مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان- جلد ۸، شماره ۱، پاییز ۱۳۸۵

«مقاله مروری»

مروری گذرا بر روش‌های ایجاد سکته مغزی در حیوانات آزمایشگاهی: انواع مدل‌ها، ارزیابی ضایعات مغزی و اختلالات نرولوژیکی

عابدین وکیلی* (Ph.D)

دانشگاه علوم پزشکی سمنان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات و بخش فیزیولوژی، آزمایشگاه Cerebrovascular Research

چکیده

سکته یا ایسکمی مغزی، سومین عامل مرگ‌ومیر در کشورهای پیش‌رفته و یا در حال توسعه بوده و یکی از علل اصلی معلولیت‌های درازمدت به شمار می‌رود. متأسفانه با وجود تلاش‌های صورت گرفته، هنوز درمان مؤثر و اختصاصی برای آن یافت نشده است. بنابراین، جهت تحقیق و فهم پاتوفیزیولوژی ایسکمی مغزی و احتمالاً یافتن روش‌های درمانی، نیاز به مدل‌های حیوانی و یا تجربی قابل اعتماد است. امروزه مدل‌های حیوانی مختلفی جهت بررسی درمان احتمالی ایسکمی مغزی استفاده می‌شود، این مدل‌ها خود به دو نوع ایسکمی مغزی موضعی و گلوبال تقسیم می‌شوند؛ ایسکمی مغزی موضعی به‌وسیله مسدود کردن شریان میانی مغز از طریق باز کردن جمجمه و تزریق آمبولی و یا روش فیلامنت و ایسکمی فراگیر نیز با مسدود کردن شریان‌های اصلی تغذیه کننده مغز و یا متوقف کردن موقتی قلب در حیوانات ایجاد می‌شود. به‌طور خلاصه در این مقاله مروری، مهم‌ترین روش‌های ایجاد مدل‌های حیوانی ایسکمی‌های موضعی و فراگیر مغزی بحث شده است.

واژه‌های کلیدی: سکته مغزی، مدل‌های حیوانی، اختلالات نرولوژیک

مقدمه

سکته یا ایسکمی مغزی، سومین عامل مرگ‌ومیر در کشورهای پیش‌رفته و یا در حال توسعه بوده و یکی از علل اصلی معلولیت‌های درازمدت به‌شمار می‌رود. بررسی‌ها نشان می‌دهند حدود ۸۳ درصد سکته‌های مغزی در انسان از نوع انسدادی (نوع ایسکمیک) و ۱۷ درصد در اثر پاره شدن شریان‌های تغذیه‌کننده مغزی (نوع خونریزی‌دهنده) است [۱]. هر ساله عده زیادی از افراد در جوامع گوناگون به دلایل مختلف به درجاتی از سکته‌های مغزی و عوارض متعاقب آن مبتلا می‌شوند. عوارض ناشی از این بیماری، طیف وسیعی از مشکلات و ناتوانی‌ها را برای بیمار به ارمغان آورده و فرد را عملاً از چرخه فعالیت و بهره‌وری اجتماعی خارج نموده و انسان مولد را به جرگه دریافت‌کنندگان خدمات درمانی، مراقبتی و بازتوانی که متضمن صرف هزینه‌های فراوانی برای سیستم‌های بهداشتی – درمانی کشورهاست وارد می‌کند [۲،۱]. برای نمونه هزینه‌های مستقیم و غیرمستقیم سکته مغزی در آمریکا در سال ۲۰۰۴ بالغ بر ۵۳/۶ میلیارد دلار برآورد شده است [۲]. صرف‌نظر از هزینه‌های بالای صرف شده برای چنین بیمارانی، عوارض جسمی و روحی ناشی از ایسکمی و سکته تا پایان عمر نیز گریبان‌گیر بیماران بوده و سلامت، امنیت فردی، استقلال و اتکای به نفس مبتلایان را به مخاطره می‌اندازد، متأسفانه تبعات ناخوشایند آن به صورت‌های گوناگون دامن‌گیر خانواده و اجتماع پیرامون فرد نیز می‌گردد.

* تلفن: ۳۳۳۲۰۸۰- ۰۲۳۱، نمابر: ۳۳۳۱۵۵۱- ۰۲۳۱، E-mail: Abvakili@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۶/۲/۴؛ تاریخ پذیرش: ۸۶/۲/۱۹

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

با وجود پیش‌رفت‌های زیادی که در علم پزشکی صورت گرفته، متأسفانه هنوز درمان مؤثر و اختصاصی برای این بیماران یافت نشده است. تا این تاریخ استفاده از ترومبولیتیک‌ها تنها روش درمان اختصاصی در بیماران سکته مغزی در کلینیک است [۳]. به‌هرحال در همه بیماران این روش درمانی نمی‌تواند مفید باشد، به دلیل این‌که اولاً تجویز ترومبولیتیک‌ها تا ۳ ساعت بعد از وقوع ایسکمی مؤثر است، ولی بیمارانی که در بیمارستان بستری می‌شوند معمولاً ساعت‌ها از وقوع سکته مغزی آن‌ها گذشته است؛ ثانیاً این روش درمانی همراه با عوارض زیادی از جمله خونریزی داخل مغزی و غیره می‌باشد، که باعث محدود کردن استفاده آن می‌شود. به‌طوری‌که بررسی‌ها نشان می‌دهند، این روش در حدود ۳ درصد از بیماران سکته مغزی مؤثر است [۳]. بنابراین، استفاده از مدل‌های حیوانی می‌تواند کمك شایانی در مطالعه مکانیسم پاتوفیزیولوژی آسیب‌های مغزی ناشی از ایسکمی مغزی و احتمالاً یافتن روش‌های درمانی مؤثر در آینده، بسیار سودمند باشد [۶،۵،۴].

انواع مدل‌های ایجاد ایسکمی یا سکته مغزی در حیوانات آزمایشگاهی.

امروزه مدل‌های حیوانی مختلفی در تحقیقات جهت مطالعه پاتوفیزیولوژی و یافتن روش‌های درمانی ایسکمی مغزی استفاده می‌شود. هر چند هیچ‌یك از این مدل‌ها به‌طور صد درصد مشابه شرایط کلینیکی که در طی ایسکمی مغزی در انسان رخ می‌دهد نیست، با این وجود مدل‌های حیوانی به‌دلایل مختلفی از جمله آسان بودن نسبی، کم هزینه بودن و نداشتن معذورات اخلاقی کار با انسان، به‌وسیله دانشمندان به‌طور گسترده در تحقیقات استفاده می‌شود. علاوه بر این از مدل‌های حیوانی در یافتن روش‌های درمانی و داروهای جدید و هم‌چنین تست کارایی دارو قبل از استفاده در انسان نیز استفاده می‌گردد [۶]. از مزیت‌های دیگر استفاده از مدل‌های حیوانی این است که ایسکمی مغزی در شرایط استاندارد ایجاد می‌شود و همه عوامل مخدوش کننده را به‌طور کامل می‌توان کنترل نمود [۷]. به‌طور کلی از دو مدل تجربی in vivo و in vitro در مطالعات ایسکمی مغزی استفاده می‌شود. مدل تجربی ایسکمی مغزی در حیوانات سالم (in vivo) به دو جزء ایسکمی فراگیر (Global) و موضعی تقسیم می‌گردد، که در ادامه مهم‌ترین آن‌ها به تفکیك بحث می‌شود [۷].

ایسکمی فراگیر (Global). ایسکمی فراگیر در اثر کاهش شدید یا قطع کامل جریان خون به کل مغز به‌وجود می‌آید. در حیوانات آزمایشگاهی این مدل را با متوقف کردن موقتی قلب یا انسداد کامل و یا ناقص کل عروق تغذیه کننده مغز ایجاد می‌کنند [۷]، که به اختصار برخی از این مدل‌ها توضیح داده می‌شود.

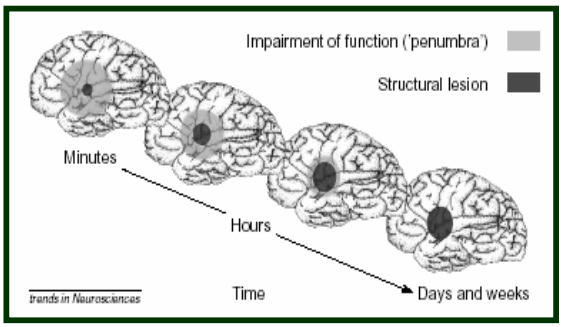
در برخی مطالعات جهت ایجاد ایسکمی فراگیر از فیبریلاسیون بطنی یا تزریق داخل قلبی عوامل فلج کننده جهت ایست قلبی و ایجاد ایسکمی فراگیر استفاده می‌شود [۹،۸،۷]. هم‌چنین، در سال ۱۹۹۲ روش دیگری توسط Kawai و همکاران وی جهت ایجاد ایسکمی فراگیر معرفی شد [۹]؛ در این روش، با فشردن عروق خونی خروجی اصلی قلب و قطع کامل جریان خون مغزی ایسکمی ایجاد می‌شود. در این حالت جریان کامل مغز بین ۵ تا ۱۰ دقیقه قطع گردیده، سپس مجدداً جریان خون به مغز برقرار می‌شود. بعد از چندین ساعت یا روز (بسته به نظر محقق)، ضایعات میکروسکوپی در سطح سلول‌های عصبی از جمله هیپوکامپ و ... مورد مطالعه قرار می‌گیرد [۹].

در بعضی از حیوانات از جمله جربیل [۱۰]، به دلیل این‌که فاقد شریان ارتباطی خلفی است (به عبارت دیگر ارتباطی بین شریان قاعده‌ای و شریان کاروتید داخلی وجود ندارد)، جهت ایجاد ایسکمی فراگیر دو شریان کاروتید مشترك را به‌صورت دوطرفه و موقتی مسدود می‌نمایند [۱۱]. مسدود کردن دوطرفه شریان کاروتید مشترك به‌طور قابل توجهی در جربیل منجر به ایسکمی شدید در مغز قدامی می‌شود [۱۲]. در برخی موارد جهت ایجاد ایسکمی شدیدتر مغزی علاوه بر انسداد دوطرفه شریان کاروتید مشترك، فشارخون سیستمیك را به حدود ۵۰ میلی‌متر جیوه کاهش می‌دهند [۱۴،۱۳]. در موش‌های

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

صحرایی و سوری جهت ایجاد ایسکمی فراگیر از روش انسداد چهار عروقی استفاده می‌کنند. در این روش ابتدا با استفاده از جراحی میکروسکوپی شریان ورتبرال به‌صورت دوطرفه به‌وسیله سوزانده شدن با کوتر به‌طور دائم مسدود گردیده، سپس شریان کاروتید مشترك به‌صورت دوطرفه با استفاده از میکروکلمپ، به‌طور موقتی (زمان انسداد معمولاً بین ۵ تا ۱۰ دقیقه است) مسدود می‌شود [۱۶،۱۵].

ایسکمی مغزی موضعی. کاهش یا قطع جریان خون به قسمتی از مغز به‌دنبال انسداد یکی از شریان‌های تغذیه‌کننده آن منجر به ایجاد سکته یا ایسکمی مغزی موضعی می‌شود. در ناحیه مرکزی، ایسکمی نرون‌ها در همان دقایق اول دچار ضایعات برگشت‌ناپذیر شده و از بین رفته و ضایعات ایسکمیک اولیه را به‌وجود می‌آورد. در اطراف ناحیه مرکزی ایسکمی، منطقه‌ای حاشیه‌ای به‌نام Penumbra وجود دارد، که جریان خون ضعیفی از عروق جانبی می‌گیرد. نرون‌ها در این ناحیه هر چند دچار مرگ سلولی نشده، ولی به‌تدریج و با گذشت زمان، در اثر فعال شدن مسیرهای نوروتوکسیک مختلف دچار مرگ کامل شده و ضایعه ایسکمی ثانویه ایجاد می‌کند (شکل ۱). مداخلات درمانی اصلی در بیماران سکته مغزی، جلوگیری یا کاهش مرگ نرون‌ها در منطقه Penumbra است [۱۷،۷].



شکل ۱. مراحل تکامل و گسترش ضایعه مغزی پس از قطع جریان خون موضعی مغز را نشان می‌دهد. با قطع جریان خون، نرون در مرکز ایسکمی (ناحیه سیاه‌رنگ) در عرض چند دقیقه از بین رفته و ضایعات اولیه ایسکمی را ایجاد می‌نماید. در اطراف ناحیه مرکزی ایسکمی، منطقه‌ای به‌نام Penumbra (ناحیه کم‌رنگ) وجود دارد، که جریان خون ضعیفی از عروق جانبی می‌گیرد. نرون‌های این ناحیه در ابتدای ایسکمی زنده بوده ولی عمل‌کرد طبیعی ندارند، منتها با گذشت زمان، در اثر فعال شدن مسیرهای متعدد نوروتوکسیک دچار مرگ کامل شده و ضایعه ایسکمی ثانویه ایجاد کرده و باعث افزایش ضایعه ایسکمیك مغزی می‌شود [۱۷].

شریان میانی مغز از بزرگ‌ترین و مهم‌ترین شریان‌های تغذیه کننده مغز است و در انسان به‌طور شایع سکته مغزی به علت مسدود شدن آن به‌وسیله ترمبوز و یا آمبولی ایجاد می‌شود، به همین دلیل امروزه در بیش‌تر تحقیقات با استفاده از روش‌ها و مدل‌های مختلف، شریان میانی مغز به‌صورت دائمی یا موقت مسدود و ایسکمی مغزی موضعی ایجاد می‌شود [۶].

انواع مدل‌های ایجاد ایسکمی مغزی موضعی.

۱- انسداد شریان میانی مغزی از طریق باز کردن جمجمه. این روش برای اولین بار در سال ۱۹۸۱ به‌وسیله Tamura و همکاران وی معرفی شد. در آن شریان میانی مغزی با اعمال جراحی میکروسکوپی و باز کردن جمجمه مسدود و ایسکمی مغزی در موش صحرایی ایجاد می‌شد [۱۸]. در ادامه تحقیقات، این روش به‌وسیله سایر دانشمندان توسعه یافته و تکمیل گردیده است. به‌طور کلی در این روش بعد برداشتن قسمتی از جمجمه، شریان میانی مغزی به‌وسیله نخ، کلیپ و سوزاندن مسدود می‌گردد. در این متد شاخه پروگزیمال شریان میانی مغز (که بخش مهمی از کورتکس مغز و استرایتوم را تغذیه می‌کند)، از محل جدا شدن از حلقه ویلیس و یا شاخه دیستال (که فقط کورتکس مغز را خون‌رسانی می‌کند) می‌توان مسدود نمود. درصورتی‌که شاخه پروگزیمال مسدود گردد، ایسکمی در کورتکس و استرایتوم و در صورتی که شاخه دیستال مسدود شود ایسکمی فقط محدود به کورتکس خواهد شد [۷،۶]. امروزه این روش علاوه بر موش صحرایی در گربه، میمون و سگ نیز استفاده می‌شود [۲۰،۱۹،۷]. این روش نیاز به عمل پیچیده جراحی از جمله باز کردن جمجمه دارد که خود ممکن است سبب آسیب شدید مغز شده و عوارض زیادی را به‌جاگذارد، از طرفی امکان ایجاد ایسکمی موقتی و برقراری مجدد جریان خون نیز بسیار مشکل است. به همین دلیل امروزه استفاده از این مدل محدود شده است.

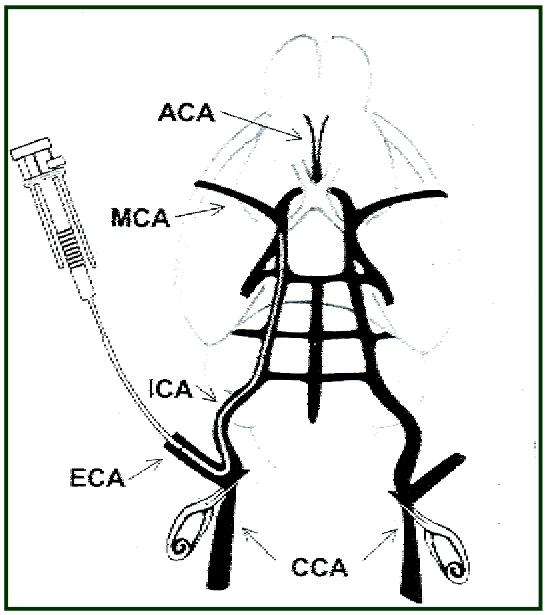
[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

۲- انسداد شریان میانی مغزی از طریق روش فتوشیمیایی. واتسون و همکارانش در سال ۱۹۸۵ برای نخستین بار با استفاده از روش فتوشیمی و استفاده از ماده رنگی حساس به نور موسوم به Rose Bengal ایسکمی موضعی که محدود کورتکس مغز بود در موش ایجاد نمودند [۲۱]. در این روش مواد شیمیایی رنگی حساس به نور از قبیل Rose Bengal از طریق شریان کاروتید به‌داخل خون تزریق، سپس شعاع نوری با طول موج ۵۶۰ نانومتر از طریق جمجمه به عروق قشر مغز به‌صورت متمرکز تابانده می‌شود، تابیدن متمرکز اشعه منجر به فعال شدن ماده شیمیایی حساس به نور و تولید یك سری فعل و انفعالات فتوشیمیایی از قبیل پراکسید شدن لیپیدهای غشایی سلول‌های اندوتلیال عروق و پلاکت‌ها شده و درنهایت باعث تشکیل ترومبوز، انسداد عروقی و ایسکمی موضعی می‌گردد [۲۲]. هم‌چنین از این تکنیك می‌توان برای ایجاد ترومبوز در عروق بزرگ مغزی از جمله شریان میانی مغز و شریان‌های کاروتید استفاده نمود [۲۳،۲۱]. مهم‌ترین مزایای این روش در ذیل آمده است:

۱- نسبت به سایر روش‌ها، غیرتهاجمی است، ۲- ایسکمی مغزی را به‌طور موضعی در هر ناحیه از قشری مغز می‌توان ایجاد نمود، برای مثال، می‌توان در قشر حسی اولیه به‌طور یك یا دوطرفه ایسکمی مغزی ایجاد نمود و سپس اختلالات عمل‌کردی مغز را به دقت مطالعه نمود [۲۴]، ۳- این روش انسداد عروقی در نتیجه آسیب اندوتلیال عروق و تجمع پلاکت است که از نظر پاتوفیزیولوژی تا حدود زیاد مشابه ایسکمی مغزی که در انسان رخ می‌دهد می‌باشد.

۳- انسداد شریان میانی مغزی با استفاده از آمبولی و یا لخته خون. ایسکمی مغزی با روش آمبولی نخستین بار در سگ‌ها با تزریق لخته‌خون به‌داخل شریان کاروتید گزارش گردید و در ادامه به‌طور وسیعی در موش صحرایی نیز استفاده شد [۲۵]. در برخی از مطالعات، به‌جای لخته خون از ذرات با اندازه مشخص (Microspheres) از قبیل ذرات بسیارریز کربن یا حباب‌های هوا و ... که به‌داخل شریان کاروتید داخلی تزریق می‌گردد، جهت ایجاد ایسکمی موضعی مغزی استفاده می‌شود [۲۶].

امروزه بیش‌تر از لخته خون جهت ایجاد ایسکمی موضعی استفاده می‌شود، در این روش حدود ۲۴ ساعت قبل از ایجاد ایسکمی، خون شریان حیوان گرفته و سپس لخته خون در داخل یك کانول تشکیل می‌شود. کانول حاوی لخته خون از محل دوشاخه شدن کاروتید مشترك حدود ۱۷ سانتی‌متر به داخل شریان کاروتید داخلی و داخل مغز هدایت و سپس لخته خون تزریق می‌شود [۲۸] (شکل ۲). در این روش لخته خونی تزریق‌شده عمدتاً وارد شریان میانی مغز شده و باعث انسداد و ایسکمی موضعی مغزی می‌گردد. از معایب مهم این روش غیرقابل پیش‌بینی بودن محل و اندازه دقیق ضایعه است که باعث شده تا حدودی استفاده از مدل محدود شود [۲۸،۲۷].



شکل ۲. نمایش شماتیك روش ایجاد ایسکمی مغزی موضعی با استفاده از تزریق لخته خون [۲۸].

CCA، شریان کاروتید مشترك؛ ECA، شریان کاروتید خارجی؛ ICA، شریان کاروتید داخلی؛ MCA، شریان میانی مغز؛ ACA، شریان قدامی مغز.

۴- انسداد شریان میانی مغزی با روش فیلامنت. این روش نخستین بار توسط یك محقق ژاپنی به‌نام Koizumi در سال ۱۹۸۶ جهت ایجاد ایسکمی موضعی در موش صحرایی به‌کار گرفته شد؛ در آن بدون باز کردن جمجمه و با فرستادن یك نخ

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

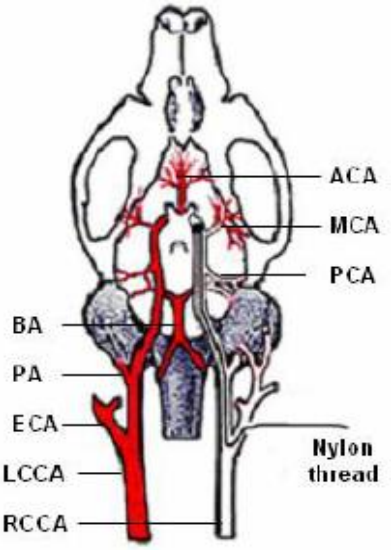
نایلون با پوشش سلیکون از طریق شریان کاروتید داخلی شریان میانی مغز مسدود و ایسکمی موضعی ایجاد می‌شد [۲۹]. تا به امروز این روش به‌وسیله محققین تغییرات زیادی داده شده و تکمیل گردیده است [۳۲،۳۱،۳۰]. این روش دارای مزایای مختلفی از جمله کم‌تر تهاجمی و آسان بودن آن نسبت به سایر روش‌ها و امکان برقراری مجدد جریان خون است. به همین دلیل این روش در حال حاضر به‌طور رایج و معمول به‌وسیله دانشمندان و محققان جهت ایسکمی مغزی موضعی- موقتی در موش صحرایی و سوری مورد استفاده قرار می‌گیرد [۳۶،۳۵،۳۴،۳۳]. هم‌اکنون این روش در آزمایشگاه Cerebrovascular مرکز تحقیقات و بخش فیزیولوژی دانشکده پزشکی سمنان به‌طور روتین در موش‌های صحرایی برای تحقیقات در زمینه سکته مغزی استفاده می‌گردد [۳۷،۳۳]. با توجه به اهمیت آن در ادامه به‌طور مفصل و جامع بحث می‌شود.

در این روش قبل از ایجاد ایسکمی آماده کردن نخ نایلون اهمیت خاصی دارد و در مطالعات از نخ نایلون شماره ۰-۳ و ۰-۴ بدون هیچ پوشش و یا پوشش سلیکون، پلی‌الیزین استفاده گردیده است [۳۸]. مطالعات قبلی ما نشان می‌دهند، نخ نایلون شماره ۰-۳ از جنس پرولین (Ethicon -UK) که نوك آن جلوی شعله گردشده برای ایجاد ایسکمی مناسب‌تر است. برای تهیه نخ مورد نظر ابتدا برش‌هایی به طول ۴ سانتی‌متر تهیه شده و سپس نوک نخ به ترتیبی که در شکل ۳ آمده است جلوی شعله گرد می‌گردید. در ادامه نوک این نخ در زیر میکروسکوپ به‌دقت بررسی و نخ‌هایی که فاقد استاندارد لازم برای کار بودند دور انداخته می‌شدند. نخ آماده شده در ظرف تمیز نگه‌داری و در زمان آزمایش استفاده می‌شد. قطر نوک نخ بایستی طوری تهیه شود که اولاً به‌راحتی از سوراخ کاروتید جمجمه عبور کند، در ثانی کاملاً صاف و یک‌نواخت باشد تا باعث آسیب اندوتلیوم عروق و یا احتمالاً پاره شدن آن نگردد [۳۹،۳۷،۳۳].

بعد از آماده شدن نخ‌های نایلون، موش‌های صحرایی یا سوری با داروهای بی‌هوشی تزریقی مثل کلرال هیدرات و... و یا گازی مثل هالوتان و ایزوفلوران بی‌هوش می‌شوند. سپس حیوان بر روی میز جراحی مخصوص ثابت می‌شود و در زیر میکروسکوپ جراحی، برشی در جلو گردن حیوان داده و عضلات این ناحیه کنار زده می‌شود تا شریان کاروتید مشترك دیده شود. سپس شریان کاروتید مشترك و شاخه‌های آن یعنی شریان کاروتید خارجی و داخلی را از بافت همبند و عصب جدا و ایزوله می‌شوند (شکل ۳). شاخه‌های شریان کاروتید خارجی شامل شریان اکسیپیتال و تیروئید فوقانی با استفاده از دستگاه کوتری جهت جلوگیری از خونریزی سوزانده و مسدود می‌شوند، سپس شریان کاروتید داخلی تا سطح جمجمه از غدد لنفاوی و اعصاب همراه و شریان پتریگوپالاتین (شاخه خارج جمجمه شریان کاروتید داخلی) با دقت جدا می‌شود. در مرحله بعد شریان کاروتید مشترک و خارجی به‌صورت دائمی و شریان کاروتید داخلی به‌وسیله میکروکلامپ به‌طور موقت مسدود می‌شوند. سپس نخ نایلون با شماره ۰-۳ که نوک آن جلوی شعله گرد شده است، از طریق برشی کوچک که در شریان کاروتید خارجی ایجاد می‌شود وارد شریان کاروتید داخلی می‌گردد. نخ نایلون از محل دوشاخه شدن شریان کاروتید مشترک، به آرامی در طول شریان کاروتید داخلی به سمت داخل مغز و حلقه ویلیس هدایت می‌گردد تا یك مقاومت ظریف در مقابل هدایت نخ به سمت جلو احساس شود؛ احساس این مقاومت ظریف نشان‌گر آن است که نوک نخ وارد ابتدای شریان قدامی مغز شده و شریان میانی مغز را در محل خروج از حلقه ویلیس مسدود نموده است (شکل۳). بدین ترتیب جریان خون در شریان میانی مغز قطع و ناحیه‌ای از مغز که توسط این شریان خون‌رسانی می‌گردد (کورتکس و استرایتوم) ایسکمی ایجاد می‌شود. دوره انسداد شریان میانی مغز و یا ایسکمی، اغلب بین نیم تا سه ساعت گزارش شده است. به‌عبارت دیگر بعد از اتمام دوره ایسکمی مورد نظر نخ نایلون را به آرامی خارج کرده و جریان خون مجدداً در شریان میانی مغز و منطقه ایسکمی برای دروه نامحدود برقرار می‌شود [۳۷]. نکته‌ای که بایستی محقق در هنگام جراحی مدنظر داشته باشد این است که، شریان پتریگوپالاتین از نظر موقعیت

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

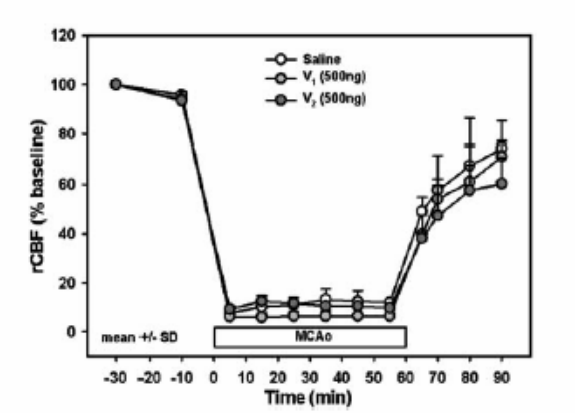
آناتومیکی در پشت کاروتید داخلی قرار داشته و نسبت به آن مسیر مستقیمی را تا سطح جمجمه طی می‌کند. این شریان در موش صحرایی Mastoid Bulla را خون‌رسانی می‌کند (شکل ۳)، بنابراین با توجه به مستقیم بودن مسیر شریان پتریگوپالاتین، نخ نایلون که برای ایجاد ایسکمی وارد شریان کاروتید داخلی می‌شود، ابتدا وارد این شریان می‌گردد؛ بنابراین، جراح بایستی محل جدا شدن شریان پتریگوپالاتین از شریان کاروتید داخلی را در زیر میکروسکوپ مشاهده نموده و نخ نایلون را با مانوری که انجام می‌دهد وارد شاخه داخل جمجمه‌ای شریان کاروتید داخلی نموده و به سمت حلقه ویلیس هدایت نماید [۴۰،۳۷].



شکل ۳. به‌صورت شماتیک نمای شریان‌های تغذیه‌کننده مغز و روش انسداد شریان میانی با نخ نایلون جهت ایجاد ایسکمی مغزی موضعی را نشان می‌دهد [۳۷].

LCCA، شریان کاروتید مشترک چپ؛ RCCA، شریان کاروتید مشترک راست؛ ECA، شریان کاروتید خارجی؛ ICA، شریان کاروتید داخلی؛ MCA، شریان میانی مغز؛ PCA، شریان خلفی مغز؛ ACA، شریان قدامی مغز؛ PA، شریان پتریگوپلاتین؛ BA، شریان قاعده‌ای.

امروزه در برخی از آزمایشگاه‌های مدرن دنیا از روش‌های پیش‌رفته و مطمئن‌تری جهت ایجاد ایسکمی موضعی با روش فیلامنت استفاده می‌شود، در آن از یک جریان‌سنج لیزری پیش‌رفته جهت مانیتور کردن جریان خون موضعی استفاده می‌شود. به این صورت که پروب جریان‌سنج لیزری در موش سوری روی استخوان تمپورال و در موش صحرایی روی سخت‌شامه قرار داده شده و جریان خون موضعی پایه ثبت می‌شود. سپس هم‌زمان با جلو بردن نخ نایلون در طول رگ به ترتیبی که اشاره شد، جریان خون موضعی ثبت می‌گردد. هنگامی‌که جریان خون موضعی به کم‌تر از ۱۰ تا ۱۵ درصد برسد نشان‌دهنده این است که جریان خون در شریان میانی قطع شده و ایسکمی با اطمینان تقریباً صد درصد ایجاد گردیده است [۳۲] (شکل ۴).

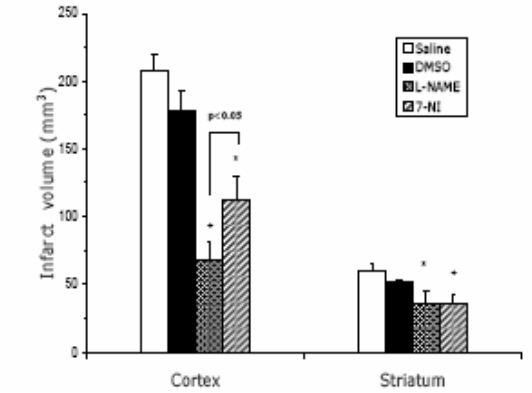


شکل ۴. نمودار جریان خون موضعی (rCBF) را قبل و در طول انسداد شریان میانی مغز (MCAo) و برقراری مجدد جریان خون در موش‌های سوری که سالین و آنتاگونیست‌های گیرنده V1 و V2 آرژینین‌وازوپرسین پنج دقیقه بعد از شروع ایسکمی دریافت کرده است را نشان می‌دهد [۳۲].

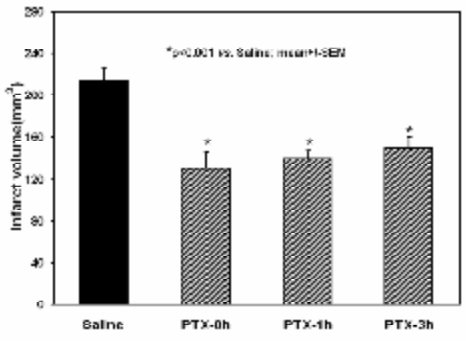
با استفاده از انواع مدل ایسکمی- موضعی که اشاره شد، می‌توان مکانسیم پاتوفیزیولوژی سکته مغزی، اثر داروهای مختلف را بر حجم ضایعه، ادم و میزان نفوذپذیری عروق مغزی و... در حیوانات آزمایشگاهی را مطالعه نمود. به‌عنوان مثال مطالعه قبلی ما که در آن از مهارکننده‌های اختصاصی و غیراختصاصی تولیدکننده نیتریك‌اکساید استفاده گردید، نشان داد که نیتریك‌اکساید با منشأ عصبی نقش نروتوکسیك در گسترش ضایعات پس از سکته مغزی دارد [۳۹] (شکل ۵). هم‌چنین اخیراً ما گزارش نمودیم که آمینوگوانیدین (دارویی با سمیت خیلی‌کم که امروزه در انسان برای جلوگیری از عوارض مزمن بافتی در دیابت‌شیرین استفاده می‌شود)،

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

هنگامی که در ابتدای ایسکمی مغزی موضعی تزریق شود، ضایعات مغزی را به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد [۳۷]. علاوه بر این ما به تازگی گزارش کردیم که تجویز پنتوکسی‌فیلین در شروع ایسکمی مغزی موضعی، ضایعات کورتکس را به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد و اثری بر ضایعات استرایتوم مغز ندارد [۳۳] (شکل ۶). جدای از این هم‌اکنون دانشمندان در مراکز تحقیقات مهم دنیا به شدت در مدل‌های مختلف ایسکمی مغز اثر مواد و داروهای گوناگون مطالعه می‌کنند؛ به امید این‌که در آینده روش درمانی مؤثر و مناسبی برای سکته مغزی پیدا نمایند.



شکل ۵. اثر مهارکننده اختصاصی نیتریک‌اکساید با منشأ عصبی (7-NI) و مهارکننده غیراختصاصی نیتریک‌اکساید (L-NAME) بر ضایعات کورتکس و استرایتوم در مدل تجربی ایسکمی مغزی موضعی را نشان می‌دهد [۳۹].



شکل ۶. اثر تجویز پنتوکسی‌فیلین در شروع (PTX-0h) یا یک ساعت (PTX-1h)و یا ۳ ساعت (PTX-3h) پس از ایسکمی مغزی موضعی بر ضایعات کورتکس را نشان می‌دهد [۳۳].

روش‌های ارزیابی ضایعات ایسکمیک مغزی در مدل‌های حیوانی.

تعیین موقعیت، میزان و سطح ضایعه مغزی بعد از ایجاد ایسکمی مغزی موضعی برای بررسی اثر عوامل مختلف در مدل حیوانی ضروری و اجتناب‌ناپذیر است [۴۱]. روش‌های رنگ‌آمیزی متعددی از جمله تری‌فنیل‌تترازولیوم کلراید، کریزول ویولت (Cresyl violet) و هماتوکسولین – ائوزین (Hematoxylin-Eosin) جهت تعیین سطح ضایعه استفاده می‌شود. در این تکنیک‌ها سطح ضایعه مغزی به‌صورت منطقه فاقد رنگ نشان داده می‌شود [۴۰،۳۹،۳۲]. در بافت زنده تری‌فنیل‌تترازولیوم کلراید (Triphenyltetrazolium chloride) در اثر واکنش با آنزیم سوکسینات دهیدروژناز (یک آنزیم میتوکندریایی) احیا شده و به رنگ قرمز آجری درمی‌آید [۴۳،۴۲]. بنابراین با این روش بافت زنده به رنگ قرمز و بافت ضایعه‌دیده که فاقد سوکسینات‌دهیدروژناز است، به رنگ سفید درمی‌آید [۴۳،۳۷]. با این روش رنگ‌آمیزی مرز بین بافت زنده (قرمز) و نکروزه (سفید) به‌خوبی مشخص بوده و به آسانی با چشم قابل تشخیص می‌باشد [۴۱]. مزیت‌های این روش رنگ‌آمیزی، کم‌هزینه، سریع، آسان و قابل اعتماد بودن آن نسبت به سایر روش‌هاست [۴۵،۴۴،۴۱]. تعداد زیادی از مطالعات نشان داده‌اند، رنگ‌آمیزی بافت مغزی با تری‌فنیل‌تترازولیوم کلراید ۳ تا ۱۲ روز پس از شروع ایسکمی مغزی قادر است، به‌طور دقیق و قابل اعتماد ضایعات را نشان دهد [۴۷،۴۶،۴۵].

شکل ۷. نمایی از Brain matrix و مغز حیوان که در داخل آن قرار گرفته را نشان می‌دهد [۳۳].

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

برای اندازه‌گیری و تعیین سطح و حجم ضایعه مغزی با روش تری‌فنیل‌تترازولیوم کلراید، بعد از اتمام دوره آزمایش، حیوان تحت بی‌هوشی عمیق کشته و بلافاصله سرحیوان جدا و مغز به‌دقت خارج می‌شود. سپس جهت سفت شدن مغز و آماده‌کردن برای برش، به مدت ۵ دقیقه در سالین ۴ درجه قرار داده می‌شود. سپس هفت برش به قطر ۲ میلی‌متر از مغز حیوان به کمک Brain matrix (شکل ۷ و ۸) تهیه می‌گردد. برای رنگ‌آمیزی، برش‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در محلول ۲ درصد تری‌فنیل‌تترازولیوم کلراید قرار داده می‌شوند. با این روش رنگ‌آمیزی، منطقه ضایعه‌دیده به رنگ سفید و منطقه نرمال مغز به رنگ قرمز آجری در می‌آید (شکل ۸). سپس برش‌ها را جهت تثبیت شدن بافت برای مدت ۱ شب در فرمالین بافر شده ۱۰ درصد قرار می‌دهند. در پایان با کمک یک دوربین دیجیتالی از هرکدام از برش‌ها عکس گرفته می‌شود و پس از انتقال به رایانه، سطح ناحیه ضایعه‌دیده با استفاده از نرم‌افزاری به‌نام NIH image analyzer و... اندازه‌گیری می‌شود. برای محاسبه حجم، سطح ضایعه در ضخامت برش ضرب شده و حجم کل ضایعه مغزی از حاصل جمع ضایعات در هفت برش مغزی به‌دست می‌آید [۳۹،۳۳].

شکل ۸. نمونه‌ای از برش مغزی که با محلول تری‌فنیل‌تترازولیوم کلراید رنگ‌آمیزی شده است را در گروه کنترل نشان می‌دهد. ناحیه انفارکته یا ضایعه‌دیده به رنگ سفید و منطقه سالم مغز به رنگ قرمز دیده می‌شود [۳۳].

ارزیابی اختلالات نرولوژیکی.

ایجاد ایسکمی مغزی موضعی در حیوانات آزمایشگاهی همراه یک سری اختلالات حسی و حرکتی وسیع است. روش‌های مختلفی برای ارزیابی اختلالات نرولوژیکی از قبیل حرکتی، حسی، شناختی و رفتاری در حیوانات آزمایشگاهی به‌کار می‌رود، که در واقع مشابه با آن چیزی است که در بیماران سکته مغزی استفاده می‌شود [۴۱]. اختلالات حرکتی با توجه به اهمیت زیاد آن با استفاده از روش‌های استاندارد، پس از اتمام دوره ایسکمی و آزمایش، مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. یکی از این تست‌هایی که ساده و سریع قابل انجام است و آنالوگ با آزمایشات نرولوژیکی در بیماران پس از سکته مغزی به شرح زیر است: در این تست به‌صورت قراردادی به اختلالات حرکتی حیوان نمره صفر تا چهار داده می‌شود. نمره صفر: برای حیوانی که هیچ اختلال حرکتی نشان ندهد؛ نمره یک: برای حیوانی که هنگام آویزان شدن از دم، دست مقابل محل ضایعه حالت Flexion پیدا می‌کند؛ نمره ۲: برای حیوانی که در حالت هوشیاری در یک سطح صاف شروع به چرخش به سمت مقابل محل ضایعه نماید؛ نمره ۳: برای حیوانی که رفلکس ایستادن (Righting reflex) را از دست بدهد؛ نمره ۴: برای حیوانی که هیچ فعالیت حرکتی خودبه‌خودی نشان ندهد [۴۸،۳۲].

به‌طور خلاصه. مدل‌های حیوانی ایسکمی‌های موضعی و فراگیر مغزی، فرصت‌هایی برای تحقیق و پژوهش در مورد پاتوفیزیولوژی و احتمالاً درمان ضایعات مغزی، در اختیار دانشمندان قرار داده است؛ اگرچه هیچ‌یك از این مدل‌ها به‌طور واقعی و صد درصد نمی‌توانند شرایط و وضعیت‌های به‌وجود آمده طی سکته مغزی در انسان را بازسازی کنند.

منابع

[1] Taylor TN, Davis PH, Torner JC, Holmes J, Meyer JW, Jacobson MF. Lifetime cost of stroke in the United States. Stroke, 1996; 27:1459-66.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

[2] Wolf PA, Kannel WB, D'Agostino RB. Epidemiology of Stroke. In: Ginsberg MD, Bogousslavsky J. (Eds). Cerebrovascular disease: pathophysiology, diagnosis, and management. …th ed. Malden, Mass: Blackwell Science, 1998. p. 834-49.

[3] The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. N Engl J Med, 1995; 333:1581-7.

[4] De Keyser J, Sulter G, Luiten PG. Clinical trials with neuroprotective drugs in acute ischaemic stroke: are we doing the right thing? Trends Neurosci, 1999; 22:535-40.

[5] Nagahiro S, Uno M, Sato K, Goto S, Morioka M, Ushio Y. Pathophysiology and treatment of cerebral ischemia. J Med Invest, 1998; 45:57-70.

[6] Alonso de Leciana M, Dez-Tejedor E, Carceller F, Roda JM. Cerebral ischemia: from animal studies to clinical practice. Cerebrovasc Dis, 2001; 11:20-30.

[7] Hossmann KA. Experimental models for the investigation of brain ischemia. Cardiovascular Research, 1998; 39:106–20.

[8] Tajima G, Shiozaki T, Seiyama A, Mohri T, Kajino K, Nakae H, et al. Mismatch recovery of regional cerebral blood flow and brain temperature during reperfusion after prolonged brain ischemia in gerbils. J Trauma, 2007; 62:36-43.

[9] Kawai K, Nitecka L, Ruetzler CA, Nagashima G, Joo F, Mies G, et al. Global cerebral ischemia associated with cardiac arrest in the rat: I. Dynamics of early neuronal changes. J Cereb Blood Flow Metab, 1992; 12(2):238-49.

[10] Chandler MJ, DeLeo J, Carney JM. An unanesthetized-gerbil model damage of cerebral ischemia-induced behavioral changes. J Pharmacol Methods, 1985; 14:137–46.

[11] Janac B, Radenovic L, Selakovic V, Prolic Z. Time course of motor behavior changes in Mongolian gerbils submitted to different durations of cerebral ischemia. Behav Brain Res, 2006; 175: 362-73.

[12] Li DQ, Bao YM, Li Y, Wang CF, Liu Y, An LJ. Catalpol modulates the expressions of Bcl-2 and Bax and attenuates apoptosis in gerbils after ischemic injury. Brain Res, 2006; 1115: 179-85.

[13] Lestage P, Lockhart B, Roger A. In vivo exploration of cerebral ischemia: use of neuroprotective agents in animal studies. Therapie, 2002; 57:554-63.

[14] Gupta YK, Briyal S. Animal models of cerebral ischemia for evaluation of drugs. Indian J Physiol Pharmacol, 2004; 48:379-94.

[15] Dai X, Chen L, Sokabe M. Neurosteroid estradiol rescues ischemia-induced deficit in the long-term potentiation of rat hippocampal CA1 neurons. Neuropharmacology, 2007; 52:1124-38.

[16] Zheng YQ, Liu JX, Wang JN, Xu L. Effects of crocin on reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to cerebral microvessels after global cerebral ischemia. Brain Res, 2007; 1138:86-94.

[17] Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. Trends Neurosci, 1999; 22(9):391-7.

[18] Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. J Cereb Blood Flow Metab, 1981; 1(1):53-60.

[19] Little JR. Implanted device for middle cerebral artery occlusion in conscious cats. Stroke, 1977; 8:258–60.

[20] Hayakawa T, Waltz AG. Immediate effects of cerebral ischemia: evolution and resolution of neurological deficits after experimental occlusion of one middle cerebral artery in conscious cats. Stroke, 1975; 6:321–7.

[21] Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. Ann Neurol, 1985; 17:497–504.

[22] Yan YP, Yin KJ, Sun FY. Effect of glutamate transporter on neuronal damage induced by photochemical thrombotic brain ischemia. Neuroreport, 1998; 16:441-6.

[23] Futrell N, Millikan C, Watson BD, Dietrich WD, Ginsberg MD. Embolic stroke from a carotid arterial source in the rat: pathology and clinical implications. Neurology, 1989; 39:1050-6.

[24] Pazos AJ, Orezzoli SL, McCabe PM, Dietrich WD, Green EJ. Recovery of vibrissae-dependent behavioral responses following barrelfield damage is not dependent upon the remaining somatosensory cortical tissue. Brain Res, 1995; 689:224-32.

[25] Wang CX, Yang T, Shuaib A. An improved version of embolic model of brain ischemic injury in the rat. J Neurosci Meth, 2001; 30:147-51.

[26] Vise WM, Schuier FJ, Hossmann K-A, Takagi S, Zulch KJ. Cerebral microembolization. I. Pathophysiological studies. Arch Neurol, 1977; 34:660–5.

[27] Sereghy T, Overgaard K, Boysen G. Neuroprotection by excitatory amino acid antagonist augments the benefit of thrombolysis in embolic stroke in rats. Stroke, 1993; 24:1702-8.

[28] Zhang Z, Zhang RL, Jiang Q, Raman SBK, Cantwell L. A new rat model of thrombotic focal cerebral ischemia. JCBFM, 1997; 17:123-35.

[29] Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema, I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. Jpn J Stroke, 1986; 8:1–8.

[30] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats. Stroke, 1989; 20:84-91.

[31] Belayev L, Alonso OF, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model. Stroke, 1996; 27(9):1616-22.

[32] Vakili A, Kataoka H, Plesnila N. Role of arginine vasopressin V1 and V2 receptors for brain damage after transient focal cerebral ischemia. J Cerebral Blood Flow Metab, 2005; 25:1012-9.

[33] Vakili A, Zahedi Khorasani M. Post–ischemic treatment of pentoxifyline reduces cortical not striatal infarct volume in transient model of focal cerebral ischemia in rat. Brain Res, 2007; 1144:186-91.

[34] Plesnila N, Zhu C, Culmsee C, Groger M, Moskowitz MA, Blomgren K. Nuclear translocation of apoptosis-inducing factor after focal cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab, 2004; 24:458-66.

[35] Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. Stroke, 1997; 28:1283-8.

[36] Cockroft KM, Meistrell M, Zimmerman GA, Risucci D, Bloom O, Cerami A, et al. Cerebroprotective effects of aminoguanidine in a rodent model of stroke. Stroke, 1996; 27:1393-8.

[37] Vakili A, Nekoeian AA, Dehghani GA. Aminoguanidine reduces infarct volume and improve neurological dysfunction in rat model focal cerebral ischemia. Daru, 2006; 14:31-6.

[38] Wexler EJ, Peters EE, Gonzales A, Gonzales ML, Slee AM, et al. An objective procedure for ischemic area evaluation of the stroke intraluminal thread model in the mouse and rat. J Neurosci Methods, 2002; 113:51-8.

[39] Vakili A, Nekoeian AA, Dehghani GA. L-NAME and 7-Nitroinidazole reduces brain injury in rat model of transient focal cerebral ischemia. Iran J Med Sci, 2004; 29(3):109-14.

[40] Smraka M, Otevrel F, Kuchtíaková S, Hork M, Jurán V, Duba M, et al. Expermental model of reversible focal ischemia in the rat. Scripta Medica (Brono), 2001; 74(6):391–8.

[41] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. Stroke, 1986; 17: 472-6.

[42] Lippold HJ. Quantitative succinic dehydrogenases histochemistry. A comparison of different tetrazolium salts. Histochemistry, 1982; 76:381-405.

[43] Liszczak TM, Hedley-Whyte ET, Adams JF, Han DH, Kolluri VS, Vacanti FX, et al. Limitations of tetrazolium salts in delineating infarcted brain. Acta Neuropathol (Berl), 1984; 65(2):150-7.

[44] Lundy EF, Solik BS, Frank RS, Lacy PS, Combs DJ, Zelenock GB, et al. Morphometric evaluation of brain infarcts in rats and gerbils. J Pharmacol Methods, 1986; 16(3):201-14.

[45] Hatfield RH, Mendelow AD, Perry RH, Alvarez LM, Modha P. Triphenyltetrazolium chloride (TTC) as a marker for ischaemic changes in rat brain following permanent middle cerebral artery occlusion. Neuropathol Appl Neurobiol, 1991; 17:61-7.

[46] Benedek A, Moricz K, Juranyi Z, Gigler G, Levay G, Harsing LG Jr, et al. Use of TTC staining for the evaluation of tissue injury in the early phases of reperfusion after focal cerebral ischemia in rats. Brain Res, 2006; 1116:159-65.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

[47] Tureyen K, Vemuganti R, Sailor KA, Dempsey RJ. Infarct volume quantification in mouse focal cerebral ischemia: a comparison of triphenyltetrazolium chloride and cresyl violet staining techniques. J Neurosci Methods, 2004; 139:203-7.

[48] Plesnila N, Zinkel S, Le DA, Amin-Hanjani S, Wu Y, Qiu J, et al. BID mediates neuronal cell death after oxygen/ glucose deprivation and focal cerebral ischemia. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001; 98:15318-23.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]