

## ایجاد ایسکمی موضعی مغز با کمک ثبت مداوم جریان خون موضعی مغز با

## جریان سنج لیزری در موش صحرائی

دکتر حمداله پناهپور<sup>۱</sup><sup>۱</sup> نویسنده مسئول: استادیار گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

E-mail: Panahpour.h@gmail.com

## چکیده

**زمینه و هدف:** سکنه مغزی سومین عامل مرگ و معلولیت در بسیاری از جوامع انسانی است. به جهت پیچیدگی عوامل پاتوفیزیولوژیک دخیل در ایجاد ضایعه ایسکمیک مغزی هنوز درمان موثری برای آن پیدا نشده است. امروزه مطالعات وسیعی با استفاده از مدل‌های آزمایشگاهی حیوانی جهت شناسایی عوامل موثر در ایجاد ضایعه ایسکمیک مغزی و معرفی روش‌های درمانی نوین صورت می‌گیرد. در این مطالعه تلاش شده است تا الگوی مناسب، تکرارپذیر و موفقی از مدل تحقیقاتی ایجاد سکنه مغزی در موش صحرائی معرفی گردد تا ضمن افزایش میزان موفقیت تکنیک، میزان مرگ و میر حیوانات مورد مطالعه را نیز کاهش دهد.

**روش کار:** در این تحقیق ۳۲ سر موش صحرائی نر از نژاد Sprague – Dawley در چهار گروه مورد مطالعه قرار گرفتند. حیوانات با تزریق داخل صفاقی کلرال هیدرات (۴۰۰ mg/kg) بی‌هوش شدند. ایسکمی موضعی مغز با استفاده از تکنیک انسداد شریان میانی مغز توسط نخ نایلون پوشیده از سلیکون ایجاد شد. هدایت نخ در مسیر عروقی با کمک ثبت مداوم جریان خون موضعی مغز صورت گرفت. ۲۴ ساعت پس از ایسکمی حیوانات از نظر اختلالات حرکتی نورولوژیک با استفاده از آزمون ویژه‌ای مورد ارزیابی قرار گرفتند. جهت تعیین حجم ضایعه مغزی ۶ برش از سطوح مختلف مغز تهیه شده و پس از رنگ‌آمیزی با استفاده از سیستم آنالیز تصویری ویژه‌ای مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای ارزیابی شدت ادم ایجاد شده از تعیین محتوی آب بافت مغز استفاده شد.

**یافته‌ها:** در حیوانات گروه شاهد اختلال حرکتی یا ضایعه مغزی مشاهده نشد. حیوانات گروه ایسکمیک اختلالات حرکتی شدیدی نشان دادند (نمره آزمون نورولوژیک  $0/5 \pm 0/5$ ). میزان حجم ضایعه مغزی ایجاد شده در نیمکره چپ این گروه  $43 \pm 0/2$  میلی‌متر مکعب بود که  $62/7\%$  آن در نواحی قشری و  $37/3\%$  آن در مناطق زیر قشری مغز می‌باشد. بروز ایسکمی محتوی آب نیمکره چپ مغز در گروه ایسکمیک را افزایش داد که بطور معنی‌داری از نیمکره سالم مغز در همین گروه و نیمکره‌های مغز گروه شاهد بیشتر بود ( $0/23 \pm 0/84$ ;  $p < 0/05$ ). میزان موفقیت تکنیک در ایجاد ایسکمی  $100\%$  بود و مرگ و میر حیوانات مورد مطالعه در اثر عوارض تکنیک مشاهده نشد.

**نتیجه گیری:** یافته‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهد که کاربرد جریان سنج لیزری و ثبت مداوم جریان خون موضعی مغز نقش تعیین کننده‌ای در افزایش موفقیت تکنیک ایجاد ایسکمی مغزی و کاهش مرگ و میر در مدل تحقیقاتی موش صحرائی دارد. مدل حاضر با کمترین محدودیت‌ها و بالاترین ضریب موفقیت می‌تواند الگوی مناسبی از مدل‌های تحقیقاتی آزمایشگاهی جهت مطالعه سکنه مغزی در زمینه شناسایی عوامل سلولی و مولکولی دخیل در ایسکمی و ارزیابی کارآئی روش‌های درمانی جدید باشد.

**کلمات کلیدی:** ایسکمی موضعی مغز؛ ادم مغزی؛ ثبت جریان خون مغزی؛ جریان سنج لیزری؛ موش صحرائی

دریافت: ۹۰/۶/۱ پذیرش: ۹۰/۸/۲۰

لطفاً به این مقاله به شکل زیر ارجاع دهید:

Panahpour H. Induction of Focal Cerebral Ischemia by Continuous Recording of Cerebral Blood Flow Using Laser Doppler Flowmeter in Rat. J Ardabil Univ Med Sci. 2011; 11(4): 316-328. (Full Text in Persian)

## مقدمه

سکته مغزی با مرگ و میری حدود ۳۰٪ یکی از مهمترین عوامل مرگ و معلولیت در جوامع صنعتی است و تاکنون در مان مؤثری برای آن پیدا نشده است [۱]. این بیماری از توقف دائمی یا موقت جریان خون به قسمتی از مغز ناشی می‌شود که در بیشتر موارد در اثر انسداد یکی از شریان‌های مغز توسط ترومبوز یا آمبولی روی می‌دهد [۲].

آسیب ایسکمیک مغز روند پیچیده‌ای است و امروزه مطالعات زیادی جهت روشن ساختن اساس سلولی و مولکولی آن و معرفی داروها و استراتژی‌های درمانی جدید در این رابطه صورت می‌گیرد. مدل‌های آزمایشگاهی ایجاد ایسکمی مغزی در حیوانات با شرایطی مشابه آنچه که در انسان رخ می‌دهد ابزار ارزشمندی است که شرایط لازم را جهت مطالعه عوامل پاتوفیزیولوژیک موثر در آسیب ایسکمیک مغز و پیشنهاد روش‌های درمانی جدید فراهم می‌کند [۳].

ایسکمی مغزی بصورت آزمایشگاهی می‌تواند به دو شکل موضعی و عمومی ایجاد شود. مدل‌های ایجاد ایسکمی موضعی مغزی به دو گروه مدل‌های موقت و دائمی تقسیم بندی می‌شوند [۴]. برای ایجاد ایسکمی موضعی مغز از روش‌های مختلفی چون انسداد دائمی شریان میانی مغز از طریق باز کردن جمجمه [۵] یا تزریق مواد آمبولیک در شریان کاروتید مشترک یا شریان میانی مغز [۶، ۷] استفاده شده است.

روش انسداد موقت شریان میانی مغز با استفاده از یک نخ مخصوص ابتدا توسط کویزومی و همکارانش معرفی شد [۸]. این محققین جهت ایجاد ایسکمی از نخ نایلون (چهارصفر) پوشیده از سیلیکون استفاده کردند. لونکا و همکارانش این روش را با استفاده از نخ نایلون (چهار صفر) که تیزی نوک آنرا با حرارت برطرف کرده بودند تجربه کردند [۹]. میزان موفقیت روش کویزومی بیشتر بود هر چند با محدودیت‌هایی چون مشکل بودن تهیه نخ مخصوص و احتمال ایجاد لخته همراه بود [۷، ۸، ۱۰].

بلايو و همکارانش برای ایجاد ایسکمی موضعی مغز از نخ نایلون ضخیم‌تر (سه صفر) با پوشش پلی-ال-لیزین استفاده کردند و حجم ضایعه بزرگتری گزارش نمودند [۱۱]. اما میزان مرگ و میر بالای حیوانات مورد مطالعه به جهت خونریزی مغزی، انسداد ناکامل شریان و ناتوانی در ایجاد ایسکمی و تغییرات وسیع در اندازه و موقعیت ضایعه مغزی محدودیت‌هایی است که محققین همواره با آنها روبرو بوده‌اند [۴].

امروزه تلاش‌های زیادی در جهت ارتقاء کیفیت تکنیک انسداد موقت شریان میانی مغز که نزدیکترین شرایط مشابه ایسکمی مغزی را در انسان فراهم می‌کند، صورت گرفته است. پیشنهاد شده است که استفاده از ثبت جریان خون مغز می‌تواند گام مهمی در بهبود کیفیت تکنیک و افزایش میزان موفقیت آن باشد [۱۲]. مطالعه قبلی ما نشان داد که ثبت جریان خون مغز نقش مهمی در بهبود کیفیت تکنیک ایجاد ایسکمی مغز در موش سوری داشت [۱۲].

استفاده از موش صحرائی جایگاه ویژه‌ای در مطالعات ایسکمیک دارد. شباهت نزدیک آناتومیک و فیزیولوژیک عروق مغزی این گونه به انسان، سهولت تهیه و هزینه کمتر نگهداری آن، امکان تهیه گونه‌های دستکاری شده از نظر ژنتیکی در این حیوان و ارزیابی بهتر اختلالات حرکتی ناشی از ایسکمی در موش صحرائی توسط آزمون‌های معرفی شده سبب شده که مدل‌های ایجاد ایسکمی در موش صحرائی کاربردی وسیعی در مطالعات انجام شده داشته باشد [۱۳].

در این مطالعه تلاش شده است با بکار گرفتن امکاناتی چون ثبت مداوم جریان خون موضعی مغز، تهیه نخ مخصوص با پوشش سیلیکون در زیر میکروسکوپ و ایجاد تغییراتی در روند جراحی ضمن کاهش مرگ و میر میزان موفقیت تکنیک در موش صحرائی را افزایش داد.

## روش کار

در این مطالعه از موش صحرایی نر نژاد Sprague-Dawley با محدوده وزنی ۲۸۰-۳۳۰ گرم از مرکز نگهداری حیوانات دانشگاه علوم پزشکی اردبیل برای انجام آزمایشات استفاده شد. حیوانات دسترسی آزادانه به آب و غذای مخصوص داشتند و در دمای  $23 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد و دوره‌های روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. آزمایشات بر اساس آئین‌نامه تحقیقاتی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل برای مطالعات حیوانی انجام شد.

## ثبت جریان خون موضعی مغز

در تمامی حیوانات جریان خون موضعی در نیمکره چپ مغز با استفاده از جریان سنج لیزری (ساخت شرکت ID Instrument استرالیا) و پروب فلزی (از نوع Pencil Probe- MNP100) ثبت شد. حیوان با تزریق داخل صفاقی کلرال هیدرات ( $400 \text{ mg/kg}$ ) (شرکت سیگما، استرالیا) بی‌هوش شد. در فاصله بین چشم و گوش حیوان در سمت چپ برشی در پوست ایجاد شده و زیر میکروسکوپ با دقت عضله تمپورال از محل اتصال آن به جمجمه جدا شد. گودال کوچک و ظریفی با استفاده از میکروموتور دریل بر روی استخوان گیجگاهی جمجمه (در موقعیت ۱ میلی‌متر خلفی و ۵ میلی‌متر جانبی نسبت به بریکما<sup>۱</sup>) جهت استقرار نوک پروب ایجاد شد [۱۴].

پس از تثبیت پروب جریان سنج لیزری متصل به سیستم ثبت دیجیتال پاورلب در موقعیت تعیین شده ثبت مداوم جریان موضعی خون در لوب تمپورال جمجمه از آغاز جراحی شروع شده و در طول دوره القاء ایسکمی و برقراری مجدد جریان خون و تا پایان جراحی ادامه پیدا کرد. در لحظه وقوع ایسکمی کاهش جریان خون به زیر ۲۰٪ مقادیر پایه به عنوان شاخص انسداد شریان میانی مغز و شروع دوره ایسکمی تلقی شد.

## ایجاد ایسکمی مغزی

ایسکمی موضعی مغز با انسداد شریان میانی مغز با استفاده از یک نخ مخصوص ایجاد شد [۱۳، ۱۵]. در طول زمان آزمایش با استفاده از یک سیستم کنترل فیدبکی دمای بدن حیوان در محدوده  $37 \pm 0.5$  درجه سانتی‌گراد حفظ شد. برای ایجاد ایسکمی، شریان میانی مغز با استفاده از تکنیک انسداد داخل عروقی بصورت موقت مسدود شد. برای این کار از نخ نایلون (۰-۴) از نوع اتیلون ساخت شرکت اتیکون<sup>۲</sup> آلمان پوشیده از سیلیکون که در زیر میکروسکوپ و با روش خاصی آماده شده بود استفاده شد. برش طولی در قسمت میانی جلو کردن حیوان ایجاد شده و شریان کاروتید مشترک چپ از بخش جانبی گردن و بدون برش عضلات روی نای با دقت از بافت‌های اطراف و عصب واگ مجاور آن جدا شد. شریان کاروتید مشترک و شاخه خارجی آن با گره نخ بخیه مسدود گردید. شریان کاروتید داخلی با استفاده از یک میکروکلمپ بطور موقت مسدود شده و نخ آماده شده با ایجاد برش کوچکی به داخل شریان کاروتید مشترک و سپس شاخه داخلی آن هدایت شد. اطراف محل ورود نخ با یک گره نخ بخیه بسته شد تا از خونریزی به دنبال برداشتن میکروکلمپ جلوگیری شود. پس از برداشتن میکروکلمپ نخ مخصوص در داخل شریان کاروتید داخلی به سمت محل انشعاب شریان میانی مغز در حلقه ویلیس به جلو رانده شد و با سقوط جریان خون موضعی به کمتر از ۲۰٪ مقدار پایه وقوع ایسکمی تایید شد. پس از ۹۰ دقیقه با خارج کردن نخ مخصوص از مسیر عروقی جریان خون دوباره در ناحیه ایسکمیک برقرار شد. پس از بخیه زدن ناحیه جراحی گردن و محل پروب بر روی سر حیوان به قفس انتقال یافت.

## ارزیابی اختلالات حرکتی نورولوژیک

۲۴ ساعت پس از پایان ایسکمی حیوانات از نظر بروز اختلالات حرکتی ناشی از ایسکمی مورد ارزیابی قرار

<sup>۲</sup>Ethicon<sup>۱</sup>Bregma

مغز با حذف اثر ایجاد شده توسط ادم مغزی محاسبه شد.

### اندازه گیری ادم مغزی

در حیواناتی که جهت ارزیابی ادم مغزی ناشی از ایسکمی مورد مطالعه قرار گرفتند، ۲۴ ساعت پس از پایان ایسکمی مغزی حیوانات کشته شده و مغز حیوان به سرعت خارج شد. بخش‌های پل مغزی، مخچه و پیاز بویایی جدا شده و نیمکره‌های سالم و ایسکمیک از هم جدا شدند. نمونه‌های بافت مغزی دو نیمکره در ظرف‌های وزن شده مشخصی قرار داده شده و مجدداً وزن شدند تا وزن مرطوب آنها بدست آید. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۱۰ درجه در اوون نگهداری شدند و دوباره وزن شده و وزن خشک نمونه‌های بافتی تعیین شد. محتوی آب نیمکره‌های مغز با استفاده از رابطه زیر محاسبه شده و نتایج بصورت درصد بیان شد و تفاوت آب دو نیمکره ( $\Delta H_2O$ ) به عنوان شاخص شدت ادم ایجاد شده تعیین شد [۱۶].

$$100 \times \text{وزن مرطوب} / (\text{وزن خشک} - \text{وزن مرطوب}) = \text{محتوی آب مغز} \\ \Delta H_2O = \text{محتوی آب نیمکره سالم (چپ)} - \text{محتوی آب نیمکره ایسکمیک (راست)}$$

### پروتکل تحقیق

حجم ضایعه مغزی و اختلالات حرکتی نورولوژیک ۲۴ ساعت پس از پایان دوره ایسکمی در دو گروه مورد مطالعه قرار گرفتند.

گروه ایسکمیک (هر گروه ۸ سر): در این گروه ایسکمی مغزی با انسداد شریان میانی مغز به مدت ۱ ساعت ایجاد شد.

گروه شاهد (هر گروه ۸ سر): در این گروه جراحی ناحیه گردن انجام شده و شریان کاروتید چپ و شاخه‌های آن از بافت‌های اطراف جدا شدند اما انسداد شریان میانی مغز صورت نگرفت. همچنین ادم ایسکمیک مغزی ۲۴ ساعت پس از پایان دوره ایسکمی در دو گروه دیگر از حیوانات شامل گروه ایسکمیک گروه شاهد مورد ارزیابی قرار گرفت.

گرفتند. برای اینکار از یک آزمون ویژه که قبلاً توسط پلسنیلا<sup>۱</sup> و همکارانش توصیف شده است با ایجاد کمی تغییرات استفاده شد [۱۵].

در این آزمون به حیوانی که از نظر حرکتی طبیعی بوده و اختلال حرکتی نداشت نمره ۱ داده می‌شد. اگر به هنگام آویزان شدن حیوان از دم خم شدن پای جلو سمت مقابل ضایعه یا کاهش توانایی چنگ زدن در آن اندام مشاهده می‌شد نمره ۲ به حیوان تعلق می‌گرفت. حیوانی که قادر به حرکت خودبخودی در تمام جهات در حالت استراحتی بود ولی به هنگام کشیدن دم حرکت چرخشی نشان می‌داد، نمره ۳ دریافت می‌کرد. حیوانی که حرکت چرخشی خودبخودی در هر جهت نشان داد نمره ۴ دریافت می‌کرد. حیوانی که به سمت مقابل ضایعه تکیه زده و توانایی به پاخواستن<sup>۲</sup> را از دست می‌داد نمره ۵ می‌گرفت و بالاخره حیوانی که هیچگونه فعالیت حرکتی خودبخودی نداشت نمره ۶ دریافت می‌کرد.

### تعیین حجم ضایعه مغزی

۲۴ ساعت پس از پایان دوره ایسکمی، حیوان زیر بیهوشی عمیق کشته شد. مغز حیوان خارج شده و به مدت ۵ دقیقه در نرمال سالین سرد قرار گرفت تا قوام لازم جهت برش با استفاده از ماتریکس مخصوص را پیدا کند. شش برش به ضخامت ۲ میلی‌متر از مغز حیوان تهیه شد. برش‌ها با غوطه ور شدن در محلول ۲٪ تری فنیل تترازولیم کلراید ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه رنگ آمیزی شد. پس از آن با استفاده از یک دوربین دیجیتال متصل به کامپیوتر از برش‌ها تصویربرداری شد. با استفاده از نرم افزار آنالیز تصویر<sup>۳</sup>، سطح ناحیه ضایعه و دو نیمکره در هر برش اندازه‌گیری شد و با کمک قالب تعریف شده در نرم‌افزار ایکسل<sup>۴</sup> حجم ضایعه مغزی ایجاد شده، درصد وقوع ضایعه ایسکمیک در کورتکس و نواحی زیرقشری

<sup>1</sup>Plesnila

<sup>2</sup>Righting Reflex

<sup>3</sup>NIH Image Analyzer

<sup>4</sup>Excel

## تجزیه و تحلیل آماری

برای آنالیز آماری نتایج از نرم افزار آماری سیگما است<sup>۱</sup> و ایکسل استفاده شد. برای مقایسه نتایج از آزمونهای آماری آنالیز واریانس و T - test استفاده شد و مقادیر  $p < 0.05$  معنی دار تلقی شد. داده‌ها بصورت میانگین  $\pm$  خطای معیار استاندارد بیان شده است.

## یافته‌ها

### ثابت جریان خون موضعی مغز

به دنبال وقوع انسداد شریان میانی مغز در حیوانات گروه‌های ایسکمیک جریان خون موضعی مغز به زیر

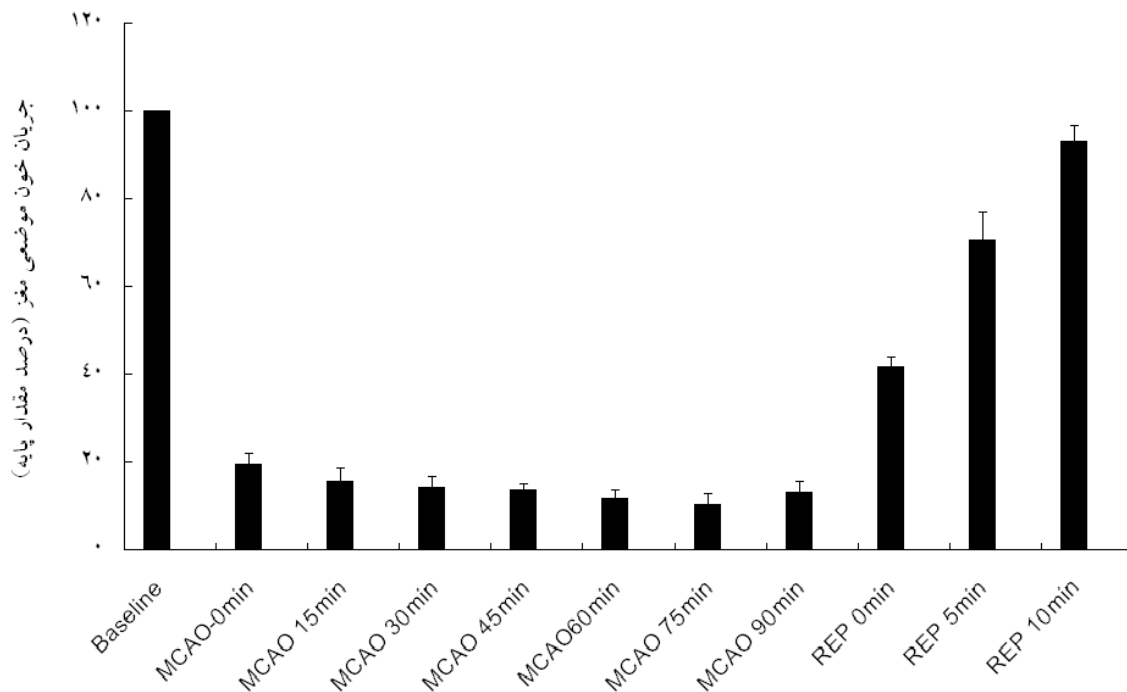
عروقی جریان خون بتدریج به نزدیک مقادیر پایه افزایش یافت (شکل ۱).

### ارزیابی اختلالات حرکتی نورولوژیک

حیوانات گروه شاهد از نظر عملکرد حرکتی طبیعی بودند. در حیوانات گروه ایسکمیک ۲۴ ساعت پس از وقوع ایسکمی ۹۰ دقیقه‌ای اختلالات حرکتی شدیدی مشاهده شد و میزان نمره آزمون نورولوژیک در این گروه بطور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود ( $p < 0.001$ ,  $4 \pm 0.5$ ) (شکل ۲).

### تعیین حجم ضایعه مغزی

در برش‌های تهیه شده از مغز حیوانات گروه شاهد ضایعه‌ای مشاهده نشد. اما وقوع ایسکمیک در مغز



نمودار ۱. ثابت جریان خون موضعی مغز با جریان سنج لیزری قبل از ایسکمیک (Baseline: مقدار پایه)، بعد از انسداد شریان میانی مغز (MCAO) و پس از برقراری مجدد جریان خون (REP).

حیوانات گروه ایسکمیک ضایعه شدیدی با حجم  $43 \pm 0.2$  میلی‌متر مکعب در نیمکره چپ مغز ایجاد کرد که  $62/7\%$  آن در مناطق قشری مغز و  $37/3\%$  آن در نواحی زیر قشری ایجاد شده بود (شکل ۳).

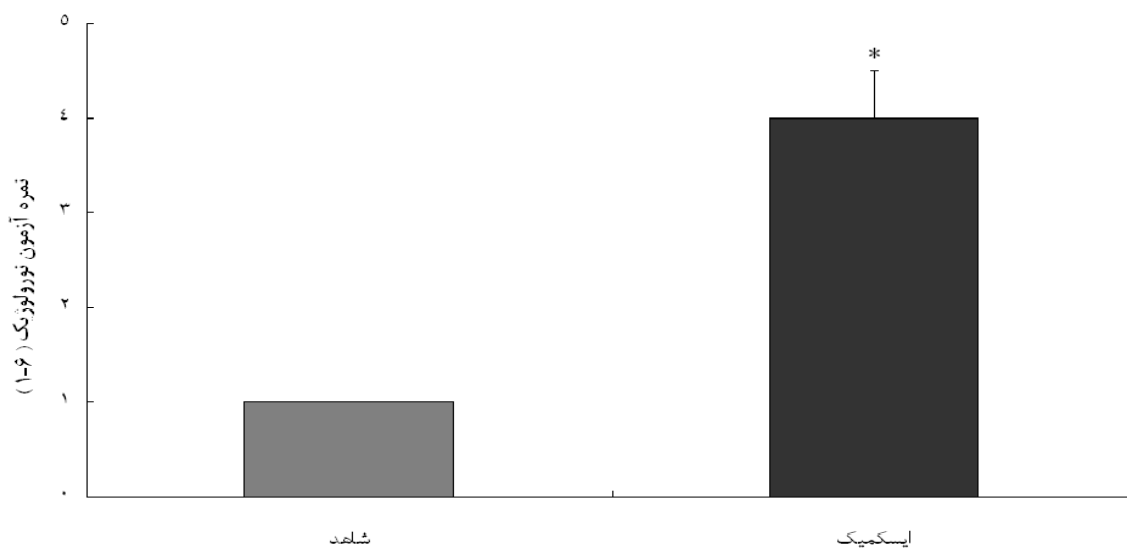
۲۰٪ مقدار پایه کاهش پیدا کرد و در طول دوره ۹۰ دقیقه‌ای ایسکمیک تغییری نداشت. در پایان دوره ایسکمیک و به دنبال خارج کردن نخ مخصوص از مسیر

<sup>1</sup>Sigma Stat

۵ ایجاد شده است که به نظر می‌رسد کانون ناحیه خورسانی توسط شریان میانی مغز باشد (شکل ۴).

بررسی نتایج آزمون نورولوژیک و میزان حجم ضایعه

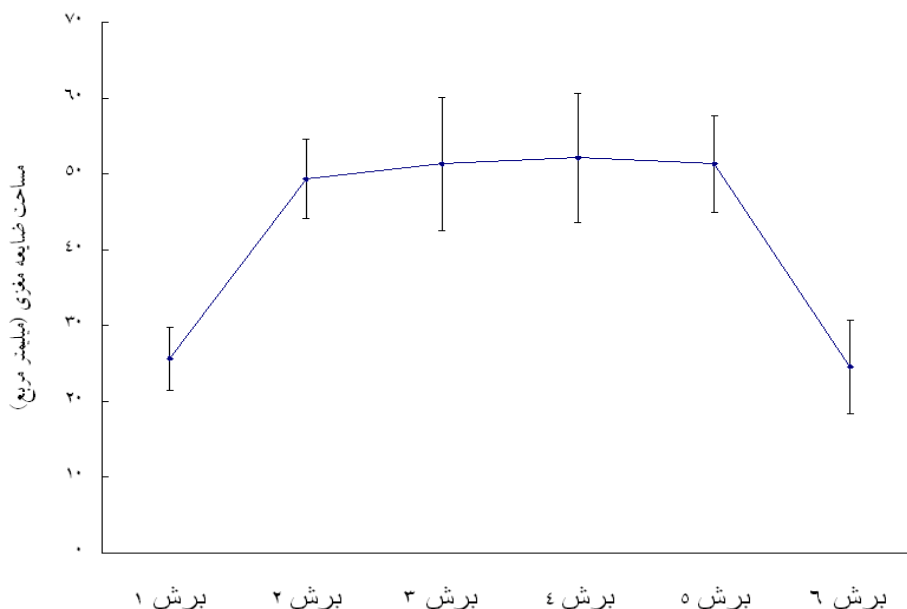
بررسی سطح ضایعه ایجاد شده در برش‌های شش گانه تهیه شده از مغز گروه ایسکمیک نشان می‌دهد که عمده ایسکمی ایجاد شده در برش‌های شماره ۲، ۳، ۴ و



نمودار ۲. نمره آزمون نورولوژیک در حیوانات گروه شاهد (n=8) و گروه ایسکمیک (n=8)، ۲۴ ساعت پس از وقوع ایسکمی مغزی ( $p < 0.001$ ).



شکل ۳. نمونه ای از تصاویر برشهای مغزی تهیه شده از مغز موش صحرانی ۲۴ ساعت پس از ایسکمی (۹۰ دقیقه) یا جراحی. منطقه سالم به رنگ تیره و ناحیه ایسکمیک به رنگ روشن مشاهده می‌شود (A گروه شاهد، B گروه ایسکمیک).



نمودار ۴. مساحت ضایعه مغزی ایجاد شده در برشهای تهیه شده از سطوح مختلف مغز در حیوانات گروه ایسکمیک (n=8) ۲۴ ساعت پس از وقوع ایسکمی (۹۰ دقیقه)

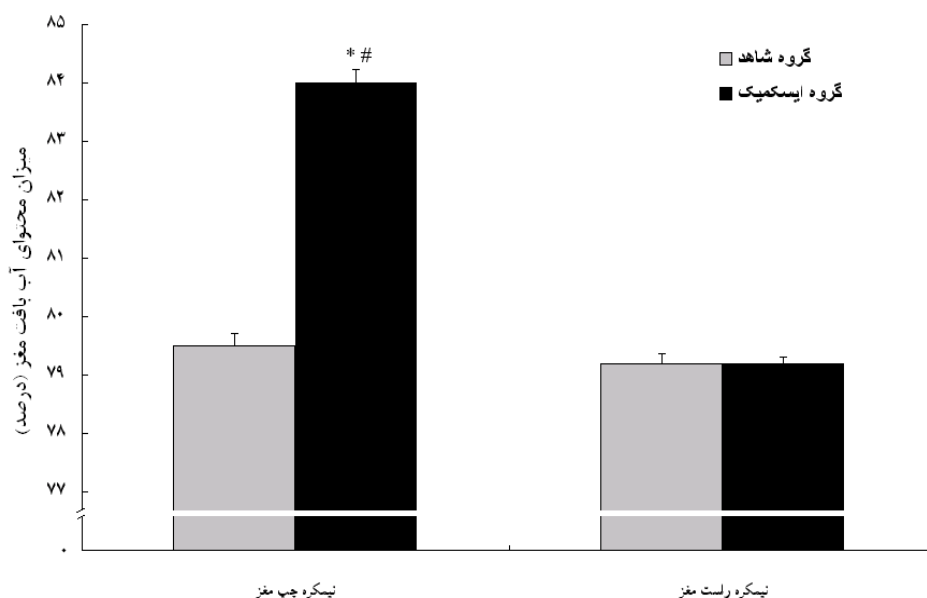
حیوانات گروه ایسکمیک در اثر ادم شدید، افزایش یافته و بطور معنی داری از محتوی آب نیمکره سالم مغز همان گروه و نیمکره های مغز گروه شاهد بیشتر بود (۲۳/±۰/۸۴ درصد،  $p < 0/05$ ). میزان محتوی آب در نیمکره راست (سالم) مغز گروه ایسکمیک  $79/2 \pm 0/1$  درصد) تفاوت معنی داری با نیمکره های مغز گروه شاهد نداشت (شکل ۵).

شکل ۶ میزان تفاوت آب نیمکره ایسکمیک مغز را نسبت به نیمکره سالم به عنوان شاخص شدت ادم ایجاد شده نشان می دهد. میزان ادم ایجاد شده در گروه ایسکمیک بطور معنی داری بیشتر از گروه شاهد بود (۲/±۰/۸۴ درصد،  $p < 0/001$ ).

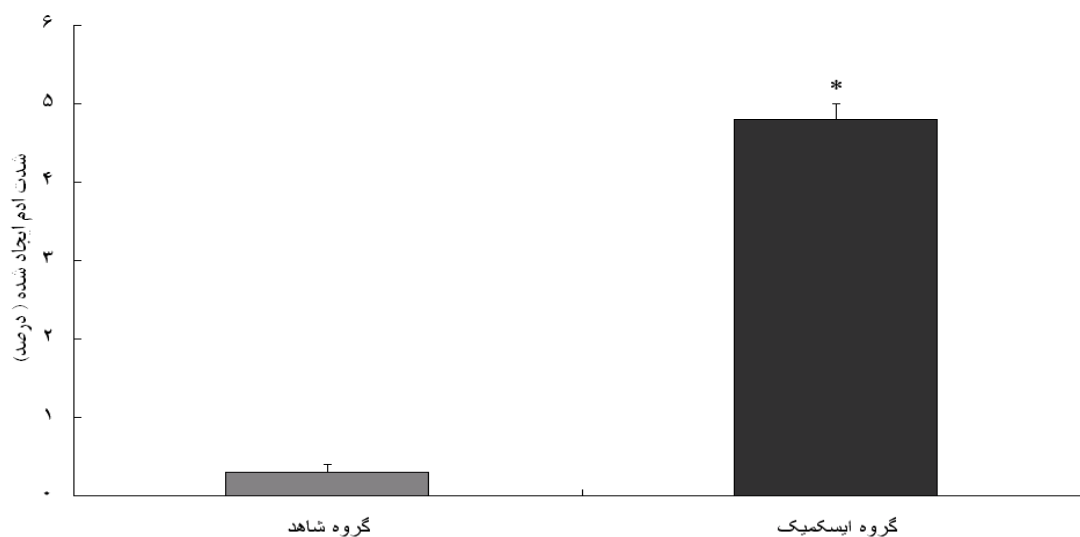
مغزی نیز نشان می داد که میان نمره آزمون نورولوژیک و حجم ضایعه مغزی رابطه مستقیمی وجود دارد. حیواناتی که نمره آزمون نورولوژیک بالاتری داشتند و اختلالات حرکتی شدیدی نشان دادند حجم ضایعه مغزی وسیعتری نیز داشتند ( $R^2 = 0.86$ ). همچنین میزان موفقیت تکنیک در ایجاد ایسکمی ۱۰۰٪ بود و مرگ و میر حیوانات به جهت عوارض تکنیک ایجاد ایسکمی و خونریزی مغزی مشاهده نشد.

### ارزیابی ادم مغزی

در این مطالعه از تعیین میزان محتوی آب بافت نیمکره های مغز جهت ارزیابی ادم مغزی ایجاد شده پس از وقوع ایسکمی استفاده شد. محتوی آب نیمکره های مغز حیوانات گروه شاهد با هم تفاوت معنی داری نداشتند (به ترتیب  $79/2 \pm 0/27$  درصد و  $79/5 \pm 0/21$  درصد). محتوی آب نیمکره چپ مغز



نمودار ۵. محتوای آب بافت نیمکره های مغز در حیوانات گروه شاهد (n=۸) و گروه ایسکمیک (n=۸)، ۲۴ ساعت پس از وقوع ایسکمی مغزی (\* نسبت به نیمکره چپ گروه شاهد، # نسبت به نیمکره راست همانگروه،  $p < 0.05$ ).



نمودار ۶. شدت ادم ایجاد شده در نیمکره ایسکمیک (چپ) مغز در حیوانات گروه شاهد (n=۸) و گروه ایسکمیک (n=۸)، ۲۴ ساعت پس از وقوع ایسکمی مغزی (\* نسبت به گروه شاهد  $p < 0.05$ ).

هزینه‌های اقتصادی سنگینی را بر این جوامع تحمیل می‌کند. با رشد جمعیت و افزایش شیوع عوامل خطرناکی چون دیابت، چاقی و فشار خون بالا میزان

### بحث

سکته مغزی به عنوان سومین عامل مرگ و میر و یکی از علل عمده معلولیت‌های دراز مدت اثرات عمیقی بر سلامت و بهداشت جوامع بشری داشته و سالیانه



از عوامل اصلی آسیب عروق مغزی و وقوع خونریزی و مرگ حیوانات مورد آزمایش بود. در این مطالعه از ثبت مداوم جریان خون موضعی نیمکره چپ مغز در محدوده خونرسانی شریان میانی مغز با استفاده از جریان سنج لیزری جهت هدایت نخ در مسیر عروقی استفاده شد و کاهش جریان خون به زیر ۲۰٪ مقدار پایه به عنوان شاخص ایجاد انسداد کامل تلقی شد. کاربرد جریان سنج لیزری و ثبت مداوم جریان خون موضعی مغز در این مطالعه در کنار نوع نخ تهیه شده میزان موفقیت تکنیک را تا ۱۰۰٪ موارد آزمایش بالا برد که مشابه نتایج گزارش شده در مطالعه پیشین بر روی موش سوری با میزان موفقیت ۹۷/۶٪ می باشد [۱۲] و بسیار مطلوبتر از نتایج گزارش شده در مدل‌های قبلی که میزان موفقیت خود را ۸۶٪ [۲]، ۷۰٪ [۲۵]، ۶۶٪ [۲۶]، بیان کرده‌اند، می باشد. در همین رابطه محققین دیگری نیز کاربرد جریان سنج لیزری را در موفقیت تکنیک ایجاد ایسکمی مغزی تعیین کننده دانسته‌اند [۲۱، ۲۷].

یکی از عوامل مهم که بر شدت ایسکمی و حجم ضایعه مغزی اثر می‌گذارد طول دوره انسداد شریان میانی مغز و زمان اختصاص یافته به مرحله برقراری مجدد جریان خون می‌باشد [۷]. تجربیات به دست آمده حاکی از این است که دوره ایسکمی طولانی به میزان ۱۲۰ دقیقه مرگ و میر بالایی را باعث می‌شود [۲۸]. همچنین دوره زمانی ۶۰ دقیقه در مطالعات قبلی ما تجربه شده است [۲۳، ۲۹] به نظر می‌رسد دوره انسداد ۹۰ دقیقه نتایج بهتر و قابل استنادتری از نظر حجم ضایعه، ادم مغزی و اختلالات حرکتی ایجاد می‌کند و این مسئله توسط محققین دیگر نیز گزارش شده است [۲۶، ۹، ۳۰]. از این رو در این مطالعه دوره ایسکمی ۹۰ دقیقه جهت مطالعه انتخاب شده است. همچنین نظر به اینکه مرگ بیش از ۹۰٪ نوره‌ها در ناحیه ایسکمیک در طی ۲۴ ساعت پس از آغاز برقراری مجدد جریان خون صورت می‌گیرد [۳۱] همانند بیشتر مطالعات صورت گرفته در زمینه ایسکمی این دوره

بروز سکنه مغزی همچنان رو به افزایش است [۱۷]، [۱۸، ۱۹].

پاتوفیزیولوژی پیچیده این بیماری و دخالت عوامل سلولی و مولکولی متعدد همچنان درمان موثر آنرا مشکل ساخته است. امروزه مطالعات وسیعی در جهت شناسایی عوامل دخیل در آسیب ایسکمیک مغز و معرفی روش‌های درمانی جدید موثر در کاهش آسیب نورونی مغز و بهبود اختلالات حرکتی صورت می‌گیرد.

مدل‌های حیوانی ایسکمی مغزی با هدف ایجاد سکنه مغزی در الگوی مشابه انسان شرایط مناسبی را جهت مطالعه پاتوفیزیولوژی سکنه مغزی و بررسی استراتژی‌های درمانی و داروهای جدید فراهم می‌کند اما روش‌های استفاده شده با محدودیت‌های زیادی روبرو است. مرگ و میر بالای حیوانات مورد مطالعه که غالباً به علت خونریزی از عروق آسیب دیده روی می‌داد، عدم موفقیت تکنیک در بسیاری از موارد با وجود صرف هزینه و زمان، دامنه تغییرات بالا در حجم ضایعه نمونه‌هایی از این مشکلات بودند. در این مطالعه ایجاد ایسکمی بر اساس تکنیک انسداد موقت داخل عروقی صورت گرفت که امکان برقراری مجدد جریان خون در شرایطی مشابه بروز سکنه مغزی در انسان را فراهم می‌سازد [۸، ۲۰، ۲۱].

برای انسداد شریان میانی مغز از نخ نایلون (چهار صفر از نوع اتیلون) با پوشش بسیار ظریفی از سیلیکون که با روش مخصوص در زیر میکروسکوپ تهیه شده بود استفاده شد که نقش بسیار تعیین کننده‌ای در افزایش میزان موفقیت تکنیک و کاهش احتمال خونریزی داشت. مطالعات قبلی نیز کاربرد این نوع نخ را در ایجاد موفق ایسکمی و کاهش مرگ و میر بسیار موثر دانستند [۱۲، ۱۰، ۲۱].

در مطالعات پیشین از روش‌هایی چون انتخاب طول نخ متناسب با وزن حیوان [۲۳، ۲۲، ۱۱]، هدایت تجربی نخ و تعیین موقعیت مناسب با احساس مقاومت خفیف در مسیر نخ [۲۴، ۲۳] برای هدایت نخ استفاده شده که یکی

توجه به جایگاه ویژه موش صحرایی در مطالعات ایسکمیک که اشاره شد، در این مطالعه تلاش شده تا با بکارگیری تجربیات کسب شده توسط محققین این مطالعه و محققان دیگر مدلی از موش صحرایی با کمترین میزان محدودیت‌ها و بالاترین درصد کارایی جهت مطالعات ایسکمیک معرفی کرد [۸،۱۱،۱۵،۲۴،۲۸].

### نتیجه گیری

کاربرد جریانسنج لیزری جهت ثبت مداوم جریان خون موضعی مغز نقش تعیین کننده در افزایش موفقیت تکنیک ایجاد ایسکمی موضعی مغز در موش صحرایی دارد. مدل حاضر با ویژگی‌هایی چون ضریب موفقیت بالا، مرگ و میر کم، دامنه تغییرات کم در نتایج ضایعات ایسکمیک و قابلیت ارزیابی بهتر اختلالات حرکتی انتخاب مناسبی جهت مطالعات پژوهشی در زمینه شناسایی عوامل موثر در ضایعه ایسکمیک مغزی و معرفی روش‌های درمانی جدید می‌باشد.

### تشکر و قدردانی

بدینوسیله از مدیریت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل که در تامین هزینه‌های این مطالعه ما را یاری کردند تشکر و قدردانی بعمل می‌آید.

زمانی جهت مرحله برقراری مجدد جریان خون انتخاب شده است [۲۳،۲۴،۳۱].

گونه‌های مختلفی از حیوانات اعم از حیوانات بزرگ (مانند سگ، گربه، خرگوش و خوکچه) و حیوانات کوچک (مانند موش صحرایی، موش سوری و جریبل) جهت مطالعات ایسکمی استفاده شده است. گونه موش صحرایی جایگاه مهمی در مدل‌های حیوانی مطالعات ایسکمیک دارد که از دلایل آن می‌توان به موارد ذیل اشاره کرد. موش صحرایی از نظر آناتومی و فیزیولوژی عروق مغزی بسیار مشابه انسان می‌باشد. سایز کوچک مغز حیوان امکان آنالیز بهتر نتایج ضایعه ایسکمیک را با کمترین هزینه و زحمت و زمان فراهم می‌کند. امکان تهیه گونه‌های دستکاری شده از نظر ژنتیکی در این حیوان شرایط مناسبی جهت مطالعه پیچیدگی‌های سخته مغزی فراهم می‌کند. بررسی اختلالات حرکتی ناشی از ایسکمی با آزمون‌های استاندارد معرفی شده در این حیوان وجود دارد و به سهولت و با هزینه کم در همه آزمایشگاه‌ها قابل تهیه است [۱۳].

در مطالعه پیشین ما مدل استاندارد شده‌ای از ایسکمی را در موش سوری گزارش کردیم [۱۲]. اما با توجه به اینکه جراحی بر روی موش سوری نیازمند امکانات ویژه به جهت سایز کوچک حیوان می‌باشد و برش نمونه‌های مغزی نیز ابزارهای ویژه‌ای می‌طلبد که ممکن است در هر آزمایشگاهی موجود نباشد و نیز با

### References

- 1- Dawson TM, Dawson VL. Protection of the brain from ischemia: In Batjer HH(ed): Cerebrovascular diseases. Philadelphia,PA: Lippincott- Ravan publishers, 1997: 319 - 325.
- 2- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. Trends Neurosci, 1999 Sep, 22(9): 391-7.
- 3- Zivin JA, Grotta JC. Animal stroke models. They are relevant to human disease. Stroke 1990 Jul; 21(7): 981-983.
- 4- Hossmann KA. Experimental models for the investigation of brain ischemia. Cardiovasc Res. 1998 Jul; 39(1): 106-20.
- 5- Tamura A, Asano T, Sano K, Tsumagari T, Nakajima A. Protection from cerebral ischemia by a new imidazole derivative (Y-9179) and pentobarbital. A comparative study in chronic middle cerebral artery occlusion in cats. Stroke. 1979 Mar-Apr; 10(2):126-34.

- 6- Zivin JA, DeGirolami U, Kochhar A, Lyden PD, Mazzarella V, Hemenway CC, Henry ME. A model of quantitative evaluation of embolic stroke therapy. *Brain Res*, 1987 Dec; 435(1-2): 305-309.
- 7- Alonso de Lecinana M, Diez-Tejedor E, Carceller F, Roda JM. Cerebral ischemia: From animal studies to clinical practice. *Cerebrovasc Dis*. 2001; 11(1): 20-30.
- 8- 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.
- 9- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats. *Stroke*. 1989 Jan; 20(1): 84-91.
- 10- Laing RJ, Jakubowski J, Laing RW. Middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Which method works best? *Stroke*. 1993 Feb; 24(2): 294-7.
- 11- 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; 27:1616-22.
- 12- Panahpour H, Plesnila N. Presentation of a standard model of focal cerebral ischemia induction for evaluating of sequelae brain edema in mice. *J Ardabil Univ Med Sci*; 2009, 9:33-43. (Full text in Persian)
- 13- Wang Fischer Y. Manual of stroke models in rats. First edition, CRC Press, Taylor & Francis e-library, 2008, 25-27.
- 14- Hungerhuber E, Zausinger S, Westermaier T, Plesnila N, Schmid-Elsaesser R. Simultaneous bilateral laser Doppler fluxmetry and electrophysiological recording during middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosci Methods*, 2006 Jun; 154(1-2):109-115.
- 15- 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 Dec; 98(26): 15318-23.
- 16- Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Muller C, Kluge A, Kaps M, et al. Middle cerebral artery occlusion during MR-imaging: investigation of the hyperacute phase of stroke using a new in-bore occlusion model in rats. *Brain Res Protoc*, 2004 Feb; 12 (3):137- 143.
- 17- American heart association. Heart and stroke statistical update, American heart association, Dallas, 2002. [www.heart.org](http://www.heart.org).
- 18- American heart association in collaboration with the international liaison committee on resuscitation. Guidelines for cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care. *Circulation*. 2000 Aug; 102 (8): 1-384.
- 19- Thom T, Haase N, Rosamond , Adams R, Friday G, Furie K. AHA statistical update, heart diseases and stroke statistics. *Circulation*. 2006 Feb;113(6): 85-151.
- 20- Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM. Focal cerebral ischaemia in the rat: description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1981; 1(1): 53-60.
- 21- Schmid-Elsaesser R, Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen HJ. A critical reevaluation of the intraluminal thread model of focal cerebral ischemia: evidence of inadvertent premature reperfusion and subarachnoid hemorrhage in rats by laser-Doppler flowmetry. *Stroke*. 1998 Oct; 29(10):2162-2170.
- 22- Vakili A, Nekooeian AA, Dehghani GA. L-NAME and 7-Nitroindazole reduces brain injuries in transient focal cerebral ischemia in the rat. *Iran J Med Sci*. 2004, 29: 109-115.
- 23- Panahpour H, Nekooeian AA, Dehghani GA. Inhibition of angiotensin converting enzyme reduces cerebral infarction size in experimental induced focal cerebral ischemia in the rat. *Iranian J Med Sci*, 2007 Mar, 32(1):12-17.
- 24- 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 May; 1144: 186-91.

- 25- Oliff HS, Weber E, Eilon G, Marek P. The role of strain/vendor differences on the outcome of focal ischemia induced by intraluminal middle cerebral artery occlusion in the rat. *Brain Res*, 1995 Mar; 675(1-2): 20-6.
- 26- Kuge Y, Minematsu K, Yamaguchi T, Miyake Y. Nylon monofilament for intraluminal middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 1995 Sep; 26(9): 1655-7.
- 27- Mao Y, Yang GY, Zhou LF, Stern JD, Betz AL. Focal cerebral ischemia in the mouse: description of a model and effects of permanent and temporary occlusion. *Brain Res Mol Brain Res*. 1999 Jan; 63(2):366-370.
- 28- Vakili A. Role of nitric oxide and tumor necrosis factor alpha in transient model of focal cerebral ischemia in rat. Ph.D thesis, Faculty of Medicine, Shiraz, 2004; 24-57.
- 29- Panahpour H, Dehghani GA. Inhibition of central angiotensin-converting enzyme with enalapril protects the brain from ischemia/reperfusion injury in normotensive rat. *Daru*. 2010, 18: 35-40.
- 30- Nagasawa H, Kogure K. Uncoupling of blood flow and glucose metabolism in the neighboring postischemic edematous brain area. In: *Adv Neurol*, 1990; 52: 63–71.
- 31- Kataoka H, Kim SW, Plesnila N. Leukocyte-endothelium interactions during permanent focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004 Jun; 24(6): 668-76.

## Induction of Focal Cerebral Ischemia by Continuous Recording of Cerebral Blood Flow Using Laser Doppler Flowmeter in Rat

Panahpour H, PhD<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Corresponding Author: Assistant Prof, of Physiology and pharmacology dept., School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran. E-mail: panahpour.h@gmail.com

### ABSTRACT

**Background & objectives:** Ischemic stroke is the third leading cause of death and disability in most of the human societies. There is no effective treatment due to complexity of the pathophysiological mechanisms. Today, more researches are designed to introduce involving factors and new treatment strategies in brain ischemia. The objective of this study is to introduce an experimental model of the focal cerebral ischemia in rat with increased success rate and low mortality rate.

**Methods:** In this research 32 male rats (Sprague-Dawley) were studied as in four experimental groups. Animals were anesthetized with chloral hydrate (400mg/kg, ip). Focal cerebral ischemia was induced by intraluminal filament method. A silicon coated nylon filament was used for middle cerebral artery occlusion. Regional cerebral blood flow was monitored by laser Doppler flowmetry to guide the insertion of the filament into the vascular pathway. 24 hours after ischemia (90minutes), animals were assessed for neurological outcome, infarct volume and brain edema formation. A new and reformed neurological test was used for evaluation of neurological deficits. 2 - millimeter coronal sections were collected from 6 levels of the brain and stained, digitized and quantified by using an image analysis system. Ischemic brain edema formation was investigated by brain water content detection.

**Results:** Induction of ischemia in ischemic group, seriously caused impairment of motor functions (neurological deficit score  $4\pm 0.5$ ) While sham operated rats had no motor deficit and infarction. Mean total infarct volume of left (ischemic) hemisphere was  $402\pm 43$  mm<sup>3</sup> and 62.7 percent of infarction occurred in cortical regions of the brain. Induction of focal cerebral ischemia in the left (ischemic) hemisphere of the brain significantly increased water content ( $84\pm 0.23$  percent) compared to both hemispheres of sham group and right hemisphere of the same group. Success rate of ischemia induction was 100 percent and there was no mortality due to technical problems.

**Conclusion:** Our findings indicate that continuous recording of regional cerebral blood flow using laser Doppler flowmeter had significant role in increasing success rate and lowering mortality rate in the present model of ischemic rat. This experimental model with high success rate and low limitation can be used for brain ischemia studies and evaluating new therapeutic strategies.

**Key words:** Focal Cerebral Ischemia; Brain Edema; Cerebral Blood Flow Recording; Laser Doppler Flowmeter; Rat