50 adet erişkin Sprague Dawley sıçan kullanıldı. Bu hayvanlar dört grupta toplandılar:

Kontrol Erken (K.E.) : 10 sıçan

Kontrol Geç (K.G.) : 10 sıçan

Deney Erken (D.E.) : 15 sıçan

Deney Geç (D.G.) : 15 sıçan

Anestezi için önce intraperitoneal yol ile 10 mg./kg. Xylazine ve 5 dakika kadar beklendikten sonra da 50 mg./kg. Ketamine Hydrochloride verildi. Anestezi uygulanana dek sıçanların gıda ve su alımları serbest bırakıldı.

Çalışmamızda, Tamura'nın cerrahi tekniği kullanılarak mikroşirürjikal yöntem ile Arteria Cerebralis Media (ACM)'nin, Olfaktor Striae 2 mm., proksimalinden Vena Cerebralis Inferior (VCI)'e kadar olan parçası bipolar ile yakılarak kapatıldı (18). Tamura'nın tanımladığı teknik ile gerçekleştirilen cerrahi işlem ortalama 18 dakika sürdü.

Kontrol grubunu oluşturan hayvanlara da deney grubu ile aynı koşullarda cerrahi işlem uygulandı. Bu grupta bipolar koagülasyon yöntemi ile ACM oklüzyonu gerçekleştirilmedi.

Nörolojik Değerlendirme: Tüm hayvanlar cerrahi işlemin ortalama 15. dakikasında tamamlanan ACM oklüzyonunu takiben anestezi etkisinin geçtiği andan (ortalama, anestezi başlangıcından 90 dakika sonra) öldürülünceye dek gözlem altında tutuldular.

Nörolojik muayenede Bederson Derecelendirme Sistemi kullanıldı (Tablo I). Erken dönem için sol ACM oklüzyonunun gerçekleştirildiği andan 2 saat sonra yapılan ilk nörolojik muayeneden hemen sonra toplam 25 (10 K.E., 15 D.E.) hayvan dekapite edildi. Geç dönem için ise, toplam 25 (10 K.G., 15 D.G.) hayvan ilk muayenelerinden sonra her iki saatte bir yeniden değerlendirilerek 24 ncü saatte yapılan son muayene sonrasında dekapite edildi.

Tablo I: Bederson Derecelendirme Sistemi (1).

GRADE	0	Gözlenen defisit yok
GRADE	1	Ön ekstremitte fleksiyonu
GRADE	2	Yandan itmeye azalmış direnç
GRADE	3	Güçsüz olan tarafa dönme eğilimi

Nöropatolojik Değişiklikler

(1) **Kan-Beyin Bariyeri Geçirgenliğinin İzlenmesi:** Tüm gruplardan beşer (toplam 20) sıçan her bir grup için belirlenen süreler dolduğunda (2 ve 24 saat) hafif eter anestezisi altında supin pozisyonda tespit edilerek penis veninden 2 ml. % 2'lik Evans Blue verildi. 15 dakika kadar beklendikten sonra dokuların tamamen boya materyalinden temizlenmesini sağlamak üzere göğüs kafesi açılarak sol ventrikülden her iki jugular ven kesildikten sonra 15 dakika kadar serum fizyolojik perfüzyonu gerçekleştirildi. Tüm hayvanlar hemen dekapite edildiler ve çok çabuk olarak çıkarılan beyin örneklerinin fotoğrafları çekildikten sonra taze hazırlanmış % 10 formalin içine konuldular.

(2) **Işık Mikroskobu İle Değerlendirme:** Gerekli işlemlerden geçirilerek hazırlanan kesitler Hematoksilen-Eosin ve nissl cisimciği boyası olan Krezil Viyole ile boyanarak nöropatolog tarafından değerlendirildi ve fotoğraflandı.

(3) **Beyin Dokusunun Su Oranı:** İskemik beyin hasarını takiben ortaya çıkan ve beyin ödemi nedeniyle oluşan beyin şişmesini gösterebilmek amacıyla her gruptan beşer hayvan üzerinde çalışıldı. Çıkarılan beyin örnekleri sağ ve sol yarımlar halinde, önceden ağırlıkları bilinen ve numaralanmış alüminyum kağıtlarda tartılarak kaydedildiler. Gerekli işlemleri takiben elde edilen değerler beyin dokusu su oranını veren formüle yerleştirildiler (19).

(4) **Spesifik Gravite:** Spesifik gravite kolonunun hazırlanması için Kerosen ve Bromobenzenin iki farklı miktardaki karışımı (20, 21), standart solüsyon olarak da bidistile suda eritilmiş K_2SO_4 kullanıldı (21). Beyin dokusunun su oranını hesaplamak için çıkarılan 20 beyin her iki yarımlarından alınan yaklaşık 1 mm^3 doku örnekleri ölçüm için kolonun içine atıldı ve 3 dakika bekletildikten sonra örneğin pozisyonu dereceli mezür üzerinden kaydedildi (22, 23).

(5) **Enfarkt Alanının Ölçülmesi:** Erken ve Geç deney gruplarından beşer hayvan ile çalışıldı. Daha önce anlatılan işlemleri takiben çıkarılan beyin örneklerine ilki frontal ucun 2.5 mm. arkasından başlayıp, 2 mm. aralarla enfarkt alanı bitene dek devam eden koronal kesitler yapıldı. Ameliyat mikroskobu kullanılarak her kesitin ve enfarkt sahasının hari-

tası milimetrik kağıt üzerine çıkarıldı. Her kesit haritasında enfarkt alanı mm² olarak hesaplandı.

Sonuçların değerlendirilmesinde Mann-Whitney-U ve Wilcoxon-Signed Ranks testleri kullanıldı. p'nin % 5'in altında olduğu değerler anlamlı olarak kabul edildi. Nörolojik muayene gruplarının kıyaslanması için ise Kolmogorov-Smirnov testi kullanıldı. Bu testte dmax = 0.16'nın, dt = 0.49 değerinden küçük olması hali anlamsız olarak değerlendirildi.

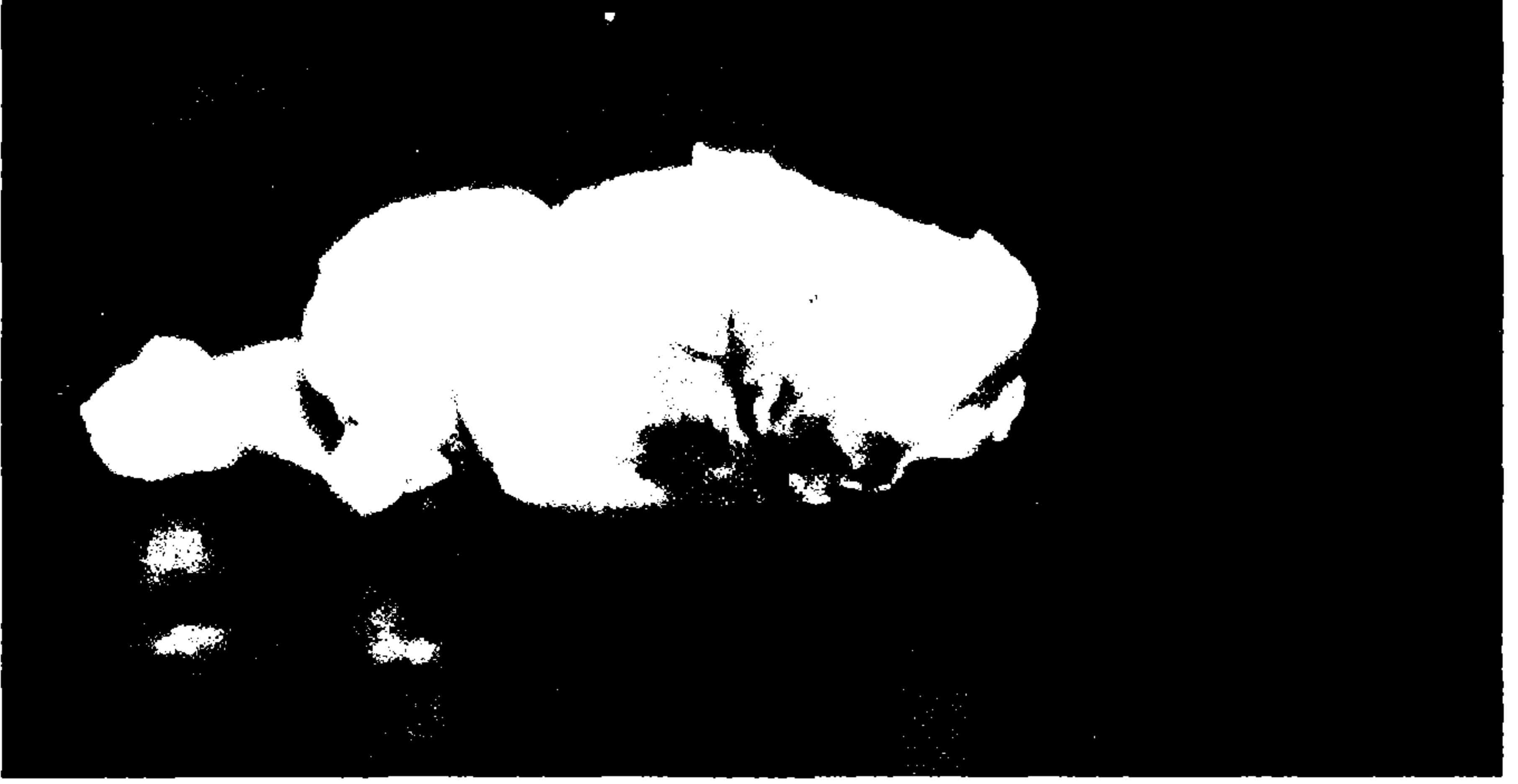
BULGULAR

Çalışmamızda kullanılan toplam 50 hayvana ait ACM oklüzyonunu takip eden 2. saatte yapılan ilk nörolojik değerlendirme sonuçları Tablo II'de gösterilmiştir. Kontrol grubunda yer alan hayvanlardan birinde 15 sn süren fokal karakterde epileptik bir nöbet gözlemlendi.

Tablo II: Tüm Hayvanların 2nci Saatte Yapılan İlk Nörolojik Değerlendirme Sonuçları.

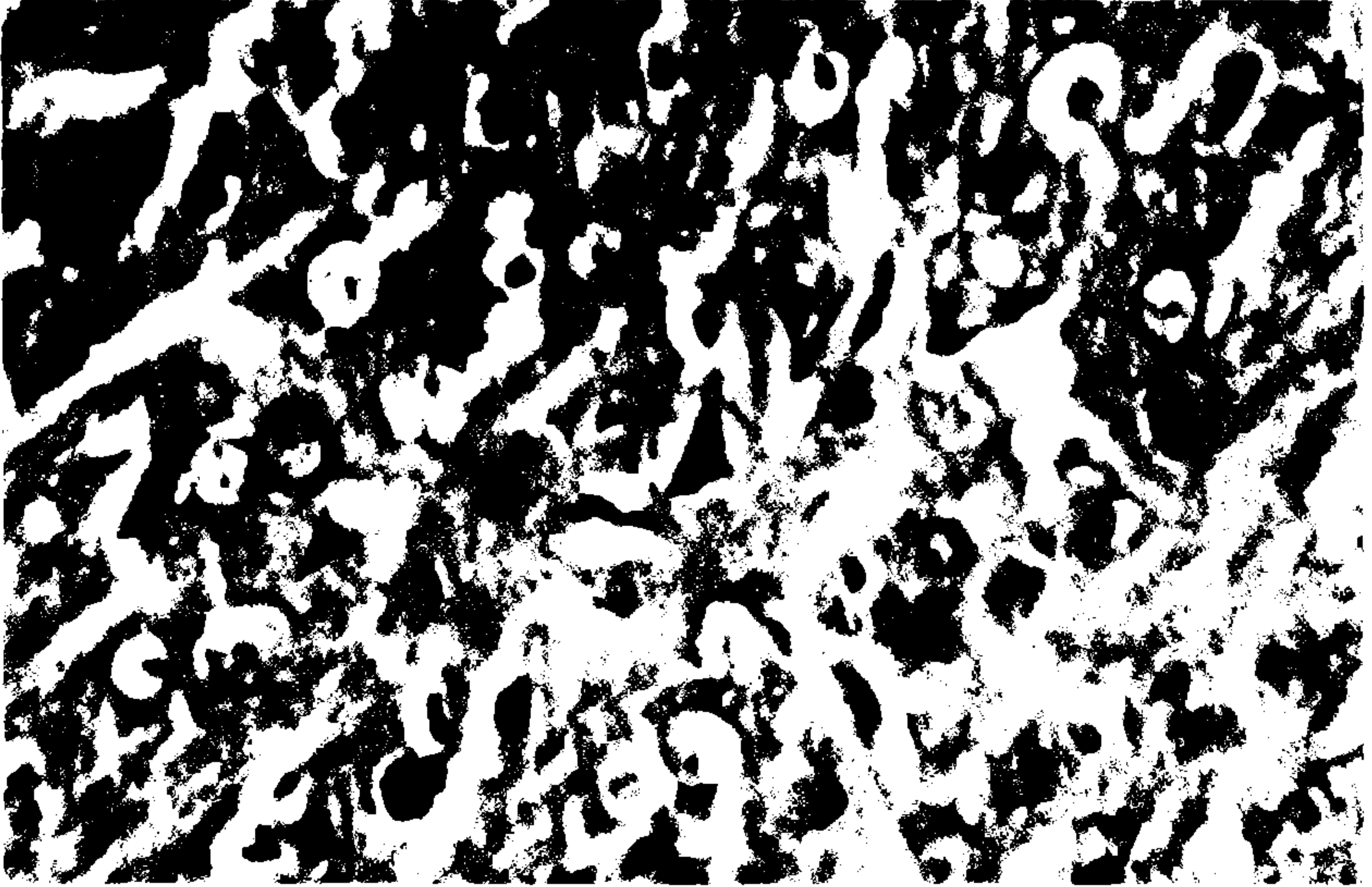
	GRADE 0	GRADE 1	GRADE 2	GRADE 3	
KONTROL					
Erken	10	-	-	-	10
Geç	10	-	-	-	10
TOPLAM	20	-	-	-	20
DENEY					
Erken	-	5	9	1	15
Geç	-	7	5	3	15
TOPLAM	-	12	14	4	30

Bipolar koagülasyon yöntemi ile sol ACM oklüzyonu gerçekleştirilen gerek beş D.E., gerekse beş D.G. toplam 10 hayvanın tümünde kan-beyin bariyeri geçirgenliğindeki artış, Evans Blue maddesinin damar dışına çıkması sonucu beyinin belirli bir bölgesinin mavi renge boyanması şeklinde izlendi (Resim 1). Kontrol grubunda yer alan on hayvanın ise hiçbirinde boyanma gözlenmedi.



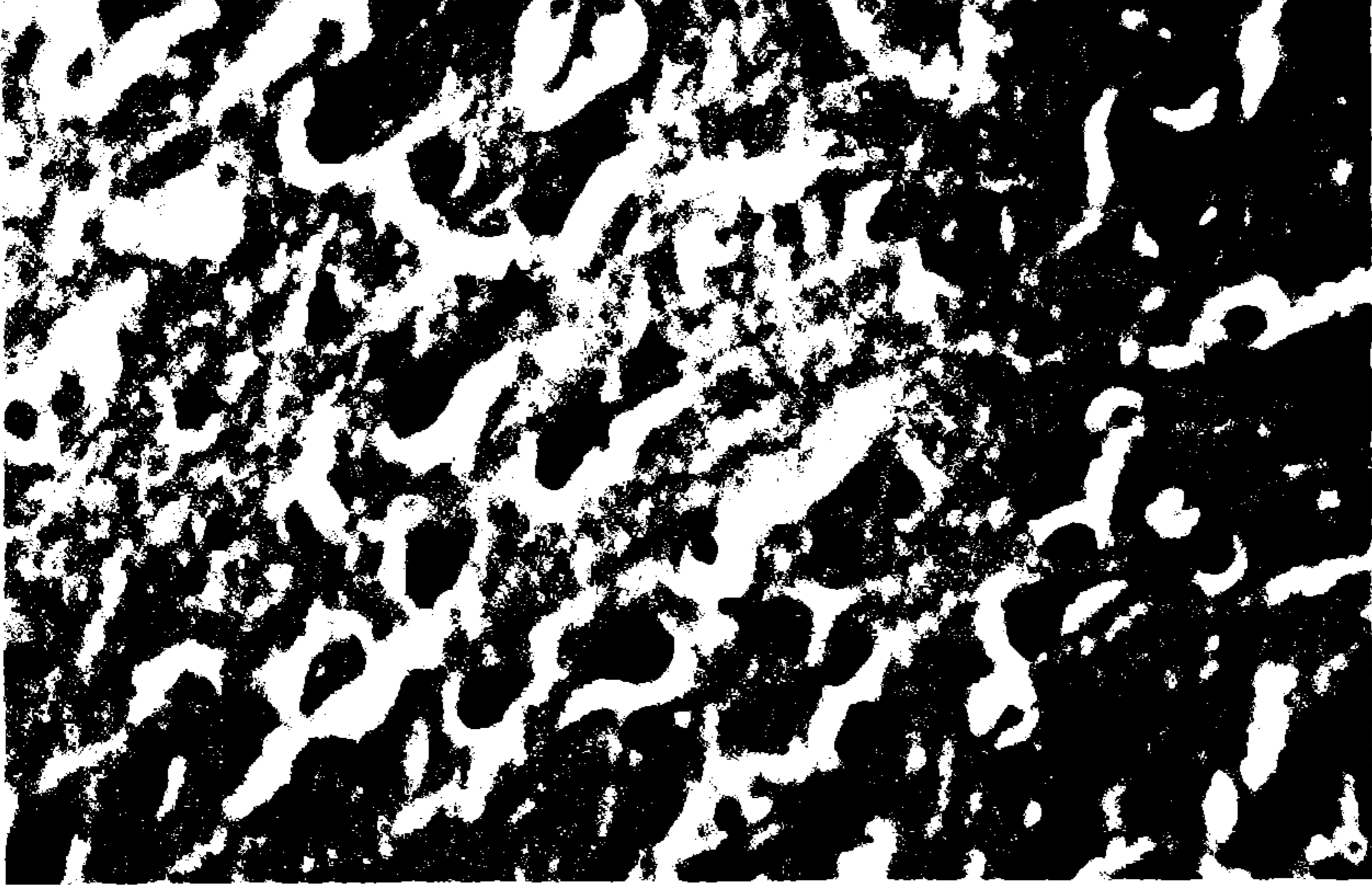
Resim 1. Evans Blue Testi ile Kan-beyin Bariyeri Geçirgenliğinin İzlenmesi.

D.E. grubundan beş hayvanın lezyon alanlarından hazırlanan parafin kesitlerin ışık mikroskopunda incelenmesi sonucu gözlenen değişiklikler; hücrelerde yaygın olarak nüve membranında silikleşme ve nüve kromatininde bulanıklaşma şeklindeydi. Ayrıca daha az sayıdaki hücrelerde ise nüvede büzülmenin yanında hiperkromazi mevcuttu (Resim 2).



Resim 2. (Erken Değişiklik) Lezyon Alanında Hücrelerde Şişme, Nüve İçeriğinde Bulanıklaşma ve Bazı Hücrelerde Üç Köşeli Görünüm. Hücre Periferinde Vakuolleşme (Krezil Viyole x 500).

D.G. grubunda yer alan beş hayvanın lezyon alanından alınan kesitlerde ise hücrelerin büyük bölümünde piknotik nüve ve hiperkromazi görüldü. Bu hücrelerde üç köşeli görünüm ile perisellüler boşluklar dikkatimizi çekti (Resim 3).



Resim 3. (Geç Değişiklik) Hücrelerin Çoğunda Büzülme ve Hiperkromazi, Büzülmüş Hücrelerde Üç Köşeli Görünüm. Hücre Periferinde Vakuolleşme (Krezil Viyole x 500).

Her grupta yer alan beşer hayvanın her iki beyin yarımları için bulunan beyin dokusunun su oranları Tablo III'de gösterilmiştir. Deney erken ve geç gruplardaki hayvanların sol beyin yarımları için bulunan ortalama oranın, sağ beyin yarımlarına kıyasla % 1.56 ve % 1.70 daha fazla olduğu görüldü. Bu sonuç istatistiksel olarak Anlamlı bulundu ($p < 0.05$).

Tablo III: Kontrol ve Deney Grupları; Beyin Dokusunun su Oranı Değerleri.

KONTROL (n = 10)				DENEY (n = 10)			
Erken (2 Saat)		Geç (24 Saat)		Erken (2 Saat)		Geç (24 Saat)	
SOL	SAĞ	SOL	SAĞ	SOL	SAĞ	SOL	SAĞ
68.04	68.17	67.56	68.89	70.05	65.60	71.31	68.13
67.52	68.64	68.20	66.20	68.01	67.12	67.26	66.92
67.97	66.54	69.57	67.58	69.51	68.84	71.06	68.70
68.54	69.71	66.45	68.26	70.37	68.65	69.95	67.87
67.43	68.64	69.30	70.27	70.29	70.19	68.27	67.73
67.90	68.34	68.21	68.24	69.64	68.08	69.57	67.87

Kontrol grubundaki hayvanların sol ve sağ beyin yarımaları ile deney grubundakilerin sağ beyin yarımalarından elde edilen ortalama spesifik gravite değerleri 1.047, 1.050 ve 1.048 olup istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Bu değerler bizim çalışmamız için normal kabul edildi. Her gruptan beşer toplam 20 hayvanın sol beyin yarımalarından elde edilen ortalama spesifik gravite değerleri Tablo IV'de gösterilmiştir. Deney geç grubunun değeri, kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ($p < 0.05$).

Tablo IV: Sol Beyin Yarımalarından Elde Edilen Ortalama Spesifik Gravite Değerleri ve Standart Sapmalar.

	KONTROL	DENEY
ERKEN	1.047 + 0.005	1.044 + 0.008
GEÇ	1.050 + 0.001	1.040 + 0.001

İskemi sonrası ortaya çıkan enfarkt alanlarının hesaplanması sonucu toplam 10 hayvanda elde edilen değerler arasında anlamlı fark saptanmadı ($p > 0.05$).

TARTIŞMA

Deneyssel olarak gerçeğe en yakın serebral iskemi modelini elde edebilmek için çeşitli hayvan gruplarında (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 17), çeşitli teknikler oluşturulmuştur (1, 19, 24, 25, 26, 27, 28, 29). Biz, çalışmamızda; serebral dolaşım sisteminin insandakine oldukça benzemesi, kolay bulunabilir ve ucuz olması gibi bilinen nedenlerle sıçan kullanmayı tercih ettik.

Sıçanlarda ACM oklüzyon fokal serebral iskemi ve takiben enfarkt bölgesinin oluşumuna neden olur (1). ACM oklüzyonu 1975 yılından bu yana yaygın olarak kullanılmaktadır (1, 19). Bu model, fokal serebral iskemi çalışmalarında birçok kez kullanılmış ve kendini kanıtlamıştır (1, 19, 23, 26, 30, 31, 33, 34, 35). Burada teknik olarak en önemli soru ACM'nin ne kadarlık bölümünün kapatılacağıdır. Bu soruya yanıt bulmak için yapılan ayrıntılı ve karşılaştırmalı çalışmalarda, % 100 oranında enfarkt olan ACM'nin başlangıcından ya da SO 2 mm. proksimalinden VCI'e kadar olan parçasının oklüzyonu ile elde edilmiştir (1, 19, 35).

Biz çalışmamızda ACM'nin SO 2 mm. proksimalinden VCI'e kadar olan parçasının bipolar koagülasyon yöntemi ile kapatılmasını tercih ettik. Bu modelin fokal serebral iskemi çalışması için iskeminin tüm hayvanlarda enfarkt ile sonuçlanması, uygulanmasının kolay olması, hemen her zaman belli bir enfarkt sahasının elde edilmesi ve mortalitenin hiç olmaması nedenleriyle uygun ve yeterli olduğunu bir kez daha doğruladık.

Cerrahi tekniğinin uygulanması sırasında Tamura ve bazı araştırmacıların da bahsettiği gibi adalenin genişçe kesilmesi ve mandibula koronoid çıkıntısı ile zigoma kemiğinin arka yarısının ronjör ile alınmasının belirli bir tecrübe elde edildikten sonra gerekli olmadığını biz de gördük (18, 26, 32, 36). Tekniğin bu modifikasyonu; travmanın daha az olması ve cerrahi işlemin daha kısa zamanda bitirilmesi gibi avantajlar sağlamanın yanında, oluşturulan iskemi sonrası hayvanların daha uzun üsreli izlenmesinin gerekli olduğu deneylerde, beslenmenin aksamamasını da sağlayacaktır.

Nörolojik Değerlendirme: Fokal serebral iskemi çalışmalarında sıçan modellerinin belli bir süre öncesine kadar kısıtlı olarak kullanılmasındaki en önemli nedenlerden biri tüm deney hayvanlarına uygulanabilecek objektif bir nörolojik değerlendirme olanağının bulunmamasıydı (1). Bugün hemiparezi gibi motor defisitlerin sıçanda frontal korteks ve striatum lezyonlarının bir sekeli olduğu ve defisitinin ağırlığının lezyon alanının büyüklüğü ile ilgili olduğu iyi bilinmektedir (1, 37, 38).

Nörolojik tabloyu enfarkt alanının büyüklüğüne göre ayırabilecek özellikte bir derecelendirme sistemi 1986 yılında Bederson (1) tarafından bildirilmiş ve birçok araştırmacı tarafından kullanılmıştır (28, 30, 37, 39, 40).

Bu oldukça kolay ve uygulanması açısından da objektif bir sistemdir. Çalışmamızda bulduğumuz sonuçlar, özellikle 2 nci saat sonunda bulduğumuz ilk değerler açısından başta Bederson (1) olmak üzere diğer bazı araştırmacıların (30, 37, 39, 40) sonuçlarıyla da kıyaslandığında büyük oranda uyumlu bulunmuştur.

ACM oklüzyonu ile fokal serebral iskemi oluşturulan hayvanların nörolojik değerlendirmeleri Bederson Derecelendirme Sistemi ile izlendiğinde zaman içerisinde iskeleyle ilgili nöropatolojik bulgular (hücre nekrozu) devam ettiği halde, hayvanların klinik yönden düzeldiği gö-

rülmektedir. Kaynaklarda da bu bulgularımızla uyumlu gözlemler saptadık (1, 30, 35).

Bederson Derecelendirme Sisteminin uygulanmasının kolay olması, ufak, orta ve geniş enfarkt sahası olan hayvanları ayırt edebilmesi nedenleriyle kullanışlı ve güvenilir bir sistem olduğuna katılıyoruz. Hayvanların tünününün tek kişi tarafından değerlendirilmesinin derecelendirme hatalarının mümkün olduğunca önüne geçebileceğine inanıyoruz.

Nöropatolojik Değişiklikler

(1) Kan-Beyin Bariyeri Geçirgenliğinin İzlenmesi: Bilindiği gibi büyük moleküllü birçok madde vücudun diğer interstisyel sıvılarına kolaylıkla geçebildiği halde, kandan Beyin Omurilik Sıvısı (BOS) ya da beynin interstisyel sıvısına geçemez. Bu nedenle arada kan-beyin bariyeri adı verilen bir engelin varlığı kabul edilmiştir. Bu bariyer bir kaç özel bölge dışında tüm beyin parenkiminde mevcuttur. Genelde kan-beyin bariyeri suya, karbondioksite, oksijene, alkole ve birçok anestezi gibi lipitlerde eriyen maddelere karşı çok; sodyum, klorür ve potasyum gibi elektrolitlerle suda eriyen maddelere karşı az geçirgendir. Plazma proteinleri ve birçok büyük moleküllü organik maddelere karşı geçirgenliği ise yoktur. Kan-beyin bariyerindeki bu seçici geçirgenliğin nedeni kapillerlerin endotelial hücrelerinin "tight junction" adı verilen bağlantı alanlarıyla birleşmeleridir. Bu, komşu endotelial hücre membranlarının, vücudun birçok diğer kapillerinde olduğu gibi aralarında "slit pore"lar olmasından ziyade birbiriyle kenetlenmiş olması halidir (41, 42).

Albumine bağlandığı için normalde kan-beyin bariyerini geçemeyen Evans Blue gibi maddelerin fokal iskemiden sonra kan-beyin bariyerini geçtiği gösterilmiştir (43). Evans Blue ile yapılan bazı iskemi çalışmalarında kontrol grubu (sham operated) hayvanlarda bile bazen kan-beyin bariyeri geçirgenliğinin arttığı izlenmiştir (1, 30, 35). Bundan da anlaşılacağı gibi kan-beyin bariyeri geçirgenliğindeki artışın izlenmesi için doğrudan kortikal hasar veya enfarkt oluşturulmasına gerek yoktur. Kranyektomi sırasında elektrikli drill kullanılması ve beyin retraksiyonu gibi dolaylı cerrahi travma bu sonuca neden olabilir. Bu sebeple; çalışmamızda, cerrahi işlem sırasında elektrikli drill ile tüm kemik katlarını geçmedik ve yalnızca ACM oklüzyonu sırasında bir-iki dakika süreyle beyin retraksiyonu yaptık. Çalışmamızda kontrol gruplarındaki (erken ve geç) hayvanlarda Evans Blue maddesinin damar dışına çıkışının ifadesi olan beynin maviye boyanmasını görmedik. Buna karşın de-

ney grubu hayvanların beynin bölgesel olarak boyandığını gördük. Bu sonuç bize, ACM oklüzyon sonrası oluşan iskemik değişiklikler nedeniyle; kan-beyin bariyerinde bozulma ve katı madde (plazma proteinleri, büyük moleküller) geçişinde artış olduğunu gösterdi.

Kan-beyin bariyerinin bozulması sonucu patolojik geçirgenlik artışının ne kadar süre ile devam ettiği sorusu ise tartışmalıdır ve kesin yanıt bugüne kadar bulunamamıştır (42). Yaptığımız çalışma bize Evans Blue geçişinin iskeminin 2 nci saatinde mevcut olduğunu ve 24 üncü saatte de hala devam ettiğini gösterdi.

(2) *Işık Mikroskobu İle Değerlendirme:* İskemide hücre değişiklikleri oksijen yetersizliği için karakteristiktir ancak kesin belirleyici değildir. Benzer değişiklikler akut beyin kontüzyonları ve virüs ensefalitleri gibi başka nedenlere bağlı beyin dokusu hasarlarında da gelişebilir (42). Spielmeier (44) iskemik hücre değişikliğini koagülasyon nekrozu olarak değerlendirmiştir. Daha sonra Monnighaft (45) ve Moegen (46) enzimlerle yaptıkları çalışmalarda gerçek bir koagülasyon nekrozunun söz konusu olduğunu göstermişlerdir. Colmant (47) ve Brierley (48) iskemik değişikliklerin, farklı dönemlerin birbirini izlediği dinamik bir olay olduğuna dikkat çekmişlerdir.

İskemik hücre değişikliklerinin ACM oklüzyonundan ne kadar zaman sonra başladığı ve oluşan morfolojik değişikliklerde ne zamana dek geriye dönüşün mümkün olduğu sorularına kesin yanıt henüz verilebilmiş değildir. Bazı araştırmacılara göre 1. saatte, bazılarına göre de 10. saate kadar, zaman diliminin herhangi bir anında bu değişiklikler ilk kez gösterilebilir (47, 49). Bu değişikliklerin, bir haftadan uzun bir süre gösterilebilir olduğu hatta "Ammon Boynuzu" arka bandı gibi bazı bölgelerde yedi ay kadar değişmeden kalabildiği bildirilmiştir (49). Yine bazı araştırmacılara göre mikrovakuolizasyon döneminde, bazılarına göre de hücre büzülmesi döneminde geriye dönüş mümkündür (42, 44, 47, 50).

Biz erken dönemde yer yer nüve membranında silikleşme ve nüve kromatininde bulanıklaşma gördük. Ayrıca bazı örneklerde nüvede büzülme dikkati çekiyordu. Geç değişiklik olarak da iskemik ganglion hücre nekrozu ve büzülmüş hücrelerde üç köşeli görünüm saptadık.

Bu değişiklikler daha önce yapılan çalışma sonuçlarıyla birlikte ele alındığında özellikle 2 nci saatteki erken dönem değişikliklerinin, daha önce yazılan iskemi sonrası sinir hücreesindeki ilk iki dönem değişiklik-

ler ile uyumlu olduğunu gördük. Ancak özellikle erken dönem için ışık mikroskobu ile elde edilen sonuçların çok kesin ve güvenilir olmadığı bilinmektedir (42). Bu nedenle ışık mikroskobu yerine elektron mikroskobu ile çalışmaların sürdürülmesi tavsiye edilmektedir (42, 51).

Gördüğümüz geç değişiklikler, iskemi sonrası değişikliklerdeki son üç dönemdeki bulgular ile uyumluydu. Çalışmamız bize somut olarak iskeminin yol açtığı değişikliklerin 24 üncü saatte mutlak gösterilebilir olduğunu kanıtladı. Ancak bu değişikliklerin geriye dönüşünün mümkün olup olmadığının ve sürenin belirlenebilmesi amacıyla daha fazla sayıda ve uzun süre yaşatılan hayvan gruplarıyla yapılan çalışmalara gereksinim vardır.

(3) *Beyin Dokusunun Su Oranı*: İskemi sonrası ilk önce ortaya çıkan ödem tipi vazojenik ödemdir. Vazojenik ödemin varlığı su miktarındaki artma, Evans Blue, "Horseradish peroxydase" geçişi ve histopatolojik bulgular ile kendini gösterir (52). Daha sonra tabloya hücre içi sıvı birikmesiyle karakterize sitotoksik ödem eklenir.

Serebral iskemi çalışmalarında beyin dokusunun su oranı tayini sıkça kullanılan bir yöntemdir (4, 19, 24, 53) ve bu yöntem spesifik gravite yöntemiyle birlikte bize oluşturulan iskemi sonrasında ortaya çıkan kan-beyin bariyeri geçirgenliğindeki artış sonucu sıvı ya da katı maddelerin transportu hakkında fikir verir (23, 53, 54).

Bu yöntemler kullanılarak bulunan değerler şimdiye kadar bildirilen çalışma sonuçlarında farklı bulunmuştur (4, 19, 23, 24, 53, 54), ancak burada önemli olan, normal değerlerden sapma oranıdır. Beyinde % 1'lik bir sapma bile anlamlı olarak kabul edilmektedir (4, 23, 24, 53, 54).

Çalışmamızda deney grubu erken ve geç dönem sol beyin yarımaları ortalama su oranlarını, aynı hayvanların sağ beyin yarımaları ortalama su oranlarına kıyasla anlamlı derecede yüksek bulduk (% 1.56 ve % 1.70). Ayrıca kontrol grupları sol beyin yarımalarıyla deney grupları sol beyin yarımaları ortalama su oranları arasında da anlamlı derecede fark vardı (% 1.36 ve % 1.74). Bu sonuçlar bize oluşan beyin ödeminin, ilk 24 saatte kan-beyin bariyerinden katı maddelerin geçişinden çok, sıvı geçişine bağlı olduğunu düşündürdü.

(4) *Spesifik Gravite*: Spesifik gravite doku komponentlerindeki değişiklikleri saptamak için yaklaşık 70 yıldır kullanılan bir diğer yöntemdir. 1924 yılında Hamilton ve Barbour (41) xylene ile bromobenzenden

hazırladıkları bir gradiyenti, daldırma tekniği ile kan spesifik gravitesini ölçmek için kullandılar. 1945 yılında Laury ve Hunter (41) serum protein düzeyinin spesifik gravite ile düzenli ölçümünü sağlayan kerosen-bromebenzen kolonunun tam hazırlanışını açıkladılar. Beyin ödemi ve diğer fizyopatolojik değişiklikleri araştırmak için spesifik gravite yönteminin kullanılışı 1971 yılında Nelson (41) tarafından tanımlanmıştır. Fujiwara'nın (21) çabalarıyla yöntem yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır. Bu şekilde bulunan sonuçlar ödemin tipini belirlemek açısından oldukça önemlidir.

Çalışmamızda fokal iskemi oluşturulan beyin yarımındaki su oranında erken ve geç dönemde belirgin artış bulmamıza rağmen spesifik gravite değerlerinde yalnızca geç dönemde anlamlı bir azalma saptadık. Erken deney grubundaki değer ise kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede farklı bulunmadı ($p > 0.05$).

Bu sonuçlar, beyin dokusunun su oranı sonuçlarıyla birlikte ele alındığında, bize oluşan beyin ödeminde; 2 nci saatte sıvı geçişinin önemli rol oynadığını ancak 24 üncü saatte kan-beyin bariyerinden sıvı geçişine eşlik eden katı madde girişinin de başlamış olduğunu gösterdi.

(5) Enfarkt Alanının Ölçülmesi: Çeşitli yöntemler ile oluşturulan fokal iskemi sonrasında ortaya çıkan enfarkt alanının hesaplanması yaygın olarak; nokta analizi yapan bilgisayar programları yardımıyla gerçekleştirilmektedir (1, 17, 25, 26, 28). Bu yöntem ile saptanan enfarkt alanı hacimleri ortalama 11.9-23.8 arasında değişmektedir (6, 8, 9).

Çalışmamızda, milimetrik kağıt ve ameliyat mikroskobu yardımıyla elde edilen kesitlerde Evans Blue çıkışı ile saptanan iskemi alanlarının haritası çıkarıldı ve bunlar kesit alanına oranlandı. Bu basit yöntem ile değerlerimiz erken dönem için ortalama 8.92, geç dönem içinse ortalama 12.56 bulundu.

Kullandığımız yöntem, teknik yetersizlik nedeniyle bize kesin bir değerlendirme olanağı sağlamamakta, ancak iskemi sonrası oluşan enfarkt alanı ile ilgili sayısal bir değer vermektedir.

SONUÇLAR

Sıçanda ACM'nin OS 2 mm proksimalinden VCI'ye kadar olan parçasının kalıcı kapatılması ile; her zaman belirli bir enfarkt alanı elde edilir ve mortalite yoktur.

Cerrahi tekniğin uygulanması sırasında belirli bir tecrübe elde edildikten sonra temporal adalenin genişçe kesilmesinin ve mandibula koronoid çıkıntısı ile zigoma kemiğinin arka yarısının alınmasının gerekli olmadığı görüşü bizim tarafımızdan da paylaşılmaktadır (Bu modifikasyon ile cerrahi teknik; daha kısa zamanda ve daha az travmatik olarak uygulanabilir, bu da hayvanların uzun süre yaşatılması gereken deneyler sırasında beslenme sorunlarının olmamasını sağlar).

ACM oklüzyonu yapılan hayvanlarda, Evans-Blue maddesinin damar dışına çıktığı görülmektedir. Buna neden olan kan-beyin bariyerindeki bozukluk 2 nci saatte mevcuttur ve 24 üncü saatte de devam etmektedir.

Fokal serebral iskemi sonrası ışık mikroskopisinde, yer yer iskeminin erken histopatolojik değişiklikleriyle ilgili bulgular saptamak mümkündür, ancak bunlar iskemiye has olmadığı gibi her kesitte de mutlak görülmemektedir.

İskemiden sonra 24 üncü saatte ise ışık mikroskobu ile iskemi için özel (Vakuolizasyon, inkrüstasyon ve ganglion hücre nekrozu) olabilecek bulgular mutlak olarak görülebilmektedir.

ACM oklüzyonu sonrası fokal serebral iskemi oluşan beyin yarımalarında erken ve geç dönemde (2 nci ve 24 üncü saatlerde) kontrol gruplarına ve karşı beyin yarımalarına kıyasla beyin dokusunun su oranında anlamlı derecede artış olduğu görülmektedir. Spesifik gravite yöntemi ile elde edilen sonuçlarda ise 24 üncü saatte anlamlı derecede düşüş izlenmektedir. Beyin dokusunun su oranı ve spesifik gravite sonuçları birlikte değerlendirildiğinde iskemi sonrası 2 nci saatte kan-beyin bariyerinin bozuk olduğu ve sıvı geçişine olanak sağlayarak ödeme neden olduğu, bu sıvı geçişinin 24 ncü saatte de devam ettiği ancak katı madde geçişinin de patolojik sürece eklendiği anlaşılmaktadır.

Yukarıda kullandığımız araştırma yöntemleriyle elde ettiğimiz sonuçlar, sıçanda ACM'nin OS 2 mm proksimalinden VCI'ye kadar olan bölümünün yakılarak kapatılmasının, deneysel akut fokal serebral iskemi için uygun olduğunu göstermiştir.

KAYNAKLAR

1. Bederson B.J., Pites H.L.: *Rat Middle Cerebral Artery Occlusion; Evaluation of the Model and Development of a Neurologic Examination*. Stroke 17: 472-476, 1986.

2. **Carter L., Yamagata S., Erspramer R.:** *The Limits of Reversible Cortical Ischemia.* Neurosurgery 12: 620-623, 1983.
3. **Colbassani J.H., Barbow D.L., Sweeney K.M., et al.:** *Modification of Acute Focal Ischemia in Rabbits by Poloxamer 188.* Stroke 20: 1241-1246, 1989.
4. **Dempsey R.J., Roy M.W., Meyer K., et al.:** *Polyamine and Prostaglandin Markers in Focal Cerebral Ischemia.* Neurosurgery 17: 635-640, 1985.
5. **Haradak K., Nakasu Y., Matsuda M., Handa J.:** *Effects of a New Ca^{2+} antagonist, KB-2796, on the regional Cerebral Blood Flow and Somatosensory Evoked Potentials in the Ischemic Brain in Cats.* Surg Neurol 30: 89-96, 1988.
6. **Korusue K., Heros R.C.:** *Comparison of crystalloids and collaids for hemodilution in a model of focal cerebral ischemia.* J Neurosurg 37: 576-584, 1990.
7. **Kumar K., Krause G.:** *Effect of flunarizine on Global Brain ischemia in the Dog: A Quantitative Morphologic Assessment.* Exp Neural 97: 115-127, 1987.
8. **Meier-Ruge W., Theodore D., Abraham J.:** *Enzymehistochemical Investigation of the pathogenesis of Ischemic Brain lesions in Primates and its Clinical Consequences.* Stroke and Microcirculation. New York, Raven Press, 1987.
9. **Meier-Ruge W., Theodore D., Abraham J.:** *Pathology of Ischaemic Brain Damage- Implications for therapy: Mechanisms of Cerebral Hypoxi and Stroke.* Edited by George Somjen. Plenum Pub. Corp. 1988.
10. **Nelson R., Mantz N.L., Maywell J.A.:** *Use of specific graitiy the measurement of Cerebral Edema.* J Appl Physiol 30: 268-271, 1971.
11. **Sakamoto T., Tanaka S., Yoshimoto T., et al.:** *Part 2: Electroencephalographic Changes Produced by Experimental Thalamic Infarction in Dogs.* Stroke 9: 214-216, 1978.
12. **Shiino A., Harada K., Handa J.:** *Focal Brain Ischemia Model in Rats. An Experimental Study.* Surg. Neurol. 31: 203-208, 1989.
13. **Waltz A.G., Sundt Jr. T.M.:** *The Microvasculature and microcirculation of the Cerebral Cortex after Arterial Occlusion.* Brain 5: 681-691, 1990.
14. **Wei E.P., Dietrich W.D.:** *Functional, Morphological and Metabolic Abnormalities of the Cerebral Microcirculation after Concussive Brain Injury in Cats.* Circ Res 46: 37-47, 1980.
15. **Yoshimoto T., Sakamoto T., Suzuki J.:** *Experimental Cerebral Infarction Part 1; Production of thalamic Infarction in Dogs.* Stroke 9: 211-214, 1978.
16. **Yoshimoto T., Sakamoto T., Watanabe T., et al.:** *Part 3: Protective Effect of Mannitol in Thalamic Infarction in Dogs.* Stroke 9: 217-219, 1978.
17. **Zeger E., Ames III A.:** *Reduction of celluler energy requirements: Screening for agents that may protect against CNS ischemia.* J Neurosurg 69: 568-579, 1988.

18. Tamura A., Graham D.I., McCulloch J., Teasdale G.M.: *Focal Cerebral Ischemia in the Rat: 1. Description of Technique and Early Neuropathological Consequences Following MCA Occlusion.* J Cereb Blood Flow Metab 1: 53-60, 1981.
19. Martz D., Beer M., Betz A.L.: *Dimethylthioures Reduces Ischemic Brain Edema without Affecting Cerebral Blood Flow.* J Cereb Blood Flow Metab 10: 352-357, 1990.
20. Marmarou A., Werner P.: *A Simple gravimetric technique for measurement of Cerebral Edema.* J Neurosurg 49: 530-537, 1978.
21. Nelson R., Mantz M.L., Maywell J.A.: *Use of specific gravity in the measurement of Cerebral Edema.* J Appl mPhysiol 30: 268-271, 1971.
22. Fujiwara K., Nitch C., Suzuki R., Klatzo I.: *Factors in the reproducibility of the gravimetric method evaluation of edematous changes in the brain.* Neurol Res 3: 345-361, 1981.
23. Olsson A.L., Westergren I., Johansson B.B. *Brain Edema after MCAO, A comparison between normotensive and spontaneously hypertensive cats.* Acta Neurol Scand 80: 12-16, 1989.
24. Abe K., Araki T., Kogure K.: *Recovery from edema and of Protein Synthesis Differs Between the Cortex and Caudate Following Transient Focal Cerebral Ischemia in Rats.* J Neurochem 51: 1470-1476, 1988.
25. Chem S.T., Hsu C.Y., Hogan E.L., et al.: *A Model of Focal Ischemic Stroke in the rat: Reproducible Extensive Cortical Infarction.* Stroke 13: 738-743, 1986.
26. Coyle P.: *Middle Cerebral Artery Occlusion in the Young Rat.* Stroke 13: 855-858, 1982.
27. Ikuza H., Sakatani K., Young W.: *Selective Cortical Neuronal Damage After Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats.* Stroke 20: 1516-1523, 1989.
28. Kawamura S., Yasu N.: *Therapeutic Effects of Hyperbaric oxygenation on acute Focal Cerebral Ischemia in Rats.* Surg Neurol 34: 101-106, 1990.
29. Nagasawa H., Kogure K.: *Correlation between Cerebral Blood Flow and Histological Changes in a new rat Model of MCA Occlusion.* Stroke 20: 1037-1043, 1989.
30. Bolander G.H., Persson L.: *Regional Cerebral Blood Flow and Histopathological Changes after Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats.* Stroke 20: 930-937, 1989.
31. Dimagl U., Kaplan B., Javewicz M., Pulsimelli W.: *Continuous Measurement of Cerebral Cortical Blood Flow by Laser-doppler Flowmetry in a rat Stroke Model.* J Cereb Blood Flow Metab 9: 589-596, 1989.
32. Hillered L., Hellström A., Segersuard S., et al.: *Dynamics of Extracellular Metabolites in the striatum after Middle Cerebral Artery Occlusion in the Rat Monitored by Intrecerebral Microdialysis.* J Cereb Blood Flow Metab 9: 607-616, 1989.
33. Jacewitz M., Kiessling M., Pulsinelli W.A.: *Selective Gene Exxression in Focal Cerebral Ischemia.* J Cereb Blood Flow Metab 6: 263-272, 1986.

34. Kameyama M., Suzuki J., Shirane., et al.: *A New Model of Bilateral Hemispheric Ischemia in the Rat. Three Vessel Occlusion Model* Stroke 16: 489-493, 1985.
35. Persson L., Hardemark H.G.: *Neurologic and Neuropathologic outcome after Middle Cerebral Artery occlusion in Rats.* Stroke 20: 641-645, 1989.
36. Tamura A., Graham D.I., McCulloch J., Teasdale G.M.: *Focal Cerebral Ischemia in the Rat: 2. Regional Cerebral Blood Flow Determined by (14_c) Iodoantypine Autoradiography Following Middle Cerebral Artery Occlusion.* J Cereb Blood Flow Metab 1: 61-69, 1981.
37. Longa Z.E., Weinstein R.P.: *Reversible Middle Cerebral Artery Occlusion without Craniectomy in Rats.* Stroke 20: 84-91, 1989.
38. Shigeno T., McCulloch J., Graham D.I., et al.: *Pure Cortical Ischemia Versus Striatal Ischemia (Circulatory, Metabolic and Neuropathologic Consequences).* Surg Neurol 24: 47-51, 1985.
39. Germano I.M., Bartkowskh H.M., Cassel M.E., Pitts L.H.: *The therapeutic value of minodipine in experimental focal cerebral ischemia.* J Neurosurg 67: 81-87, 1987.
40. Ryck M.D.: *Aminal Models of Serebral Stroke: Pharmacological Protection of Function.* Eur Neurol 30 (Supp. 2): 21-27, 1990.
41. Ateş N.: *Deneysel Konvulsiv Nöbetlerde Serebrovasküler geçirgenlik ve Beyin Su İçeriği Değişikliklerinde Hipertansiyonun Rolü.* Doktora tezi, İstanbul 1990.
42. Ule G.: *Pathologie des Nervensystems I.* pp. 49-137, Doerr siferst uehlinger, 1980.
43. Klatzo I., Ito U., Go G., Spatz M.: *Observations on experimental cerebral Ischemia in Mongolian gerbils. In pathology of the cerebral microcirculation, eds. Cervos-Navarro J., Matakas F., Bets E., Grecevc N.: pp. 338, Berlin-New York, De Gruyter, 1974.*
44. Spielmeyer W.: *Allgemeine Histopathologie des Nervensystems.* Berlin Springer. 1922.
45. Mönninghaft F.H.: *Untersichengen über die Autolyse der Zeilen bei "trüber Schwellung" und "Postmortaler kadeveröser Trübung".* Beitr-path-Anat. 102: 87, 1939.
46. Moegen P.: *Über die Wirkung von Proteinase auf koaguliertes gewebe.* Frankfurt. 2. Pat. 54: 352, 1940.
47. Colmant H.J.: *Some remarks about experimental brain edema In: Brain edema, eds. Klatzo I., Seitelberger F., pp. 489. Wien-New York, Springer, 1967.*
48. Brierley J.B., Meldrum B.S., Brown A.W.: *The Threshold and neuropathology of cerebral anoxic-ischemic cell change.* Arch Neurol 29: 367, 1973.
49. Garcia J.H., Kamijyo Y., Kalimo H., et al.: *Cerebral Ischemia: The early structural changes and correlation of these with known metabolic and dynamic abronmalities.* In0 Vascular Disease, ed. Whismant J.P., Sandrock B.A., pp. 313. New York, Grune and Stratton 1975.

50. Nedergaard M., Gjedde A., Diemer N.H.: *Focal Ischemia of the Rat Brain: Autoradiographic Determination of Cerebral Glucose Utilization, Glucose Content and Blood Flow.* J Cereb Blood Flow Metab 6: 414-424, 1988.
51. Brierley J.B.: *Pathology of Cerebral Vascular Diseases*, eds. McDowell F., Brennen R. pp 59. New York-London, Grune and Stratton, 1973.
52. Westergaard E., Go G., Klatzo I., Spatz M.: *Increased permeability of cerebral vessels to horseradish peroxidase induced by ischemia in mongolian gerbils.* Acta Neuropath (Berl.) 35-307, 1976.
53. Siegal T., Siegeal T., Shapira Y., et al.: *Indomethacin and Dexamethasone Treatment in Experimental Neoplastic Spinal Cord Compression: Part 1: Effect on Water Content and Specific Gravity.* Neurosurgery 22: 328-333, 1988.
54. Shigeno T., Teasdale G.M., McCulloch J., Graham D.I.: *Recirculation model following MCA occlusion in rats Cerebral Blood Flow, cerebrovascular permeability and brain edema.* J Neurosurg 63: 272-277, 1985.