

Doświadczalne modele zwierzęce udaru niedokrwiennego mózgowia*

Experimental animals models of cerebral ischaemia

Przemysław Kowiański, Grażyna Lietzau, Jerzy Dziewiątkowski, Janusz Moryś

Zakład Anatomii i Neurobiologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Streszczenie

Niezadowalające wyniki leczenia udaru niedokrwiennego mózgu sprawiają, że w centrum zainteresowania przedstawicieli wielu dyscyplin naukowych pozostaje zarówno poznanie patofizjologii tego procesu, jak i opracowanie skutecznych metod terapeutycznych. Oba te cele można osiągnąć, prowadząc badania podstawowe i kliniczne. W bogatym piśmiennictwie dotyczącym omawianego zagadnienia zwracają uwagę kontrowersje dotyczące wyników badań doświadczalnych i klinicznych. O ile zwierzęce modele procesu niedokrwiennego mózgowia są bardzo przydatne w badaniach biochemicznych i patofizjologicznych, o tyle ich przydatność w badaniach nad nowymi lekami jest kwestionowana. W pracy omówiono najczęściej stosowane modele doświadczalne procesu niedokrwiennego mózgowia, ich zalety i wady oraz przyczyny możliwych rozbieżności między wynikami badań doświadczalnych i klinicznych.

Udar Mózgu 2009; 11 (2): 70–79

Słowa kluczowe: model doświadczalny, neuroprotekcja, niedokrwienie, szczur, udar mózgu

Abstract

Unsatisfactory cerebral ischaemic stroke treatment make understanding of pathophysiology of this process and developing effective therapies the focus of interest of many scientific disciplines. Both these goals can be achieved in the course of basic and clinical research. A large body of information concerning this issue is controversial. Animal ischaemic models seem to be a very useful tool for biochemical and pathophysiological research; however their employment in new drug development research is widely questioned. In this report we discuss the most widely used experimental models of the ischaemic stroke, their advantages and disadvantages, and possible reasons for discrepancy in results of basic and clinical research.

Interdisciplinary Problems of Stroke; 11 (2): 70–79

Key words: experimental model, neuroprotection, ischaemia, rat, stroke

Wstęp

Znaczna częstość występowania niedokrwiennego udaru mózgu oraz ciągle jeszcze niezadowalające wyniki jego leczenia powodują, że badania patofizjologii tego procesu oraz badania nowych środków terapeutycznych znajdują się w centrum zainteresowania specjalistów z wielu dziedzin medycyny, reprezentujących zarówno dyscypliny teoretyczne, jak i kliniczne.

Nie można sobie wyobrazić badań nad nowymi lekami, które nie byłyby poprzedzone badania-

mi na zwierzętach. To tłumaczy potrzebę opracowania doświadczalnych modeli procesu niedokrwiennego, które możliwie najwierniej oddawałyby warunki panujące w mózgowiu człowieka.

Udar mózgu jest jedną z trzech najczęstszych przyczyn śmierci wśród osób dorosłych. Przeważająca część udarów mózgu (ok. 87%) ma charakter niedokrwienno [1, 2–4]. Aż 65% z nich występuje w dorzeczu tętnicy środkowej mózgu, 2% — tętnicy przedniej mózgu, 9% — tętnicy tylnej mózgu. Pozostała część obejmuje udary w okolicy pnia mózgowia lub występujące w obszarach położonych w zakresie unaczynienia kilku głównych gałęzi tętniczych.

Patomechanizm udarów niedokrwienno ma najczęściej podłoże zakrzepowe lub zatorowe albo jest związany ze skurczem naczyniowym [5]. Rozwijające się niedokrwienie może mieć charakter całkowity (globalny) lub częściowy (ogniskowy bądź wielogniskowy). Najczęstsza przyczyna całkowitego niedokrwienia to zatrzymanie akcji serca, wstrząs lub wzrost ciśnienia śródczaszkowego. Częściowe niedokrwienie może wystąpić w prze-

Adres do korespondencji:

dr hab. med. Przemysław Kowiański
Zakład Anatomii i Neurobiologii
Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Dębinki 1, 80–211 Gdańsk
tel.: +48 58 349 14 01
faks: +48 58 349 14 21
e-mail: kowiansk@amg.gda.pl
Praca wpłynęła do Redakcji: 21 października 2009 r.
Zaakceptowano do druku: 5 lutego 2010 r.

*Praca finansowana z programu statutowego St-11. Autorzy pracy nie zgłaszają konfliktu interesów.

biegu zakrzepu w zakresie określonego naczynia mózgowego (np. tętnicy środkowej mózgu), śródoperacyjnego zamknięcia naczynia czy wreszcie w przebiegu skurczu naczyniowego.

Prawidłowe funkcjonowanie tkanki nerwowej zależy od utrzymania w granicach normy dopływu tlenu i glukozy [5]. Niedokrwienie prowadzi do zmniejszenia ich zawartości. Procesy molekularne, występujące w przebiegu niedokrwienia, są konsekwencją spadku ilości dostępnej energii [6, 7]. Powoduje to zwiększanie uwalniania glutaminy i aktywację jego receptorów. W konsekwencji dochodzi do depolaryzacji błony komórkowej w okolicy niedokrwienia i rozprzestrzeniania się strefy uszkodzenia. To przyczynia się do zmian stężenia jonów Na^+ , K^+ , Ca^{2+} i Cl^- w przestrzeni zewnątrz- i wewnątrzkomórkowej. Rozwija się obrzęk mózgu. Rezultatem wzrostu stężenia jonów Ca^{2+} wewnątrz komórki jest aktywacja wielu enzymów (np. proteaz, endonukleaz, lipaz) oraz wzrost zawartości wolnych rodników tlenowych. Prowadzi to do uruchomienia mechanizmów molekularnych kończących się śmiercią komórkową, między innymi na drodze nekrozy bądź apoptozy [8, 9]. Przedstawione w pewnym skrócie procesy przebiegają z określoną dynamiką i natężeniem, które zależą od charakteru niedokrwienia, czasu, jaki upłynął od jego rozpoczęcia, a także od lokalizacji uszkodzonego obszaru.

Ze względu na różnice czynnościowe i morfologiczne oraz różnice w wielkości przepływu krwi obszar niedokrwienno można podzielić na trzy strefy: 1) strefę łagodnego niedokrwienia (ang. *benign oligemia*), w której mimo zmniejszonego przepływu krwi zostaje zachowana strukturalna i czynnościowa integralność tkanki nerwowej; 2) strefę półcienia (ang. *penumbra*), w której zmniejszenie przepływu krwi prowadzi do zaburzeń czynnościowych mimo braku uszkodzeń samej struktury; 3) strefę dokonanego zawału (ang. *ischemic core*), w której doszło do nieodwracalnego uszkodzenia struktury i funkcji mózgowia [2, 3].

Podatność na wystąpienie niedokrwienia, jakkolwiek nie do końca wyjaśniona, zależy między innymi od dostępności energii, wielkości przemiany metabolicznej, temperatury ciała, obecności w organizmie określonych substancji o charakterze neuroprotektynnym, a także, przynajmniej w pewnym stopniu, od pochodzenia ewolucyjnego danej struktury mózgowia [10]. Wiele rejonów mózgu wykazuje zróżnicowaną tolerancję na niedokrwienie. Jest ona najniższa w sektorze CA1 hipokampa, gdzie zmiany niedokrwienne zaczynają się już po 4 minutach. W innych rejonach mózgowia,

w warunkach normotermii, ognisko zawałowe powstaje po 30–60 minutach niedokrwienia.

Skutki niedokrwienia są związane z charakterem zaburzeń krążenia krwi, odpowiedzią stresową, peroksydacją oraz aktywacją określonych genów. Należy podkreślić, że uszkodzenie tkanki nerwowej wynika zarówno z samego niedokrwienia, jak i następującej po nim reperfuzji. Dlatego modele oparte na zjawisku permanentnego niedokrwienia naśladują udar bez reperfuzji (rzadziej spotykany), natomiast modele czasowego niedokrwienia naśladują przejściowe napady niedokrwienne, udary ze spontaniczną reperfuzją lub wywołaną działaniem leków (taki przebieg jest bliższy warunkom klinicznym). Rezultatem czasowego niedokrwienia jest nasilenie procesów glikolizy beztlenowej, kwasicy, fragmentacji DNA oraz uwalniania glutaminy, co zwiększa uszkodzenie w stosunku do spotykanego w przebiegu permanentnego niedokrwienia [3, 4].

Ogólna charakterystyka zwierzęcych modeli doświadczalnych

Głównym celem każdego doświadczalnego modelu procesu niedokrwienno mózgowia jest ograniczenie dostępu tlenu i glukozy do określonego obszaru tkanki nerwowej. Idealny model powinien odpowiadać zmianom zachodzącym w organizmie pacjenta podczas udaru niedokrwienno [3–5, 11, 12]. Powinien być prosty do przeprowadzenia, mało inwazyjny, powtarzalny, wolny od powikłań i możliwy do zastosowania u więcej niż jednego gatunku zwierząt. Model ten powinien się także charakteryzować niskimi kosztami oraz możliwością do zaakceptowania nakładem pracy.

Gryzonie są odpowiednie do badań doświadczalnych nad niedokrwieniem mózgowia ze względu na: 1) dobrą znajomość ich procesów fizjologicznych oraz budowy anatomicznej; 2) schemat unaczynienia mózgowia podobny jak u człowieka; 3) łatwość hodowli, przy niewielkich kosztach; 4) możliwość ingerencji genetycznej; 5) społeczną akceptacją badań.

Tradycyjny podział obejmuje modele doświadczalne odtwarzające warunki całkowitego (globalnego) oraz częściowego (ogniskowego lub wielogniskowego) niedokrwienia [2, 3, 5, 12, 13]. Dodatkowo, w każdej z tych grup, można wyróżnić modele niedokrwienia czasowego i permanentnego. W tabeli I przedstawiono zestawienie najczęściej stosowanych modeli doświadczalnych procesu niedokrwienno wraz z wybranymi publikacjami zawierającymi ich charakterystykę.

Tabela I. Wybrane zwierzęce modele doświadczalne udaru niedokrwiennego mózgowia

Table I. Selected experimental animals models of the brain ischaemia

Rodzaj niedokrwienia i model doświadczalny <i>Type of cerebral ischaemia and experimental model</i>	Wybrane publikacje <i>Selected references</i>
Modele całkowitego niedokrwienia mózgowia <i>Models of the global brain ischaemia</i>	
Niedokrwienie <i>in vivo</i> <i>In vivo ischaemic models</i>	
Zatrzymanie akcji serca (roztwór KCl) <i>Cardiac arrest (KCl solution)</i>	Myers i Yamaguchi 1977 [14], Blomqvist i Wieloch 1985 [15]
Obniżenie ciśnienia tętniczego <i>Induced hypotension</i>	Brierley i wsp. 1969 [16]
Migotanie komór <i>Ventricular fibrillation</i>	Hossmann i Hossmann 1973 [17]
Podanie płynu fizjologicznego do zbiornika wielkiego <i>Infusion of the physiological solution into the cisterna magna</i>	Siesjö i Zvetnow 1970 [18]
Dekapitacja (preparaty izolowanego mózgowia) <i>Decapitation (isolated brain)</i>	Krieglstein i wsp. 1972 [19]
Zamknięcie gałęzi łuku aorty <i>Occlusion of the branches of the arch of aorta</i>	Korpatchev i wsp. 1982 [20]
Zamknięcie aorty <i>Occlusion of aorta</i>	Wade i wsp. 1975 [21]
Obustronne zamknięcie tętnic szyjnych wewnętrznych <i>Bilateral occlusion of the internal carotid arteries</i>	Barone i wsp. 1993 [22], Mitsufuji i wsp. 1996 [23]
Zamknięcie tętnic szyjnych wewnętrznych i kręgowych <i>Occlusion of the internal carotid and vertebral arteries</i>	Pulsinelli i Brierley 1979 [24]
Niedokrwienie <i>in vitro</i> <i>In vitro ischaemic models</i>	
Hodowle komórkowe <i>Cell cultures</i>	Goldberg i Choi 1993 [25], Vornow i wsp. 1994 [26]
Skrawki mózgowia <i>Brain slices</i>	Dong i wsp. 1988 [27]
Modele częściowego niedokrwienia mózgowia <i>Models of the focal brain ischaemia</i>	
Zamknięcie tętnicy szyjnej wspólnej <i>Occlusion of the common carotid artery</i>	Levine i Payan 1966 [28]
Zamknięcie tętnicy środkowej mózgu: <i>Occlusion of the middle cerebral artery:</i>	
• dostęp przezoczodołowy <i>intraorbital approach</i>	O'Brien i Waltz 1973 [29]
• dostęp przezczaszkowy <i>transcranial approach</i>	Arsava i wsp. 2009 [30]
• dostęp wewnątrznaczyniowy, z zastosowaniem monofilamentowej nici chirurgicznej <i>intravascular approach with the monofilament surgical thread</i>	Koizumi i wsp. 1986 [31], Longa i wsp. 1989 [32], Connolly i wsp. 1996 [33]
Zastosowanie skrzepliny własnej krwi zwierzęcia do wytworzenia zatoru <i>Autologous intravascular clot embolism</i>	Kudo i wsp. 1982 [34]
Zastosowanie materiału syntetycznego do wytworzenia zatoru <i>Intravascular embolism with synthetic material</i>	Lauer i wsp. 2002 [35], Purdy i wsp. 1989 [36], Yang i wsp. 2002 [37]
Wytworzenie skurczu naczyniowego (endotelina 1) <i>Vasospasm (endothelin 1)</i>	Sharkey i wsp. 1993 [38]
Obliteracja naczyń włosowatych: <i>Capillaries obliteration:</i>	
• zastosowanie endoteliny 1 <i>with endothelin 1</i>	Agnati i wsp. 1991 [39]
• zastosowanie fototrombozy <i>with photothrombosis</i>	Watson i wsp. 1985 [40], Matsuno i wsp. 1993 [41], Schroeter i wsp. 2002 [42]

Warunki patofizjologiczne odtwarzane przez wybrane modele doświadczalne i ich przydatność w planowanych badaniach

Każdy z przedstawionych modeli doświadczalnych odtwarza, w bardziej lub mniej doskonały sposób, warunki procesu patologicznego występującego w mózgowiu pacjenta podczas udaru niedokrwiennego. Globalne niedokrwienie mózgowia może zostać wywołane przerwaniem akcji serca (np. poprzez migotanie komór) czy uciskiem mechanicznym wielkich naczyń na szyi lub we wnętrzu klatki piersiowej [17, 20–23]. Można je także wywołać przez zamknięcie tętnic szyjnych wewnętrznych oraz tętnic kręgowych lub podając płyn fizjologiczny do zbiornika wielkiego, w celu zwiększenia ciśnienia śródczaszkowego [18, 24]. Można je również uzyskać poprzez izolację mózgowia zwierzęcia (dekapitację) [19]. Przedstawiona wyżej grupa modeli doświadczalnych znajduje zastosowanie w badaniach zmian zachodzących w mózgowiu po całkowitym zatrzymaniu krążenia (ang. *cardiac arrest*), a także w badaniach zmian poresuscytacyjnych oraz badaniach leków neuroprotektoryjnych.

Do niewątpliwych zalet tego rodzaju modeli należą: możliwość wywołania niedokrwienia w strukturach położonych poza obszarem unaczynienia tętnicy szyjnej wewnętrznej, możliwość oceny zmian zachodzących jednocześnie w różnych (odległych od siebie) strukturach ośrodkowego układu nerwowego (OUN), a także możliwość wytworzenia jednakowych pod względem biochemicznym i patofizjologicznym warunków niedokrwienia w całym mózgowiu.

Główna wada modeli należących do tej grupy polega na tym, że zaburzenia funkcji układu krążenia (np. zatrzymanie akcji serca) wpływają jednocześnie na funkcje innych narządów, co niewątpliwie wywiera istotny wpływ na charakter zmian w strukturach OUN. Ponadto długość niedokrwienia mózgowia zwykle znacznie przekracza czas zatrzymania akcji serca i nie może być precyzyjnie kontrolowana. Istotne znaczenie ma również wysoka śmiertelność zwierząt doświadczalnych, a także konieczność zapewnienia bardzo pracochłonnego monitoringu podstawowych parametrów fizjologicznych w przebiegu pooperacyjnym (stan po resuscytacji). Zdecydowanie zwiększa to czasochłonność i koszty badań.

Częściowe niedokrwienie mózgowia wywołuje się przede wszystkim przez zewnątrz- lub wewnątrzczaszkowe zamknięcie tętnicy środkowej mózgu. W przypadku wyboru pierwszej metody powszechnie stosowanym sposobem jest wprowa-

dzenie monofilamentowej nici chirurgicznej (o grubości 4–0 u szczura lub 6–0 u myszy) poprzez kikut tętnicy szyjnej zewnętrznej lub poprzez tętnicę szyjną wspólną i umieszczenie jej zaokrąglonego końca w miejscu podziału tętnicy szyjnej wewnętrznej na tętnicę środkową mózgu oraz tętnicę przednią mózgu [31–33]. Odległość od miejsca wprowadzenia nici do naczynia do miejsca podziału tętnicy szyjnej wewnętrznej wynosi zazwyczaj 17–22 mm u szczura, a 9–12 mm u myszy. Umożliwia to wywołanie niedokrwienia w okolicy czołowo-ciemieniowej kory oraz w bocznej części prążkowiec. Jak wykazano w licznych badaniach, grubość nici, głębokość jej wprowadzenia, a także pokrycie jej powierzchni smarem silikonowym lub poli-L-lizyną ściśle się wiąże z wielkością wytworzonego obszaru niedokrwiennego [43, 44].

Do najważniejszych zalet tej metody należą duża powtarzalność uzyskanych wyników, stosunkowo krótki czas wykonania zabiegu, a także możliwość uniknięcia kraniotomii. W modelu tym zazwyczaj dochodzi do wytworzenia stosunkowo dużego obszaru półcienia (penumbry).

Wadą tej metody jest brak bezpośredniej kontroli nad położeniem szwu, możliwość perforacji naczynia i wytworzenia krwawienia podpajęczynówkowego, duża objętość obszaru niedokrwienia (dorzecza tętnicy środkowej i przedniej mózgu), a także częsta hipertermia wynikająca z uszkodzenia podwzgórza. Co bardzo ważne, model ten odzwierciedla proces patofizjologiczny odmienny od zachodzącego w trakcie udaru na podłożu zakrzepowym, ze względu na gwałtowny charakter zamknięcia naczynia wprowadzoną nicią chirurgiczną. Mimo pewnych zastrzeżeń model ten jest odpowiedni do badania przydatności nowych leków neuroprotektoryjnych.

W przypadku wyboru drogi wewnątrzczaszkowej zamyka się tętnicę środkową mózgu na powierzchni mózgowia za pomocą bardzo cienkiej nici chirurgicznej (11–0) lub odpowiedniej wielkości zacisku naczyniowego bądź bezpośrednio uciskając naczynie odpowiednio przygotowaną szklaną pipetą [30]. Do rzadziej stosowanych obecnie metod należy zamknięcie tętnicy środkowej mózgu po dotarciu do niej drogą przezoczodołową [29].

Do zalet metody bezpośredniego zamknięcia tętnicy środkowej mózgu należy duża powtarzalność wyników, a szczególnie wielkości i położenia obszaru niedokrwienia. Co ważne, można w sposób wybiórczy dokonywać zamknięcia bliższego lub dalszego odcinka naczynia, prowadząc do wytworzenia niedokrwienia odpowiednio w obrębie struktur podkorowych oraz kory mózgu lub wyłącznie w obszarach korowych. Ponadto moż-

na dowolnie regulować długość okresu niedokrwienia, co stanowi niewątpliwą zaletę.

Wadą metody wewnątrzczaszkowego zamknięcia tętnicy środkowej mózgu jest możliwość łatwego uszkodzenia powierzchni kory, wywołania krwawienia podpajęczynówkowego oraz konieczność dobrego opanowania podstawowych zasad techniki mikrochirurgicznej.

Przedstawione wyżej modele obliteracji tętnicy środkowej mózgu znajdują zastosowanie w odтворzeniu warunków panujących podczas czasowego lub permanentnego zamknięcia naczynia, na przykład w przebiegu zabiegu operacyjnego lub (z pewnymi zastrzeżeniami) podczas zatoru tętniczego. Opisane modele są przydatne do badań nad lekami neuroprotektoryjnymi (w połączeniu z lekami trombolitycznymi) [11, 12].

Odrębną grupę stanowią modele oparte na wewnątrznaczyniowym wytworzeniu zakrzepu krwi lub powstaniu zatoru tętniczego wskutek wstrzyknięcia skrzepu krwi lub materiału syntetycznego, takiego jak kolagen, silikon, srebrne mikrosfery [34–37].

Wytworzenie obszaru niedokrwienia metodą fototrombozy polega na podaniu do układu naczyniowego barwnika (np. różu bengalskiego), a następnie naświetlaniu światłem lasera o określonej długości fali wybranego rejonu czaszki lub dorzeza odsłoniętej tętnicy środkowej mózgu [40–42]. Prowadzi to do ograniczonego uszkodzenia śródbłonna naczyniowego, a w konsekwencji — aktywacji układu krzepnięcia oraz agregacji płytek krwi zamykających światło naczynia.

Niewątpliwą zaletą tego modelu jest duże podobieństwo do procesu zakrzepowego, występującego w warunkach klinicznych. Model ten jest stosunkowo prosty do wykonania pod względem technicznym oraz nie wymaga wykonania kraniotomii, a dzięki temu jest mało inwazyjny.

Do wad tej grupy modeli należy zaliczyć konieczność uwzględnienia różnic międzygatunkowych w działaniu układu krzepnięcia, gwałtowny charakter powstawania zmian zakrzepowych, a także brak pełnej kontroli nad rozległością obszaru zawałowego i związaną z tym małą powtarzalność wyników. W swej klasycznej, pierwotnej formie model oparty na zjawisku fototrombozy pozwalał wytworzyć obszar niedokrwienności, pozabawiony strefy półcienia. Po wprowadzeniu modyfikacji (wytworzenie obszaru uszkodzenia o kształcie pierścienia; ang. *ring model*) wadę tę wyeliminowano.

Grupa modeli oparta na wytworzeniu zakrzepu jest szczególnie przydatna w badaniach nowych leków trombolitycznych, fibrynolitycznych i neu-

roprotektoryjnych, a także w badaniach patofizjologii procesu trombolitycznego [2, 3, 5, 13].

Wewnątrznaczyniowe lub śródmózgowe podanie peptydu naczyniowego endoteliny 1 prowadzi do silnego skurczu naczyniowego, co powoduje powstanie ogniska niedokrwienności [38, 39].

Główną zaletą tej metody jest mała inwazyjność oraz dobra kontrola położenia ogniska niedokrwienia. Model ten jest przydatny w badaniu odpowiedzi astrocytarnej na proces niedokrwienności oraz do oceny regeneracji aksonalnej.

Modele niedokrwienia *in vitro*, prowadzone w warunkach hodowli komórkowych, pozwalają na kontrolowanie składu otaczającego środowiska, a w szczególności ograniczania w sposób kontrolowany dostępu glukozy i tlenu (OGD, *oxygen-glucose deprivation model*) [25–27, 45]. Wadą tej grupy modeli jest konieczność utrzymywania tkanek w środowisku, którego skład jest często odmienny od składu płynów występujących w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, a także narażenie komórek na niekontrolowane uszkodzenie, także niedokrwienne, podczas pobierania materiału.

Czynniki mogące wpływać na wynik badań z zastosowaniem doświadczalnych modeli udarów niedokrwienności mózgowia

Warunki anatomiczne — budowa koła tętniczego mózgowia

Gatunki ssaków wykorzystywanych do badań doświadczalnych odznaczają się dużymi różnicami w ukształtowaniu koła tętniczego mózgowia. Dotyczą one przede wszystkim budowy gałęzi naczyniowych tętnicy szyjnej wewnętrznej oraz układu kręgowo-podstawnego, a także połączenia między obu układami, za pośrednictwem tętnic łączących tylnych i bliższych odcinków tętnic tylnych mózgu [46]. Różnice te muszą być uwzględniane przy planowaniu badań doświadczalnych na różnych gatunkach zwierząt.

U gryzoni (np. szczurów) występują bardzo silnie rozwinięte tętnice łączące tylne, co sprawia, że prawie 60% objętości krwi docierającej do mózgowia pochodzi z układu kręgowo-podstawnego [2–4, 46]. U królika występuje zrównoważony typ budowy koła tętniczego mózgowia. Dalszy odcinek tętnicy tylnej mózgu powstaje z równomiernie ukształtowanego połączenia tętnicy łączącej tylnej i bliższego odcinka tętnicy tylnej mózgu. Podobny typ budowy koła tętniczego mózgowia jest spotykany u ssaków drapieżnych (np. kota). U ssaków kopytnych (np. owcy) w unaczynieniu mózgowia zaznacza się przewaga układu tętnic szyjnych wewnętrznych [46].

U świni stwierdzono występowanie tak zwanej sieci dziwnej (łac. *rete mirabile*) zaopatrywanej w krew przez tętnicę gardłową wstępującą i tętnicę szyjną wewnętrzną, co szczególnie utrudnia wywołanie niedokrwienia mózgowia [47].

Szczególnym ukształtowaniem układu tętniczego mózgowia odznaczają się myszokoczek (ang. *gerbil*) oraz niektóre gatunki myszy, u których zazwyczaj nie występują tętnice łączące tylne, a tym samym nie można mówić o istnieniu kręgu tętniczego mózgowia [28, 48]. Taki typ budowy układu naczyniowego może sprzyjać wytwarzaniu w warunkach doświadczalnych niedokrwienia w dorzeczu tętnicy szyjnej wewnętrznej lub układu kręgowo-podstawnego.

Podsumowując przytoczone dane z zakresu anatomii porównawczej układu naczyniowego, warto podkreślić znaczenie właściwego wyboru gatunku zwierzęcia do planowanego rodzaju badań.

Monitorowanie parametrów fizjologicznych

Podstawą uzyskania wiarygodnych wyników, dających się porównać z wynikami badań klinicznych, jest dokładne monitorowanie określonych parametrów fizjologicznych.

Niemal wszyscy autorzy zdecydowanie podkreślają konieczność dokładnego monitorowania takich parametrów, jak: wielkość mózgowego przepływu krwi, temperatura wewnętrzna ciała, stężenia O_2 , CO_2 i glukozy w surowicy, ciśnienie tętnicze [5, 11–13, 49].

Niekorzystny wpływ hipertermii na przebieg udaru niedokrwienego wykazano zarówno w warunkach doświadczalnych, jak i klinicznych. Hipotermia natomiast działa korzystnie w warunkach doświadczalnych, jednak nie potwierdzono jednoznacznie jej pozytywnego efektu w warunkach klinicznych [50]. Hiperglikemia wywiera negatywny wpływ na przebieg niedokrwienego udaru mózgu, zarówno w warunkach doświadczalnych, jak i klinicznych. Szczególnie niekorzystnie wpływa na rokowanie w przypadku niedokrwienia z następującą reperfuzyją [49, 51].

Kompleksowa ocena wyników

Ocena wyników uzyskanych za pomocą wybranych modeli doświadczalnych powinna mieć charakter wielokierunkowy. Powinna dotyczyć przede wszystkim precyzyjnego określenia stanu czynnościowego (neurologicznego) zwierząt [52] — nie tylko ich sprawności czuciowo-ruchowej, lecz także zdolności poznawczych, pamięci i uczenia się [53–55]. Badania te należy przeprowadzić kilkakrotnie w różnych odstępach czasu po wystąpieniu niedokrwienia.

Przyżyciowa ocena ewolucji procesu niedokrwienego za pomocą nieinwazyjnych technik obrazowania to istotne uzupełnienie badań czynnościowych, pozwalające na określenie lokalizacji i dynamiki zmian.

Metoda pozytronowej tomografii emisyjnej (PET, *positron emission tomography*) pozwala wprawdzie na zdefiniowanie obszaru dokonanego zawału (zmniejszone zużycie glukozy i tlenu) oraz strefy półcienia (wzrost zużycia glukozy i współczynnika ekstrakcji tlenu) [56], jednak — ze względu na mniejszą zdolność rozdzielczą — nie pozwala na tak precyzyjne określenie granic tych obszarów, jak metody biochemiczne. Stanowi to pewne ograniczenie, szczególnie w odniesieniu do mózgowia małych zwierząt [3].

Metoda rezonansu magnetycznego (MRI, *magnetic resonance imaging*) to powszechnie uznany sposób określenia zasięgu obszarów niedokrwienia, także w warunkach doświadczalnych. Obszarowi zawału, wraz z towarzyszącym obrzękiem, może odpowiadać zmniejszona wartość współczynnika dyfuzji (ADC, *apparent diffusion coefficient*) oraz zwiększona intensywność sygnału w obrazowaniu techniką dyfuzyjną (DWI, *diffusion-weighted MR images*) [2–4, 57]. Strefa półcienia jest obszarem zmniejszonego przepływu krwi, co może się przejawiać zmniejszoną intensywnością sygnału w obrazowaniu techniką perfuzyjną (PWI, *perfusion-weighted MR images*) [58].

Wielkość i lokalizację obszaru niedokrwienego powinno się także ocenić metodami biochemicznymi. Metoda bioluminescencji pozwala na pomiar zawartości określonych metabolitów, takich jak na przykład ATP, glukoza i mleczany w obszarze niedokrwienia, na podstawie reakcji enzymatycznej zachodzącej z ich udziałem, podczas której dochodzi do emisji światła o określonych parametrach fizycznych [59–61]. Jego intensywność jest związana z zawartością badanych substancji. Metodę tę można wykorzystać do określenia strefy dokonanej martwicy (spadek zawartości ATP) i strefy półcienia (kwasica, zmniejszenie intensywności syntezy białka) [2–4].

Metoda fluorescencyjna pozwala określić gradient pH w rejonie niedokrwienia, co pośrednio wskazuje na lokalizację obszarów o największym stopniu przemian beztlenowych [62].

Mapowanie ekspresji genów (m.in. takich genów wczesnej odpowiedzi, jak *c-fos*, *c-jun*, *junB*; genów odpowiedzi stresowej, np. *hsp70*) może być przydatne między innymi do określenia zasięgu strefy półcienia [6, 63, 64].

Opisane wyżej badania powinny być uzupełnione oceną dokonaną metodami histologicznymi.

Istotne znaczenie ma określenie wielkości obszaru uszkodzenia metodami morfometrycznymi, a także jakościowa i ilościowa ocena uszkodzenia (śmierci) neuronów za pomocą barwienia znacznikiem Fluoro-Jade, metodą TUNEL (ang. *terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick-end-labeling*) lub za pomocą 2,3,5-chloroku trifenylotetrazolowego (TTC, *2,3,5-triphenyltetrazolium chloride*) [3, 9, 65–67].

Istotnym problemem w obiektywnej ocenie niedokrwienia jest ciągły i bardzo dynamiczny charakter zmian wielkości obszaru łagodnego niedokrwienia, strefy półcienia i obszaru dokonanej martwicy [2, 3, 5, 49]. W związku z tym ważne jest, aby ocena procesu niedokrwienia metodami przyżyciowymi była powtarzana, miała charakter wielokierunkowy oraz aby była przeprowadzona kompleksowo u wszystkich osobników badanej grupy.

Należy podkreślić, że wielokrotnie stwierdzano brak ścisłej zależności między dynamiką zmian w obszarze niedokrwionym a dynamiką zmian stanu neurologicznego zwierzęcia [68]. Ponadto poszukiwanie zbyt bliskiej analogii w dynamice zmian stanu neurologicznego zwierząt doświadczalnych i pacjentów, będących przedmiotem oceny klinicznej, jest wielkim i nieuprawnionym uproszczeniem, które może prowadzić do błędnych wniosków.

Rozbieżności między wynikami badań doświadczalnych i klinicznych

Mimo coraz lepszego zrozumienia istoty procesów patofizjologicznych, leżących u podłoża udaru niedokrwionego, jego mechanizmy regulacyjne nie zostały jeszcze całkowicie zbadane. Możliwość ingerencji w przebieg samego udaru środkami terapeutycznymi (farmakologicznymi) jest, jak dotychczas, niewystarczająca.

Zwierzęce modele niedokrwienne odegrały bardzo ważną rolę w zrozumieniu podstaw patofizjologii procesu niedokrwienia mózgowia, jednak ich udział w badaniach nad nowymi lekami wykorzystywanymi w terapii udaru niedokrwionego jest zdecydowanie niezadowolający [68–71]. Co ciekawe, wyniki badań doświadczalnych, prowadzonych na przedstawicielach wielu gatunków ssaków, w bardzo wielu przypadkach nie korespondują z wynikami uzyskanymi w trakcie badań klinicznych. Bardzo często pozytywne rezultaty badań nowych leków przeprowadzone w warunkach doświadczeń na modelach zwierzęcych nie są potwierdzane w próbach klinicznych.

Ta dość często spotykana sytuacja doprowadziła niektórych autorów do wniosku o nieprzy-

datności zwierzęcych modeli doświadczalnych do celów klinicznych. Nasuwa się zatem pytanie, czy modele doświadczalne procesu niedokrwionego mózgowia są przydatne, czy jest sens prowadzić tego typu badania oraz co jest przyczyną tak istotnych różnic w wynikach uzyskanych na poziomie badań doświadczalnych i klinicznych. Mimo kwestionowania znaczenia zwierzęcych modeli doświadczalnych w badaniach nad nowymi lekami, szczególnie o działaniu neuroprotektynnym, od wielu lat są one niezastąpione i ciągle udoskonalane.

Spośród wielu możliwych przyczyn rozbieżności w wynikach badań doświadczalnych i klinicznych najistotniejsze znaczenie wydają się mieć przyczyny związane z podawaniem leku. Zdaniem niektórych autorów leki stosowane w badaniach klinicznych bardzo często nie są podawane w sposób identyczny, jak w badaniach doświadczalnych na zwierzętach [49]. Dotyczy to przede wszystkim dawki leku. Osiągnięcie efektu terapeutycznego (neuroprotektynnego) w badaniach klinicznych wymaga często zastosowania dużej dawki, po której ujawniają się niepożądane działania leku, co uniemożliwia jego dalsze podawanie. Ponadto bardzo często w przypadku permanentnego niedokrwienia efekt neuroprotektynny jest osiągany po podaniu większej dawki leku niż w przypadku niedokrwienia czasowego. Nie zawsze jest to możliwe do osiągnięcia w warunkach klinicznych [49, 68]. Kolejny istotny problem wynika z różnic w długości tak zwanego okna terapeutycznego. Pojęcie to oznacza czas upływający od momentu wystąpienia objawów u pacjenta do chwili podania leku, a w warunkach doświadczalnych — czas upływający od wywołania niedokrwienia do podania badanego preparatu. Biorąc pod uwagę ten bardzo istotny warunek, należy tak planować badania, aby lek o określonym oddziaływaniu biochemicznym był stosowany dokładnie w czasie, w którym kontrolowane przez niego mechanizmy są aktywne w obszarze niedokrwienia. Wynika z tego konieczność bardzo rygorystycznego doboru określonej grupy pacjentów do badań klinicznych (w praktyce badania preparatów o krótkim oknie terapeutycznym są bardzo trudne do zrealizowania) lub takiego zaplanowania zwierzęcego modelu doświadczalnego, aby uwzględnił dłużej trwające procesy biochemiczne (badania preparatów o długim oknie terapeutycznym są łatwiejsze do zrealizowania w warunkach klinicznych). Uwzględnienie tych wymogów podczas planowania badań doświadczalnych na zwierzętach oraz dalszych badań w fazie klinicznej może pozwolić na uzyskanie wiarygodnych i korespondujących ze sobą wyników oraz może przyczynić się do wprowadze-

nia nowych środków terapeutycznych do praktyki klinicznej.

Ponadto różnice między wynikami uzyskanymi w warunkach doświadczalnych i klinicznych mogą wynikać z trzech przyczyn: nieprawidłowego wyboru modelu doświadczalnego, niewłaściwej metody oceny wyników, błędnej interpretacji otrzymanych rezultatów [3, 4].

Jak dobierać modele doświadczalne?

Nie popełniając błędów, można stwierdzić, że nie ma jednego doskonałego modelu doświadczalnego procesu niedokrwienia. Powszechnie stosuje się modele polegające na zamknięciu tętnicy środkowej mózgu (tab. I). Służą one zazwyczaj do badania procesów patofizjologicznych oraz testowania nowych leków neuroprotektoryjnych. Dobrą kontrolę wielkości obszaru niedokrwionego zapewniają modele oparte na zjawisku fototrombozy lub podaniu endoteliny 1. Są one przydatne do badania odległych skutków niedokrwienia, a także procesów naprawczych.

Badania doświadczalne mogą dostarczyć pożytecznych wyników, które można przenieść na warunki kliniczne jedynie wtedy, gdy model doświadczalny wiernie odtworzy warunki patofizjologiczne panujące w organizmie chorego.

Na podstawie krytycznej analizy wyników uzyskanych w badaniach prowadzonych na zwierzęcych modelach doświadczalnych oraz wyników pochodzących z badań klinicznych określono podstawowe warunki, które powinny być spełnione w celu porównania uzyskanych danych i wyciągnięcia użytecznych wniosków.

Warunki te opracowano na podstawie rekomendacji udzielonej przez grupę *Stroke Therapy Academic Industry Roundtable* (STAIR) w 1999 roku [72]. Według tych ustaleń istotne znaczenie ma dobór odpowiedniej dawki leku oparty na obserwacji efektów jego działania oraz na ocenie jego stężenia w surowicy. Nie mniej ważne jest określenie długości tak zwanego okna terapeutycznego, która może się różnić w warunkach czasowego i permanentnego niedokrwienia. Bardzo istotne znaczenie dla powtarzalności wyników ma również monitoring wybranych parametrów fizjologicznych. Ocena powinna być prowadzona na podstawie badań randomizowanych, przeprowadzonych metodą ślepej próby, o odpowiedniej liczbie. Konieczna jest obiektywna ocena wielkości obszaru niedokrwionego oraz wykonanie badań czynnościowych (w tym testów behawioralnych), przeprowadzonych we wczesnym i odległym okresie obserwacji. Zaleca się doświadczenia z perma-

nentnym zamknięciem tętnicy środkowej mózgu u przedstawicieli gatunków małych gryzoni. Należy również przeprowadzić badania u przedstawicieli gatunków większych ssaków (np. Naczelnych), w przypadku oceny leków reprezentujących nowe klasy.

Ponadto, zdaniem wielu autorów, przed przejściem do fazy klinicznej skuteczność danego preparatu należy dodatkowo potwierdzić w modelach opartych na permanentnym i czasowym zamknięciu naczyń, z uwagi na istotne różnice patofizjologiczne w obu typach niedokrwienia. Wyniki muszą być poddane ocenie histologicznej, co potwierdzi ich działanie neuroprotektoryjne zarówno w obszarach korowych, jak i podkorowych (istota biała). Istotne jest także, aby badany preparat wykazywał skuteczność w monoterapii [49].

Podsumowując, należy przypuszczać, że mimo licznych zastrzeżeń i ograniczeń zwierzęce modele doświadczalne procesu niedokrwionego mózgowia pozostaną niezastąpionym narzędziem w badaniach podstawowych, dotyczących patomechanizmu samego zjawiska, jak również będą spełniać istotną rolę w weryfikacji przydatności nowych leków do dalszych badań klinicznych.

Piśmiennictwo

1. Bogousslavsky J., Van Melle G., Regli F.: The Lausanne Stroke Registry: analysis of 1,000 consecutive patients with first stroke. *Stroke* 1988, 19, 1083–1092.
2. Hossmann K.A.: Experimental models for the investigation of brain ischemia *Cardiovasc. Res.* 1998, 39, 106–120.
3. Hossmann K.A.: Cerebral ischemia: models, methods and outcomes. *Neuropharmacology* 2008, 55, 257–270.
4. Hossmann K.A.: Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell Mol. Neurobiol.* 2006, 26, 1057–1083.
5. Traystman R.J.: Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR J.* 2003, 44, 85–95.
6. Ferrer I., Planas A.M.: Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia: life and death struggle in the penumbra. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2003, 62, 329–339.
7. Mehta S.L., Manhas N., Raghuram R.: Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res. Rev.* 2007, 54, 34–66.
8. Ashe P.C., Berry M.D.: Apoptotic signaling cascades. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2003, 27, 199–214.
9. Carloni S., Carnevali A., Cimino M., Balduini W.: Extended role of necrotic cell death after hypoxia-ischemia-induced neurodegeneration in the neonatal rat. *Neurobiol. Dis.* 2007, 27, 354–361.
10. Lietzau G., Kowiański P., Karwacki Z. i wsp.: The molecular mechanisms of cell death in the course of transient ischemia are differentiated in evolutionary distinguished brain structures. *Metab. Brain Dis.* 2009, 24, 507–523.
11. Durukan A., Tatlisumak T.: Ischemic stroke in mice and rats. *Methods Mol. Biol.* 2009, 573, 95–114.
12. Durukan A., Tatlisumak T.: Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2007, 87, 179–197.
13. Durukan A., Strbian D., Tatlisumak T.: Rodent models of ischemic stroke: a useful tool for stroke drug development. *Curr. Pharm. Des.* 2008, 14, 359–370.
14. Myers R.E., Yamaguchi S.: Nervous system effects of cardiac arrest in monkeys. *Arch. Neurol.* 1977, 34, 65–74.

15. Blomqvist P., Wieloch T.: Ischemic brain damage in rats following cardiac arrest using a long-term recovery model. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1985, 5, 420–431.
16. Brierley J.B., Brown A.W., Excell B.J., Meldrum B.S.: Brain damage in the rhesus monkey resulting from profound arterial hypotension. 1. Its nature, distribution and general physiological correlates. *Brain Res.* 1969, 13, 68–100.
17. Hossmann V., Hossmann K.A.: Return of neuronal functions after prolonged cardiac arrest. *Brain Res.* 1973, 60, 423–438.
18. Siesjö B.K., Zwetnow N.N.: Effects of increased cerebrospinal fluid pressure upon adenine nucleotides and upon lactate and pyruvate in rat brain tissue. *Acta Neurobiol. Scand.* 1970, 46, 187–202.
19. Kriegstein G., Kriegstein J., Urban W.: Long survival time of an isolated perfused rat brain. *J. Neurochem.* 1972, 19, 885–886.
20. Korpachev W.G., Sysenkov S.P., Thieliz P.S.: Modelowanie klinicznej smerti i postreanimatoinnoy beleznyi u krysz. *Patol. Fiziol. Eksp. Ter.* 1982, 3, 78–80.
21. Wade J.G., Amtorp O., Sorensen S.C.: No-flow state following cerebral ischemia. Role of increase in potassium concentration in brain interstitial fluid. *Arch. Neurol.* 1975, 32, 381–384.
22. Barone F.C., Knudsen D.J., Nelson A.H., Feuerstein G.Z., Willette R.N.: Mouse strain differences in susceptibility to cerebral ischemia are related to cerebral vascular anatomy. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1993, 13, 683–692.
23. Mitsufuji N., Yoshioka H., Okano S., Nishiki T., Sawada T.: A new model of transient cerebral ischemia in neonatal rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1996, 16, 237–243.
24. Pulsinelli W.A., Brierley J.B.: A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 1979, 10, 267–272.
25. Goldberg M.P., Choi, D.W.: Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture; calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J. Neurosci.* 1993, 13, 3510–3524.
26. Vornow J.J., Tasker R.C., Coyle J.T.: Delayed protection by MK-801 and tetrodotoxin in a rat organotypic hippocampal culture model of ischemia. *Stroke* 1994, 25, 457–464.
27. Dong W.A., Schurr A., Reid K.H., Shields C.B., West C.A.: The rat hippocampal slice preparation as an in vitro model of ischemia. *Stroke* 1988, 19, 498–502.
28. Levine S., Payan H., Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Exp. Neurol.* 1966, 16, 255–262.
29. O'Brien M.D., Waltz A.G.: Transorbital approach for occluding the middle cerebral artery without craniectomy. *Stroke* 1973, 4, 201–206.
30. Arsava E.M., Gurer G., Gursoy-Ozdemir Y., Karatas H., Dalkara T.: A new model of transient focal cerebral ischemia for inducing selective neuronal necrosis. *Brain Res. Bull.* 2009, 16, 78, 226–231.
31. Koizumi J., Yoshida Y., Nakazawa T., Ooneda G.: Experimental studies of ischemic brain edema. 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Japan. J. Stroke* 1986, 8, 1–8.
32. Longa E.Z., Wejstajn P.R., Carlson S., Cummins R.: Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989, 20, 84–91.
33. Connolly E.S., Winfree C.J., Stern D.M., Solomon R.A., Pinsky D.J.: Procedural and strain-related variables significantly affect outcome in a murine model of focal cerebral ischemia. *Neurosurgery* 1996, 38, 523–532.
34. Kudo M., Aoyama A., Ichimori S., Fukunaga N.: An animal model of cerebral infarction. Homologous blood clot emboli in rats. *Stroke* 1982, 13, 505–508.
35. Lauer K.K., Shen H., Stein E.A., Ho K.C., Kampjone J.P., Hudetz A.G.: Focal cerebral ischemia in rats produced by intracarotid embolization with viscous silicone. *Neurol. Res.* 2002, 24, 181–190.
36. Purdy P.D., Devous M.D., Batjer H.H., White C.L., Meyer Y., Samson D.S.: Microfibrillary collagen model of canine cerebral infarction. *Stroke* 1989, 20, 1361–1367.
37. Yang Y., Yang T., Lj Q., Wang C.X., Shuaib A.: A new reproducible focal cerebral ischemia model by introduction of polyvinylsiloxane into the middle cerebral artery. A comparison study. *J. Neurosci. Methods* 2002, 118, 199–206.
38. Sharkey J., Ritchie I.M., Kelly P.A.: Perivascular microapplication of endothelin-1 — a new model of focal cerebral ischaemia in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1993, 13, 865–871.
39. Agnati L.F., Zoli M., Kurosawa M. i wsp.: A new model of focal brain ischemia based on the intracerebral injection of endothelin-1. *Ital. J. Neurol. Sci.* 1991, 12, 49–53.
40. Watson B.D., Dietrich W.D., Busto R., Wachtel M.S., Ginsberg M.D.: Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann. Neurol.* 1985, 17, 497–504.
41. Matsuno H., Uematsu T., Umemura K. i wsp.: A simple and reproducible cerebral thrombosis model in rats induced by a photochemical reaction and the effect of a plasminogen-plasminogen activator chimera in this model. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 1993, 29, 165–173.
42. Schroeter M., Jander S., Stoll G.: Non-invasive induction of focal cerebral ischemia in mice by photothrombosis of cortical microvessels: characterization of inflammatory responses. *J. Neurosci. Methods* 2002, 117, 43–49.
43. Belayev L., Alonso O.F., Busto R., Zhao W.Z., Ginsberg M.D.: Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture — neurological and pathological evaluation of an improved model. *Stroke* 1996, 27, 1616–1622.
44. Turner J.H.: Brain scan in cerebral ischemia. An experimental model in the rat. *Stroke* 1975, 6, 703–706.
45. Pera J.: Modele eksperymentalne udaru. W: Szczudlik A., Członkowska A., Kwieciński H., Słowik A. red. *Udar mózgu*. WUJ, Kraków 2007, 113–118.
46. Goetzen B.: Atlas unaczynienia wewnętrznego mózgowia człowieka i zwierząt doświadczalnych. Anatomia: opisowa, topograficzna, porównawcza i patologiczna. Ossolineum, Wrocław 1996, 17–30.
47. Burbridge B., Matte G., Remedios A.: Complex intracranial arterial anatomy in swine is unsuitable for cerebral infarction projects. *Can. Assoc. Radiol. J.* 2004, 55, 326–329.
48. Kelly S., McCulloch J., Horsburgh K.: Minimal ischaemic neuronal damage and HSP70 expression in MFI strain mice following bilateral common carotid artery occlusion. *Brain Res.* 2001, 914, 185–195.
49. Green R.A., Odergren T., Ashwood T.: Animal models of stroke: do they have value for discovering neuroprotective agents? *Trends Pharmacol. Sci.* 2003, 24, 402–408.
50. Schwab S., Georgiadis D., Berrouschot J., Schellinger P.D., Grafagnino C., Mayer S.A.: Feasibility and safety of moderate hypothermia after massive hemispheric infarction. *Stroke* 2001, 32, 2033–2035.
51. Alvarez-Sabín J., Molina C.A., Montaner J. i wsp.: Effects of admission hyperglycemia on stroke outcome in reperfused tissue plasminogen activator — treated patients. *Stroke* 2003, 34, 1235–1241.
52. Hunter A.J., Hatcher J., Virley D. i wsp.: Functional assessments in mice and rats after focal stroke. *Neuropharmacology* 2000, 39, 806–816.
53. Bederson J.B., Pitts L.H., Tsuji M., Nishimura M.C., Davis R.L., Bartkowski H.: Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 1986, 17, 472–476.
54. Gonzalez C.L., Kolb B.: A comparison of different models of stroke on behaviour and brain morphology. *Eur. J. Neurosci.* 2003, 18, 1950–1962.
55. Zhang L., Schallert T., Zhang Z. i wsp.: A test for detecting long-term sensorimotor dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia. *J. Neurosci. Methods* 2002, 117, 207–214.
56. Giffard C., Young A.R., Kerrouche N., Derlon I.M., Baron I.C.: Outcome of acutely ischemic brain tissue in prolonged middle cerebral artery occlusion: a serial positron emission tomography investigation in the baboon. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2004, 24, 495–508.
57. Sobesky J., Zaro-Weber O., Lehnhardt F.G. i wsp.: Does the mismatch match the penumbra? Magnetic resonance imaging and positron emission tomography in early ischemic stroke. *Stroke* 2005, 36, 980–985.
58. Zaro-Weber O., Moeller-Hartmann W., Heiss W.D., Sobesky J.: The performance of MRI-based cerebral blood flow measurements in acute and subacute stroke compared with 15O-water positron emission tomography: identification of penumbral flow. *Stroke* 2009, 40, 2413–2421.
59. Kogure K., Alonso O.F.: A pictorial representation of endogenous brain ATP by a bioluminescent method. *Brain Res.* 1978, 154, 273–284.
60. Paschen W.: Regional quantitative determination of lactate in brain sections. A bioluminescent approach. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1985, 5, 609–612.
61. Paschen W., Niebuhr I., Hossmann K.A.: A bioluminescence method for the demonstration of regional glucose distribution in brain slices. *J. Neurochem.* 1981, 36, 513–517.

62. Welsh F.A., Marcy V.R., Sims R.E.: NADH fluorescence and regional energy metabolites during focal ischemia and reperfusion of rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1991, 11, 459–465.
63. Hata R., Mies G., Wiessner C., Hossmann K.A.: Differential expression of c-fos and hsp72 mRNA in focal cerebral ischemia of mice. *Neuroreport* 1998, 9, 27–32.
64. Millan M., Arenillas J.: Gene expression in cerebral ischemia: a new approach for neuroprotection. *Cerebrovasc. Dis.* 2006, 21, 30–37.
65. Bederson J., Pitts L., Gernano S., Nishimura M., Davis R., Bartkowski H.: Evaluation of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 1986, 17, 1304–1308.
66. Engelhorn T., von Kummer R., Reith W., Forsting M., Doerfler A.: What is effective in malignant middle cerebral artery infarction: reperfusion, craniectomy, or both? An experimental study in rats. *Stroke* 2002, 33, 617–622.
67. Wang C.X., Yang Y., Yang T., Shuaib A.: A focal embolic model of cerebral ischemia in rats: introduction and evaluation. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 2001, 7, 115–120.
68. Gladstone D.J., Black S.E., Hakim A.M.: Toward wisdom from failure: lessons from neuroprotective stroke trials and new therapeutic directions. *Stroke* 2002, 33, 2123–2136.
69. Hall E.D., Traystman R.J.: Role of animal studies in the design of clinical trials. *Front. Neurol. Neurosci.* 2009, 25, 10–33.
70. Heiss W.D., Thiel A., Grond M., Graf R.: Which targets are relevant for therapy of acute ischemic stroke? *Stroke* 1999, 30, 1486–1489.
71. Kaste M.: Use of animal models has not contributed to development of acute stroke therapies: pro. *Stroke* 2005, 36, 2323–2324.
72. Stroke Therapy Academic Industry Roundtable. Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke* 1999, 30, 2752–2758.