

Od laboratorium do kliniki: eksperymentalne modele zwierzęce w badaniach nad udarem niedokrwiennym mózgu

STRESZCZENIE

Udar mózgu jest wyniszczającą chorobą o podłożu sercowo-naczyniowym o wysokiej śmiertelności, prowadzącą do znacznego obniżenia jakości oraz długości życia. Z uwagi na złożoność patofizjologicznych procesów zachodzących po udarze mózgu u ludzi, kluczowe znaczenie z punktu widzenia rozwoju metod leczenia pacjentów mają badania podstawowe z użyciem zwierzęcych modeli udaru mózgu, ze szczególnym uwzględnieniem modeli z zastosowaniem gryzoni. Modele takie jak przejściowa lub trwała okluzja tętnicy środkowej mózgu (MCAo) i modele fotouczuleniowe są najczęściej stosowane w symulacji udaru niedokrwiennego i zostały szczegółowo opisane w niniejszej pracy. Omówiono także najnowszą wiedzę na temat mechanizmów komórkowej odpowiedzi zapalnej i naprawczej, głównie ze strony komórek glejowych, ale również makrofagów napływających z krwiobiegu do mózgu po udarze. Zrozumienie zalet i wad różnych modeli zwierzęcych to podstawa do ich dalszego udoskonalania, pozwalającego na lepszą symulację powikłań poudarowych, jak również na opracowanie nowych schematów terapeutycznych niedokrwienia mózgu u ludzi.

UDAR NIEDOKRWIENNY MÓZGU

Udar mózgu jest jedną z najczęściej występujących chorób sercowo-naczyniowych, a także stanowi istotną przyczynę zgonów oraz powód długotrwałej niepełnosprawności osób dorosłych [1]. Szacuje się, że każdego roku udar dotyka około 70 tysięcy Polaków [2]. Definicja udaru mózgu zmieniała się wraz z postępem medycyny. Najbardziej rozpowszechniona, zaproponowana w 1978 roku przez Światową Organizację Zdrowia, opisuje udar jako „zespół objawów klinicznych charakteryzujących się nagłym wystąpieniem ogniskowych bądź globalnych zaburzeń czynności mózgu, które utrzymują się dłużej niż 24 godziny (o ile wcześniej nie nastąpi zgon) a ich przyczyną są wyłącznie naczyniowe” [3]. W 2013 roku eksperci z Amerykańskiego Towarzystwa Kardiologicznego (ang. *American Heart Association*, AHA) i Amerykańskiego Towarzystwa Udarowego (ang. *American Stroke Association*, ASA) opracowali nową definicję, według której udarem nazywamy wszelkie objawy wskazujące na uszkodzenie ośrodkowego układu nerwowego, w tym również epizody trwające krócej niż 24 godziny, które można potwierdzić za pomocą technik neuroobrazowania [4].

Udar, zwany również zdarzeniem mózgowo-naczyniowym, spowodowany jest niedokrwieniem tkanki nerwowej albo uszkodzeniem naczyń krwionośnych mózgu. W związku z tym, ze względu na mechanizm, wyróżnia się dwa rodzaje udarów: udar niedokrwienny i udar krwotoczny mózgu. Większość przypadków udaru stanowi udar niedokrwienny (inaczej zawał mózgu), do którego dochodzi w wyniku zamknięcia bądź zwężenia jednej z tętnic domózgowych lub mózgowych [1]. Najistotniejszymi czynnikami ryzyka zawału mózgu są m.in. nadciśnienie tętnicze, choroby serca, cukrzyca, otyłość, zaburzenia gospodarki lipidowej, zaburzenia krzepnięcia krwi oraz niezdrowy styl życia, taki jak nadużywanie alkoholu i innych używek, palenie papierosów. Na prawdopodobieństwo wystąpienia udaru niedokrwiennego mózgu wpływają także czynniki „niemodyfikowalne” jak wiek, płeć, rasa, predyspozycje genetyczne oraz wystąpienie w przeszłości przemijającego ataku niedokrwiennego [5]. Skutki niedokrwienia (ischemii) mózgu mogą być różne, a stopień uszkodzenia zależy od poziomu zależności danego obszaru od zamkniętego naczynia, czasu trwania niedokrwienia, wymagań metabolicznych tkanki oraz jej odporności na uszkodzenia. Do długofalowych skutków udaru należą zaburzenia funkcji motorycznych (np. niedowład kończyn), trudności z mówieniem (afazja) i pisanie, problemy z pamięcią oraz depresja [6].

Przywrócenie drożności zamkniętych naczyń jest obecnie jedynym zatwierdzonym sposobem leczenia ostrego udaru niedokrwiennego [7]. Najszerzej stosowane jest leczenie trombolityczne, polegające na dożylnym podaniu rekombi-

mgr Sylwia Piątek,
dr Ewelina Ziemińska,
mgr Palina Milewska,
dr hab. Anna R. Malik✉

Grupa Badawcza Neurobiologii Komórkowej,
Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

https://doi.org/10.18388/pb.2017_570

✉autor korespondujący: ar.malik@uw.edu.pl

Słowa kluczowe: astrocyty, mikroglej, makrofagi, MCAo, model fotouczuleniowy, regeneracja

Wykaz stosowanych skrótów: AMPA – kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy; DAMP (ang. *danger associated molecular patterns*) – struktury molekularne związane z uszkodzeniem; GABA (ang. *gamma-aminobutyric acid*) – kwas γ -aminomasłowy; MCAo (ang. *middle cerebral artery occlusion*) – zamknięcie tętnicy środkowej mózgu; NMDA – N-metylo-D-asparagian; OGD (ang. *oxygen-glucose deprivation*) – model deprywacji tlenu i glukozy

Podziękowania: Badania prowadzone przez autorów niniejszej pracy przeglądowej są finansowane ze środków przyznanych przez Narodowe Centrum Nauki (Opus nr 2020/37/B/NZ3/00761) oraz w ramach Działania I.3.4. Programu IDUB. Rycina 2 oraz streszczenie graficzne zostały wykonane z wykorzystaniem programu BioRender. Autorzy dziękują mgr Eli Scholz za korektę tekstu.

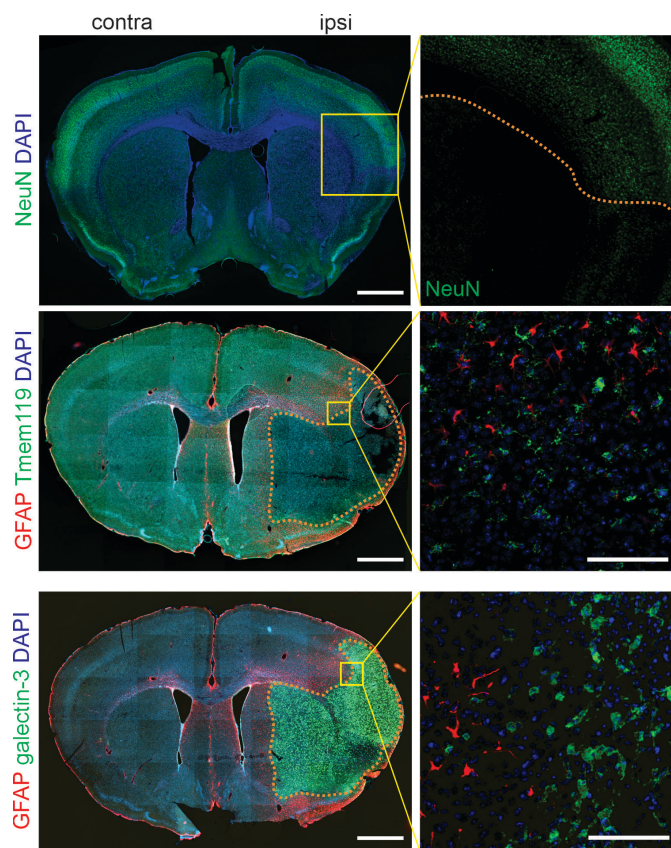
nowanego tkankowego aktywatora plazminogenu – rt-PA (ang. *recombinant tissue plasminogen activator*), inaczej zwanego alteplazą. Kluczowe jest jak najszybsze włączenie takiego leczenia po wystąpieniu udaru [8]. W 2024 roku do leczenia udaru niedokrwiennego w Unii Europejskiej została dopuszczona tenekteplaza (pod nazwą Metalyse; <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/metalyse>), która w porównaniu do alteplazy cechuje się lepszą specyficnością i parametrami farmakokinetycznymi, a także łatwiejszym podaniem (szybki zastrzyk, tzw. bolus, zamiast wlewu dożylnego trwającego ok. 90 minut [9]). Alternatywą drogą przywrócenia krążenia jest trombektomia mechaniczna, opierająca się na mechanicznym usunięciu skrzepu blokującego światło naczynia. Znajduje ona zastosowanie w szczególności u pacjentów, którzy nie mogą zostać zakwalifikowani do terapii trombolitycznej [10].

Obecnie nie są dostępne inne możliwości leczenia pacjentów po udarze, chociaż intensywne prace prowadzone na modelach zwierzęcych i komórkowych wskazują na kilka możliwych strategii terapeutycznych. Badania przedkliniczne pozwoliły lepiej zrozumieć złożoność procesów zachodzących w mózgu po udarze niedokrwiennym. Ujawniono istnienie obszarów o łagodnej oligemii (redukcji przepływu krwi), w których perfuzja tkanki nerwowej jest zmniejszona, ale strukturalna i funkcjonalna integralność mózgu pozostaje zachowana. Dzięki badaniom przedklinicznym wykazano także obecność penumbry niedokrwiennej, czyli tkanki, która traci funkcje, ale nie ulega jeszcze trwałemu zniszczeniu. Jest to obszar, którego uszkodzeniu można zapobiec, jeśli leczenie zostanie zastosowane we właściwym czasie. Ponadto wieloletnie badania z użyciem modeli doświadczalnych udaru pozwoliły na poznanie procesów komórkowych zachodzących w mózgu po udarze niedokrwiennym i na zaproponowanie nowych strategii terapeutycznych, które być może wejdą w przyszłości do praktyki klinicznej.

PROCESY KOMÓRKOWE ZACHODZĄCE W NASTĘPSTWIE UDARU NIEDOKRWIENNEGO

Wskutek udaru niedokrwiennego zatrzymany zostaje dopływ tlenu i substancji odżywczych, co prowadzi do uszkodzenia tkanek i obumierania neuronów, a także do aktywacji komórek glejowych i napływu komórek odpornościowych do mózgu. Procesy te najczęściej badane są z wykorzystaniem modelu MCAo (ang. *middle cerebral artery occlusion* – zamknięcie tętnicy środkowej mózgu) i modelu fotocuzuleniowego, które zostaną omówione w dalszej części tekstu.

Skutki udaru niedokrwiennego w dużej mierze zależą od stopnia śmierci neuronów. Ograniczony przepływ krwi uruchamia szereg szkodliwych procesów biochemicznych, które zakłócają kluczowe funkcje tych komórek i prowadzą do ich utraty (Ryc. 1, górny panel) zarówno w ostrej, jak i w odroczonej fazie udaru [11]. Lokalizacja neuronów względem źródła niedokrwienia (rdzeń niedokrwienny, penumbra czy też obszar odległy od rdzenia) ma wpływ na charakterystykę i dynamikę zmian wywołanych niedokrwieniem [12]. Podobnie jak w przypadku innych typów komórek, śmierć neuronów może zachodzić według dwóch głównych ścieżek: nieregulowanej, która nie podlega kontroli przez



Rycina 1. Neurony, astrocyty, mikroglej i makrofagi w modelu udaru 3 dni po niedokrwieniu. Reprezentatywne obrazy znakowań immunohistochemicznych skrawków mózgu pozyskanych z doświadczenia w modelu MCAo (por. Ryc. 2). Wyznakowano markery neuronów (NeuN, górny panel), aktywowanych astrocytów (GFAP, czerwony), mikrogleju (Tmem119, zielony, środkowy panel) oraz makrofagów (galektyna-3, zielony, dolny panel). Contra – półkula nieuszkodzona; ipsi – półkula uszkodzona udarem. Przerywana pomarańczowa linia wskazuje granicę uszkodzonego obszaru. Lewe panele: obrazy skrawków koronalnych mózgu mysiego; skala – 1 mm; żółty kwadrat wskazuje obszar zobrazowany po prawej. Prawe panele: skala – 100 μ m. Tkanki pozyskano we współpracy z prof. Christophem Harmsem z Charite w Berlinie.

zdefiniowane mechanizmy molekularne, jak nekroza [13] oraz regulowanej, która obejmuje precyzyjnie regulowane kaskady sygnalizacyjne, takie jak apoptoza [14]. Najnowsze badania, podsumowane w pracy Mao i wsp. [15] wskazują, że regulowana śmierć neuronów po niedokrwieniu może następować nie tylko na drodze apoptozy, ale także wskutek uruchomienia innych mechanizmów, takich jak nekroptoza, ferroptoza, czy pyroptoza.

Szczególna wrażliwość neuronów na uszkodzenia spowodowane niedokrwieniem wynika z głębokich zaburzeń szeregu procesów biochemicznych w warunkach niedoboru tlenu i glukozy. Skutkują one zakłóceniem homeostazy wodno-elektrolitowej i jonowej (depolaryzacja błon komórkowych), dysfunkcją mitochondriów (zaburzenia równowagi redoks, stres energetyczny) oraz ekscytotoksycznością. Pojęcie ekscytotoksyczności odnosi się do nadmiernej aktywacji receptorów dla glutaminianu, w szczególności receptorów N-metylo-D-asparaginianu (NMDA). Z powodu masowego uwalniania glutaminianu z uszkodzonych neuronów dochodzi do ich nadmiernej aktywacji i przeciążenia jonami wapnia oraz produkcji reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS). Uważa się, że terapia

reperfuzyjna przywracająca przepływ krwi może powodować „uraz reperfuzyjny”, nasilając stres oksydacyjny i stan zapalny, co prowadzi do dalszych uszkodzeń neuronów [16]. Wrażliwość neuronów na niedokrwienie jest zróżnicowana i zależy od wielu czynników, takich jak zapotrzebowania metaboliczne, obecność receptorów dla glutamianu, lokalizacja oraz drażliwość na stres mitochondrialny [12,17]. Neurony piramidowe w hipokampie (szczególnie w obszarze CA1) i korze mózgowej, ze względu na swój duży rozmiar i rozległe dendryty z licznymi synapsami, mają wysokie zapotrzebowanie na energię. Czyni je to w dużym stopniu zależnymi od ciągłego dopływu krwi oraz od prawidłowej funkcji mitochondriów jako podstawowego źródła energii. Dysfunkcja mitochondriów podczas niedokrwienia, w tym stres oksydacyjny spowodowany nagromadzeniem ROS, prowadzi do szybkiej śmierci tych neuronów. W rezultacie neurony piramidowe są bardziej podatne na uszkodzenia niedokrwienne niż interneurony, które, będąc mniejsze i mniej aktywne metabolicznie, są bardziej odporne na wczesne uszkodzenia, pozostając jednak drażliwymi na długotrwałe niedokrwienie i ekscytotoksyczność. Ponadto neurony z obszarów o obniżonej rezerwie krążeniowej (takich jak hipokamp), mają bardziej ograniczone możliwości kompensacji niedokrwienia przez alternatywne dopływy krwi, w przeciwieństwie do innych regionów podkorowych, które często są lepiej unaczynione. Wrażliwość na niedokrwienie zależy również od wykorzystywanego systemu neuroprzekazników – neurony GABA-ergiczne wykazują mniejszą podatność na ekscytotoksyczność niż neurony glutaminergiczne. Wynika to z faktu, że nadmiar glutamianu, uwalnianego podczas niedokrwienia, silnie aktywuje receptory NMDA i AMPA, co prowadzi do szybszej śmierci neuronów glutaminergicznych posiadających te receptory.

Uszkodzenie tkanki, rozszczelnienie bariery krew-mózg i obumieranie neuronów prowadzą do aktywacji komórek glejowych: astrocytów i mikrogleju, a także do napływu komórek odpornościowych, przede wszystkim makrofagów, z krwiobiegu do mózgu. Aktywacja komórek glejowych i makrofagów przyczynia się do regeneracji po udarze, może jednak równocześnie mieć negatywny wpływ, prowadząc do nadmiernego stanu zapalnego i dodatkowego uszkodzenia tkanek.

Astrocyty stanowią najliczniejszą grupę komórek w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) i odgrywają istotną rolę w zachowaniu prawidłowości wielu procesów fizjologicznych. Aktywacja astrocytów przez cząsteczki DAMP (ang. *danger associated molecular patterns*) i cytokiny prowadzi do zmian w ekspresji genów i morfologii tych komórek [18]. Innymi czynnikami wydzielanymi podczas udaru, które indukują proliferację, wzrost i różnicowanie oraz aktywują astrocyty, są m.in. naskórkowy czynnik wzrostu (ang. *epidermal growth factor*, EGF) [19], transformujący czynnik wzrostu beta (ang. *transforming growth factor beta*, TGFβ) [20] oraz endotelina-1 [21]. Najbardziej charakterystyczną zmianą zachodzącą w aktywowanych astrocytach jest podwyższona ekspresja GFAP (ang. *glial fibrillary acidic protein*). Dlatego też białko to stało się najszerzej stosowanym markerem aktywowanych astrocytów (por. Ryc. 1).

Następstwem aktywacji astrocytów jest tworzenie się tak zwanej „blizny glejowej” (ang. *glial scar*, por. Ryc. 1) – swoistej bariery oddzielającej uszkodzony niedokrwieniem region od zdrowej tkanki. Należy zwrócić uwagę, że termin „blizna” nie jest w tym wypadku stosowany w swoim oryginalnym znaczeniu („zmiana zbudowana z tkanki łącznej włóknistej”), jednak próby jego zastąpienia bardziej adekwatnym terminem, np. bariera glejowa, nie znajdują dotychczas szerokiego oddźwięku w literaturze. Dowiedziono, że wchodzące w skład „blizny glejowej” astrocyty zapobiegają niekontrolowanemu uszkodzeniu zdrowej tkanki. Z drugiej strony, astrocyty i tworzona przez nie bariera mogą również przyczyniać się do zahamowania wzrostu aksonów za sprawą podwyższonego poziomu proteoglikanów z klasy CSPG i KSPG, a także m.in. semaforyny 3, efryny B2 oraz białek z rodziny Slit [22].

Mikroglej i makrofagi to kluczowe komórki układu odpornościowego, które pełnią istotne funkcje w monitorowaniu środowiska, odpowiedzi immunologicznej oraz naprawie tkanek. Mają one zdolność prowadzenia fagocytozy oraz wydzielania cytokin. Oba typy komórek biorą udział w odpowiedzi na udar niedokrwienno, ale ich pochodzenie, a także rozmieszczenie w uszkodzonym mózgu (Ryc. 1) oraz dynamika aktywacji są odmienne. Mikroglej, wywodzący się z prekursorów mieloidalnych w woreczku żółtkowym, przenika do OUN we wczesnych etapach rozwoju embrionalnego. W stanie spoczynku mikroglej posiada rozgałęzioną morfologię, co pozwala mu na monitorowanie miąższu mózgu i reagowanie na zmiany w mikrośrodowisku. Po uszkodzeniu mózgu mikroglej zmienia morfologię na „ameboidalną”, co umożliwia efektywną reakcję na uszkodzenia i naprawę tkanki nerwowej. Z kolei makrofagi różnicują się z monocytów powstających w szpiku kostnym z hematopoetycznych komórek macierzystych. Są one odnawiane przez całe życie. Podczas gdy występowanie mikrogleju jest ograniczone do OUN, monocyty i powstałe z nich makrofagi mogą infiltrować różne tkanki, w tym mózg po uszkodzeniu (Ryc. 1) [23].

W pewnym uproszczeniu, mikroglej i makrofagi po aktywacji można podzielić na dwa fenotypy: M1 i M2. Chemoatraktanty, takie jak ATP, CCL21, CXCL10 oraz DAMP, w tym białko HMGB1 (ang. *high mobility group box 1*), indukują aktywację tych komórek do fenotypu M1, co jest znane jako „klasyczna aktywacja”. Taki rodzaj aktywacji prowadzi do wydzielania cytokin prozapalnych, m.in. IL-1β, IL-6 i TNF-α, oraz indukcji ekspresji syntazy tlenku azotu (iNOS) i produkcji reaktywnych form tlenu. Mikroglej i makrofagi o fenotypie M1 promują więc stan zapalny i mogą hamować regenerację tkanek. Z kolei fenotyp M2, czyli „alternatywnie aktywowany”, posiada właściwości protekcyjne, uwalnia cytokiny przeciwzapalne (takie jak IL-10) i wykazuje aktywność fagocytarną. Takie aktywności mogą wspomagać naprawę tkanek, neurogenezę, angiogenezę i regenerację aksonów [24]. W kontekście udaru niedokrwienno, mikroglej i makrofagi M1 przyczyniają więc się do uszkodzeń mózgu, natomiast M2 wspomagają regenerację. W rzeczywistości mikroglej i makrofagi w uszkodzonym mózgu mogą wykazywać pełne spektrum własności pomiędzy stanami polaryzacji M1 i M2.

Zmiany morfologiczne i fenotypowe mikrogleju w mózgu stanowią początek zdarzeń w odpowiedzi na udar, którym towarzyszy późniejsza infiltracja makrofagów. Już w ciągu pierwszych trzydziestu minut po wystąpieniu udaru, mikroglej w miejscu uszkodzenia jest aktywowany, przybiera ameboidalną morfologię i wykazuje aktywność fagocytarną. Mikroglej proliferuje przez pierwsze dwa tygodnie po udarze, a najsilniejsza zdolność fagocytarna jest obserwowana w ciągu pierwszych dwóch dni. [25]. Dodatkowo mikroglej zostaje aktywowany w obszarze penumbry, co może mieć znaczenie dla utrzymania szczelności bariery krew-mózg w tym rejonie [26]. Z drugiej strony, inne badania wykazały, że w momencie rozpoczęcia reperfuzji, mikroglej aktywuje się w strefie penumbry i pochłania komórki śródbłonka poprzez fagocytozę, powodując uszkodzenie bariery krew-mózg, co dodatkowo zwiększa infiltrację komórek odpornościowych do miąższu mózgu [27].

Makrofagi migrują do obszaru udaru z opóźnieniem 24-48 godzin [25]. W obszarze udaru przyjmują one fenotyp fagocytarny, podczas gdy w strefie penumbry – fenotyp podobny do homeostatycznego mikrogleju [28]. W modelu MCAo, aktywowany mikroglej koncentruje się głównie wokół udaru, a mniej komórek jest obecnych wewnątrz rdzenia niedokrwiennego. Z kolei makrofagi mogą przejść na metabolizm beztlenowy i pozostać żywotne w strefie objętej niedotlenieniem (Ryc. 1).

Podsumowując, astrocyty, mikroglej i makrofagi odgrywają kluczowe role w odpowiedzi na udar niedokrwienny mózgu. Mają one wpływ na procesy regeneracji i patologii po udarze, wpływając na ostateczny wynik kliniczny. Mogą wywierać zarówno korzystne, jak i szkodliwe efekty na wszystkich etapach udaru, zależnie od ich dynamicznej zmiany między stanami prozapalnym a przeciwzapalnym [23,29]. Zrozumienie mechanizmów komórkowych leżących u podstaw odpowiedzi na udar niedokrwienny jest więc kluczowe dla zaproponowania nowych strategii mogących ograniczać uszkodzenia i poprawiać regenerację po udarze.

MODELE *IN VITRO* W BADANIACH NAD UDAREM NIEDOKRWIENNYM

Ze względu na złożoność procesów zachodzących w mózgu po udarze, a w szczególności na występowanie ściślejszej interakcji pomiędzy różnymi typami komórek mózgu jak również komórek układu odpornościowego, nie jest możliwe ich pełne odwzorowanie z użyciem istniejących modeli komórkowych. Jak dotąd nie stworzono modelu *in vitro*, który w pełni odzwierciedlałby wzajemny wpływ aktywacji poszczególnych rodzajów komórek oraz napływ makrofagów i innych komórek odpornościowych, choć podejmowane są takie próby. Modele *in vitro* pozwalają jednak na badania mechanistyczne nad reakcjami komórek na niedotlenienie i inne szkodliwe czynniki. Do szeroko stosowanych metod modelowania udaru niedokrwiennego w warunkach *in vitro* należy model deprywacji tlenu i glukozy (ang. *oxygen-glucose deprivation*, OGD), któremu mogą być poddawane zarówno różnego rodzaju hodowle komórkowe, jak i skrawki mózgu [30,31].

Szczególne zainteresowanie budzą badania wykorzystujące organoidy – trójwymiarowe hodowle komórek, przypominające swoją strukturą organy. Modele organoidów mózgowych mogą znaleźć zastosowanie np. w badaniach nad opracowywaniem leków ograniczających śmierć neuronów [32]. Przykładowo, Wang i współpracownicy stworzyli z ludzkich komórek pluripotentnych trójwymiarowe organoidy mózgu, które posłużyły do modelowania udaru i testowania leków neuroprotektoryjnych, to jest ograniczających śmierć neuronów, takich jak butyloftalid i edarawon [32]. Należy jednak podkreślić, że w obecnym kształcie organoidy odzwierciedlają tylko wybrane aspekty odpowiedzi komórek na udar niedokrwienny. Brak unaczynienia i bariery krew-mózg oraz komórek odpornościowych (w tym mikrogleju) w organoidach, a także ich duża zmienność, nadal ogranicza ich zastosowanie w badaniach nad udarem niedokrwiennym [33].

MODELE ZWIERZĘCE UDARU NIEDOKRWIENNEGO

Modele zwierzęce udaru niedokrwiennego umożliwiają nie tylko badania podstawowe nad procesami zachodzącymi po niedokrwieniu mózgu, ale także testowanie potencjalnych terapii na etapach przedklinicznych. Wybór odpowiedniego modelu jest kluczowy dla właściwego zaplanowania badań. Należy brać pod uwagę takie czynniki jak wielkość zawału, zdolność do reperfuzji, deficyty behawioralne, reakcje zapalne oraz śmiertelność. Modele ogniskowego niedokrwienia mózgu, zwłaszcza trwałe, są najbliższe klinicznemu obrazowi udaru, jednak wiążą się z różnym stopniem inwazyjności chirurgicznej i farmakologicznej, która nie zawsze ma odpowiednik w warunkach klinicznych. Model okluzji tętnicy środkowej mózgu (MCAo) pozostaje złotym standardem w badaniach nad zatorowością i rekanalizacją naczyń mózgowych [34].

Dobór zwierząt doświadczalnych zależy od wymagań eksperymentu i powinien jak najwierniej oddawać specyfikę schorzenia występującego u człowieka. Większość badań nad udarem mózgu wykonywana jest z wykorzystaniem gryzoni - głównie myszy i szczurów. Istotnym powodem jest wysokie podobieństwo genomów: ludzkiego, mysiego i szczurzego [35, 36] oraz liczne podobieństwa anatomiczne i fizjologiczne, jak m.in. w przypadku mózgu [37]. Dodatkowymi zaletami gryzoni jako zwierząt laboratoryjnych są ich małe rozmiary, wysoki współczynnik reprodukcyjny oraz dobrze scharakteryzowane wymagania związane z utrzymaniem ich zdrowia oraz codzienną opieką. Ponadto procedury z wykorzystaniem gryzoni nie są skomplikowane i gwarantują wysoką powtarzalność, co stanowi kolejny atut pracy z tą grupą zwierząt. Manipulacje w genomie mysim, a zatem tworzenie zwierząt transgenicznych, stanowią niezwykle cenne narzędzie w modelowaniu różnych chorób.

Modele doświadczalne udaru niedokrwiennego można najprościej podzielić na oddające charakter całkowitego (globalnego) lub częściowego (ogniskowego) niedokrwienia.

MODELE CAŁKOWITEGO NIEDOKRWIENIA MÓZGU

Jak wskazuje nazwa, globalne niedokrwienie mózgu oznacza sytuację, w której przepływ krwi w mózgu zostaje całkowicie zatrzymany, czego nieuniknionym następstwem jest obumieranie neuronów we wszystkich obszarach mózgu. Ludzkim odpowiednikiem takiej sytuacji jest zatrzymanie krążenia (np. w wyniku zatrzymania akcji serca), wstrząs (ciężka niewydolność serca lub poważny krwotok), ciężkie uszkodzenia naczyń krwionośnych. Modele te nie są powszechnie stosowane w badaniach przedklinicznych, jednak w przeszłości pozwoliły odkryć podstawowe mechanizmy zachodzące w mózgu przy niedokrwieniu. Jednym z pierwszych opisanych sposobów wstrzymania cyrkulacji krwi w obszarze całego mózgowia była dekapitacja, czyli całkowite oddzielenie głowy od reszty ciała. Metoda ta początkowo służyła lepszemu zrozumieniu metabolizmu i procesów komórkowych zachodzących w mózgu wskutek całkowitego zatrzymania krążenia, obecnie zaś znajduje zastosowanie głównie w badaniach nad farmaceutykami o charakterze neuroprotekcynnym. Całkowite niedokrwienie mózgu może być też wywołane zatrzymaniem akcji serca np. przy migotaniu komór – zaburzeniu rytmu serca, w wyniku którego krew nie jest prawidłowo pompowana do naczyń krwionośnych. Przykładem zwierzęcego modelu całkowitego niedokrwienia mózgu wywołanego migotaniem komór jest mysz model zatrzymania akcji serca z resuscytacją krążeniowo-oddechową, w którym dożylnie podanie zimnego roztworu KCl stanowi czynnik wywołujący stan patologiczny. Inne modele globalnego niedokrwienia

to zamknięcie czterech tętnic: szyjnych wewnętrznych oraz tętnic kręgowych u szczurów. Model ten znany jest szerzej jako model 4-VO (ang. *four-vessel occlusion*). Zbliżony model, znany pod nazwą 2-VO (ang. *two-vessel occlusion*) polega na czasowym, obustronnym zamknięciu tętnic szyjnych wspólnych z jednoczesnym obniżeniem ciśnienia tętniczego krwi w wyniku utraty krwi. Bardziej szczegółowe informacje na temat modeli globalnego niedokrwienia znajdują się w innych pracach przeglądowych [38,39].

MODELE OGNISKOWEGO NIEDOKRWIENIA MÓZGU

Zwierzęce modele częściowej ischemii stanowią świetne narzędzie m.in. do badań nad śmiercią komórkową wywołaną niedokrwieniem oraz w celu lepszego zrozumienia mechanizmów naprawczych zachodzących w mózgu w następstwie udaru. Tabela 1 podsumowuje wybrane modele zwierzęce ogniskowego niedokrwienia mózgu. Najczęściej stosowane z nich zostaną omówione w niniejszej sekcji. Większość modeli z tej grupy opiera się na wywołaniu niedokrwienia poprzez zamknięcie tętnicy środkowej mózgu (MCAo), będącej odgałęzieniem tętnicy szyjnej wewnętrznej. Modele te pozwalają na trwałe lub czasowe zamknięcie tętnicy oraz wykorzystują różne techniki operacyjne.

Jednym z najpowszechniejszych modeli MCAo jest zablokowanie tętnicy środkowej mózgu w miejscu rozgałęzienia tętnicy szyjnej wewnętrznej, do którego wykorzystuje się filament nici chirurgicznej. Przywrócenie przepływu krwi następuje w wyniku udroźnienia tętnicy poprzez usu-

Tabela 1. Modele ogniskowego niedokrwienia mózgu u gryzoni i ich odpowiedniki u ludzi, wg. [44].

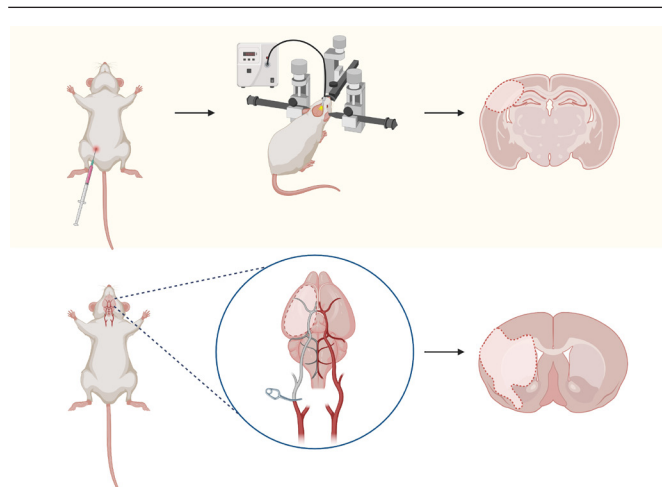
| Model zwierzęcy | Ludzki odpowiednik |
|--|---|
| Trwała okluzja tętnicy środkowej mózgu (ang. <i>permanent MCAo</i>), trwałe zamknięcie lub elektrokoagulacja | Ostry udar w obszarze unaczynienia tętnicy środkowej mózgu (MCA, ang. <i>middle cerebral artery</i>), bez reperfuzji (nieodwracalny udar niedokrwienny) |
| Okluzja tętnicy środkowej mózgu z reperfuzją (ang. <i>temporary MCAo</i>) | Udar w obszarze unaczynienia tętnicy środkowej mózgu (MCA) z trombektomią |
| Wstrzyknięcie skrzepliny wykonanej z krwi autologicznej z podaniem rt-PA (ang. <i>recombinant tissue plasminogen activator</i>) | Udar sercowo-zatorowy blokujący krążenie w przedniej części mózgowia leczony rt-PA, przekształcony w krwotoczny |
| Jednoczesne zamknięcie tętnicy szyjnej wspólnej (CCA) i bezpośrednie zamknięcie tętnicy środkowej mózgu (MCA) | Udar niedokrwienny dużych naczyń, blokujący krążenie w przedniej części mózgowia z kraniektomią odbarczającą lub bez niej |
| Iniekcja endoteliny-1 (ET-1) | Ogniskowe udary kory mózgowej, podkorowe, udary w głębokim obszarze mózgowia lub w pniu mózgu związane z małymi naczyniami, przejściowe |
| Model fotouczuleniowy (fototromboza) | Ogniskowe udary kory mózgowej, podkorowe, udary w głębokim obszarze mózgowia lub w pniu mózgu związane z małymi naczyniami, trwałe |
| Nakładanie papieru nasączonego chlorkiem żelaza FeCl ₃ na oponę twardą leżącą nad MCA | Trwała okluzja tętnicy środkowej mózgu z zakrzepem |
| Wstrzyknięcie makrosfer dwutlenku tytanu TiO ₂ | Udar zakrzepowo-zatorowy lub miażdżycowo-zatorowy |
| Szczur z nadciśnieniem samoistnym podatny na udar mózgu | Zawał w głębokim obszarze mózgowia (najczęstszy), inne udary niedokrwienne i krwotoczne związane z nadciśnieniem tętniczym |
| Stereotaktyczne wstrzyknięcie L-argininy i prekursorów tlenku azotu (L-NIO) do podkorowej istoty białej | Okluzja małych naczyń podkorowych |
| Wstrzyknięcie autologicznej skrzepliny do układu tętnic kręgowych | Udar sercowo-zatorowy blokujący krążenie w tylnej części mózgowia; może powodować jednostronne lub obustronne deficyty i jest prawdopodobne, że wywoła zaburzenia świadomości |
| Stereotaktyczne zastosowanie impulsu elektrycznego | Ogniskowe udary w moście i pniu mózgu |

nięcie filamentu [40]. Metoda ta obejmuje przeprowadzenie operacji w obrębie szyi, bez konieczności otwarcia czaszki, które niesłoby ryzyko uszkodzenia mózgu lub wystąpienia krwotoku podpajęczynówkowego. Modyfikacji metody zaproponowanej przez Koizumi i współpracowników dokonał Enrique Zea Longa w 1989 roku [41]. Zgodnie z jego metodą, filament wprowadzony jest poprzez tętnicę szyjną zewnętrzną do tętnicy środkowej mózgu, bez konieczności zakładania permanentnego szwu na tętnicy szyjnej wspólnej, tak jak w przypadku metody Koizumi. Śmiertelność zwierząt w modelu MCAo zależy przede wszystkim od czasu okluzji (zwykle 30, 45 lub 60 min), ale również od czynników takich jak użyty filament, wiek, płeć czy waga zwierząt. Śmiertelność może się więc wahać pomiędzy 10 a 74% w pierwszych dwóch dobach od operacji [42]. Metoda opracowana przez Longa i współpracowników zapewnia niższą śmiertelność i mniejszy obrzęk w obrębie mózgu [43].

Modelem trwałego zablokowania tętnicy środkowej mózgu jest model obejmujący okluzję dystalnych gałęzi MCA – dMCAo (ang. *distal middle cerebral artery occlusion*) zaproponowany przez Tamura i współpracowników [45]. Zabieg ten przeprowadza się poprzez wykonanie kraniektomii, czyli operacyjnego otwarcia czaszki oraz przecięcie opony twardej, a tętnicę środkową zamyka się drogą elektrokoagulacji. Dzięki precyzyjnie określönemu miejscu zamknięcia naczynia, modele MCAo oraz dMCAo gwarantują wysoką powtarzalność wyników w odniesieniu do lokalizacji uzyskanego obszaru niedokrwienia. Zabiegi te wymagają jednak odpowiedniego przygotowania technicznego ze strony eksperymentatora oraz odpowiedniej znajomości anatomii.

Kolejną metodą wywołania udaru niedokrwienego poprzez zaburzenie przepływu krwi przez MCA jest podanie do mózgu endoteliny-1 – peptydu o działaniu zwężającym naczynia. Model ten, po raz pierwszy opisany na szczurach, stanowi alternatywę dla chirurgicznego zamykania tętnicy środkowej mózgu i wywołuje zbliżone uszkodzenia jak wcześniej wspomniana metoda. Mechanizm działania endoteliny polega na wywoływaniu skurczu naczyń (wazokonstrykcji), a bezpośrednie podanie domózgowe powoduje miejscowe ograniczenie przepływu krwi prowadzące do niedokrwienia [46].

Odrębną grupę modeli stanowią te, w których wywołanie udaru niedokrwienego zachodzi poprzez fototrombozę (ang. *photothrombotic stroke models*) [47]. Metoda ta wykorzystuje właściwości fotocuczulające niektórych barwników, do których należy m.in. róż bengalski. Technika ta polega na podaniu roztworu barwnika, a następnie ekspozycji czaszki na wiązkę światła. Model ten, zastosowany po raz pierwszy na szczurach przez Watsona i współpracowników w 1985 roku, cechuje się małoinwazyjnym zabiegiem chirurgicznym - wywołanie udaru nie wymaga kraniektomii, ponieważ obszar niedokrwienia tworzy się w miejscu naświetlanym przez lampę przez określony czas (w oryginalnej publikacji było to 20-minutowe napromieniowanie odsłoniętej czaszki lampą emitującą wiązkę światła o długości 560 nm) [48]. Rozmiar strefy niedokrwienia uzależniony jest od przekroju wiązki światła i jej intensywności, czasu ekspozycji oraz dawki fotocuczulającego barwnika, a stosowanie ściśle określonych parametrów pozwala na uzy-



Rycina 2. Fotocuczuleniowy model udaru a MCAo – porównanie modeli. W modelu fotocuczuleniowym (górny panel) udar wywołany jest przez naświetlenie czaszki po podaniu związku fotocuczulającego. Strefa uszkodzona (jaśniejszy obszar tkanki na schemacie skrawka mózgu) jest relatywnie mała i zlokalizowana przy powierzchni mózgu. W modelu MCAo (dolny panel) udar wywołany jest przez zablokowanie tętnicy środkowej mózgu. Uszkodzenie obejmuje znacznie większy obszar niż w przypadku modelu fotocuczuleniowego.

skanie porównywalnych wyników [49]. W ostatnich latach model ten został udoskonalony w celu ukierunkowania na określone obszary kory mózgowej, co posłużyło do badania skutków udaru specyficznych dla regionu. Właściwość ta okazała się przydatna w badaniach m.in. nad odzyskaniem funkcji motorycznych (poprzez przeprowadzenie badań behawioralnych) oraz reorganizacją kory mózgu po udarze [50,51].

Oprócz niewątpliwych zalet opisanego modelu, takich jak nieinwazyjna procedura i niższa niż w modelu MCAo śmiertelność zwierząt (<10% w pierwszej dobie po zabiegu [47]), należy wspomnieć też o jego wadach. Model ten nie odzwierciedla w pełni lokalizacji udaru w warunkach klinicznych, a otaczająca strefę niedokrwienia penumbra jest niewielka, w przeciwieństwie do sytuacji występującej u pacjentów. Ponadto należy mieć na uwadze różnice w dynamice odpowiedzi komórkowych pomiędzy modelem fototrombotycznym a MCAo [52].

Wprowadzanie nowych modeli udaru niedokrwienego oraz udoskonalanie modeli istniejących związane jest z chęcią jak najwierniejszego oddania zmian zachodzących w mózgu człowieka (Tab. 1). Poznane dotychczas metody pozwalają na dobór odpowiedniego modelu schorzenia pod kątem prowadzonych badań. Należy mieć przy tym na uwadze jak odmienne wyniki można uzyskać w zależności od metody (Tab. 1 i Ryc. 2).

REGULACJE PRAWNE I ETYCZNE PROWADZENIA DOŚWIADCZEŃ NA ZWIERZĘTACH

Wykorzystywanie zwierząt w celach naukowych jest tematem wzbudzającym kontrowersje i stanowiącym pole do dyskusji. Rozwój nauki, a w szczególności dziedzin biomedycznych nie byłby jednak możliwy bez wspierania badań *in vitro* badaniami z zastosowaniem modeli zwierzęcych. Wszelkie procedury doświadczalne z udziałem zwierząt są ściśle regulowane prawnie, a eksperymenty przeprowadza-

ne są z dbałością o jak największe ograniczenie ich cierpienia. Prawidłowa opieka nad zwierzętami powinna zaspokajać potrzeby fizjologiczne, behawioralne i społeczne oraz przyczynić się do ograniczenia rozprzestrzeniania chorób (<http://badanianazwierzetach.pl/3r-i-metody-alternatywne/>).

Komfort zapewniony jest przez stałe obserwacje zwierząt – ich zachowania i wyglądu zewnętrznego, a ponadto kontrolę stanu klatek, w których bytują. Niezwykle istotna w kontekście monitorowania stanu zwierząt jest opublikowana w 2010 roku praca autorstwa Langforda i współpracowników, stanowiąca uniwersalne źródło dotyczące oceny bólu zwierząt na podstawie ich mimiki [53]. W celu przygotowania do procedur doświadczalnych, zwierzęta poddawane są premedykacji, a wszelkie zabiegi chirurgiczne wykonywane są ze znieczuleniem. Stan zwierząt po operacjach jest stale monitorowany. W przypadku konieczności przerwania procedury doświadczalnej ze względów moralnych lub naukowych stosuje się tzw. humanitarne punkty końcowe [54].

W świetle prawa europejskiego najważniejszy akt prawny regulujący kwestie związane ze zwierzętami laboratoryjnymi to „Dyrektywa w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do eksperymentów i innych naukowych celów”, która 22 września 2010 roku została przyjęta przez Parlament Europejski (Dyrektywa 2010/63/EU). Dyrektywa nakazuje zapewnienie zwierzętom odpowiedniej opieki w trosce o ich dobrostan, planowanie eksperymentów z wykorzystaniem jak najmniejszej liczby zwierząt oraz przeprowadzanie procedur przynoszących najmniej cierpienia. Zwraca też uwagę na to, aby wykorzystywać zwierzęta do celów badawczych jedynie w sytuacjach, gdy nie ma alternatywnej możliwości.

Przedstawione w Dyrektywie założenia opracowano w myśl zasady 3R – z języka angielskiego: „Replacement, Reduction, Refinement”, zaproponowanej po raz pierwszy w 1959 roku i skupiającej się na zasadach humanitarnego prowadzenia badań *in vivo*. Zasadę 3R opracowali William Russell i Rex Burch i opisali w książce „The Principles of Humane Experimental Technique” [55]. Na język polski zasadę 3R można przetłumaczyć jako zastąpienie, ograniczenie i udoskonalenie. W myśl tej idei, podczas planowania eksperymentów należy zwrócić uwagę na: możliwość korzystania z metod alternatywnych, niewymagających zastosowania zwierząt; ograniczenie liczby zwierząt biorących udział w doświadczeniu; stosowanie metod niosących najmniej cierpienia i przyczyniających się do zapewnienia zwierzętom dobrostanu.

Personel odpowiedzialny za opiekę nad zwierzętami laboratoryjnymi oraz za planowanie i wykonywanie procedur powinien mieć odpowiednie kwalifikacje. W Polsce za prowadzenie kursów i szkoleń odpowiada Polskie Towarzystwo Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych (POLLASA). Kursy obejmują przygotowanie teoretyczne oraz praktyczne i kończą się uzyskaniem odpowiednich uprawnień.

ROLA BADAŃ PRZEDKLINICZNYCH W ROZWOJU NOWYCH TERAPII UDARU NIEDOKRWIENNEGO

Na przestrzeni lat prowadzono intensywne badania nad procesami zachodzącymi w mózgu w następstwie udaru niedokrwienego, wykorzystując w tym celu modele zwierzęce i komórkowe. Obecnie możliwości terapeutyczne dla pacjentów po udarze ograniczają się do przywrócenia krążenia krwi i nie zapobiegają w pełni nieodwracalnym uszkodzeniom mózgu, które prowadzą do niepełnosprawności objawiającej się m.in. upośledzeniem funkcji motorycznych. Ponadto nie ma w tej chwili farmakoterapii, które wspomagałyby regenerację po udarze. Celem przyszłych terapii mogłyby być w szczególności neuroprotekcja, hamowanie stanu zapalnego, modulacja przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej oraz modulacja angiogenezy [56–58]. Procesy te mają bowiem kluczowy wpływ na długoterminowe skutki udaru, co odkryto w dużej mierze dzięki badaniom z zastosowaniem zwierzęcych modeli doświadczalnych. Złuszczanie terapii ukierunkowane na neuroprotekcję oraz na hamowanie reakcji zapalnej stały się w ostatnich latach przedmiotem intensywnych badań przedklinicznych [57,58].

Strategie neuroprotekcyjne z założenia skupiają się na ograniczaniu śmierci neuronów, w szczególności w obszarze penumbry – a więc tych, których uszkodzenie następuje w późniejszym czasie od zablokowania naczyń krwionośnych. Proponowane podejścia miałyby się opierać na ograniczaniu ekscytotoksyczności, na przykład dzięki zastosowaniu antagonistów receptorów NMDA, czy też na wymiataniu wolnych rodników w celu ograniczenia stresu oksydacyjnego. Niestety, w przypadku wielu substancji neuroprotekcyjnych, które w badaniach przedklinicznych wykazywały korzystny efekt, nie wykazano skuteczności w próbach klinicznych [59,60]. Wywołało to szeroką debatę na temat potencjalnych przyczyn tych niepowodzeń oraz realnej użyteczności dostępnych modeli zwierzęcych w badaniach przedklinicznych. Jednym z wniosków tej debaty jest propozycja zastąpienia strategii skupiających się wyłącznie na ochronie neuronów przed śmiercią szerszym podejściem, obejmującym kilka punktów uchwytu. Zwraca się uwagę, że neurony są elementem większej jednostki, tzw. jednostki neuronaczyniowej (ang. *neurovascular unit*, NVU), która jest kluczowa w procesach zachodzących po udarze i to taką jednostkę jako całość należy chronić przed uszkodzeniem [17].

Drugim znaczącym kierunkiem w badaniach nad nowymi terapiami dla pacjentów po udarze niedokrwinnym jest hamowanie stanu zapalnego [61]. Obiecujące wydaje się zwłaszcza hamowanie mechanizmów zależnych od interleukiny 1 beta (IL-1 β), która jest cytokiną prozapalną o silnym działaniu na wiele rodzajów komórek. Badania nad IL-1 β w modelach zwierzęcych wykazały, że blokowanie aktywności tej ścieżki może przynieść korzyści kliniczne w leczeniu pacjentów po udarze niedokrwinnym [62]. Przeprowadzone następnie badania kliniczne potwierdziły, że zastosowanie anakinry, blokera receptora dla IL-1 β , obniża poziom markerów stanu zapalnego i może poprawiać stan pacjentów po udarze [63].

Szczególnie obiecującym podejściem wydaje się łączenie kilku terapeutyków o różnych mechanizmach działania, które podane razem działają synergistycznie. Przykładem takiej strategii jest zastosowanie Edaravone Dexborneol (EDB albo Eda.B). EDB jest połączeniem edarawonu o właściwościach antyoksydacyjnych i neuroprotektoryjnych, stosowanego w leczeniu stwardnienia zanikowego bocznego (ang. *amyotrophic lateral sclerosis*, ALS) [64], z (+)-borneolem (dexborneolem), który działa przeciwzapalnie i neuroprotektoryjnie [65]. Badania w modelu zwierzęcym pokazały, że EDB wykazuje właściwości przeciwzapalne i neuroprotektoryjne oraz zmniejsza deficyty neurologiczne i wielkość obszaru uszkodzonego udarem [66]. Opublikowane niedawno wyniki badania klinicznego potwierdzają korzystny wpływ podania EDB na stan pacjentów 90 dni po udarze [67]. Co istotne, droga podania EDB (podjęzykowa), jest bardzo korzystna w kontekście łatwego zastosowania terapii u pacjentów i szybkiego działania leku.

PODSUMOWANIE

Ze względu na złożoność udaru, która obejmuje interakcje między narządami, takimi jak mózg i serce, oraz wpływ układów, takich jak układ odpornościowy, badania w modelach zwierzęcych są kluczowe dla poznania procesów zachodzących po udarze. Ponadto badania przedkliniczne w takich modelach pozostają niezbędne do oceny skuteczności nowych terapii w kontekście całego organizmu, ich bezpieczeństwa oraz potencjalnych skutków ubocznych. Należy jednak podkreślić, że – w miarę możliwości – badania na modelach zwierzęcych powinny być poprzedzone eksperymentami na modelach komórkowych, których wyniki pozwalają odpowiednio ściśle ukierunkować i ograniczyć do minimum prace z wykorzystaniem zwierząt.

Dobór odpowiedniego modelu stosowanego w badaniach przedklinicznych jest niezwykle istotny, ponieważ każdy z modeli ma określoną charakterystykę umożliwiającą badanie konkretnych zjawisk, a różne modele odpowiadają różnym sytuacjom klinicznym. Należy przy tym mieć na uwadze, że w większości przypadków zwierzęta użyte w doświadczeniach są osobnikami młodymi i zdrowymi, podczas gdy pacjenci z udarem obciążeni są współistniejącymi chorobami oraz dojrzałym wiekiem. Niemniej jednak modelowanie udaru na starzejących się zwierzętach jest możliwe i prawdopodobnie stanowi przyszłość badań w tym kierunku.

Na koniec warto wspomnieć o działaniach podjętych w odpowiedzi na problem z przełożeniem badań przedklinicznych na kliniczne. W wyniku kryzysu wywołanego niepowodzeniem szeregu badań klinicznych powstała organizacja SPAN (ang. *Stroke Preclinical Assessment Network*; <https://spannetwork.org/>), która umożliwia dialog między przedstawicielami środowisk naukowych i medycznych. Głównym celem SPAN jest systematyczne wybieranie najbardziej obiecujących terapii, które mogą być testowane w warunkach klinicznych. Zadaniem SPAN jest również analizowanie problemów utrudniających prawidłowe modelowanie udaru w badaniach przedklinicznych.

Interdyscyplinarny charakter organizacji SPAN pozwala na wymianę wiedzy między światowej klasy specjalistami, co przekłada się na rozwój terapii ukierunkowanych na leczenie udaru. Ponadto, planując badania warto mieć na uwadze wytyczne STAIR (ang. *Stroke Therapy and Academic Industry Roundtable*) – konsorcjum powołanego w celu poprawienia jakości badań przedklinicznych w dziedzinie udaru (<https://www.thestair.com>). Wytyczne STAIR uaktualniane są co kilka lat, wraz z rozwojem nowych modeli udaru, ich modyfikacjami, rozwojem nowych kierunków terapii oraz postępem w zakresie obrazowania. Najnowsze wytyczne opublikowane zostały w 2021 roku [68].

Podsumowując, wieloletnie badania nad patogenezą udaru niedokrwinnego i potencjalnymi terapiami przyniosły pewien postęp, choć nadal jest on niezadowolający – dotychczas nie doprowadziły do wdrożenia nowych strategii leczenia do praktyki klinicznej. Wyznaczenie nowych kierunków w farmakologii oraz konsolidacja środowisk naukowych i klinicznych wokół kluczowych problemów w terapii udaru pozwala mieć jednak nadzieję, że w najbliższym czasie przełożą się one na przełom we wspieraniu powrotu do zdrowia pacjentów po udarze.

PIŚMIENNICTWO

1. Feigin VL, Brainin M, Norrving B, Martins S, Sacco RL, Hacke W, Fisher M, Pandian J, Lindsay P (2022) World Stroke Organization (WSO): Global Stroke Fact Sheet 2022. *Int J Stroke* 17:18–29
2. Grabowska-Fudala B, Jaracz K, Górna K (2010) Zapadalność, śmiertelność i umieralność z powodu udarów mózgu – aktualne tendencje i prognozy na przyszłość []. *Przeegl Epidemiol* 64:439–442
3. Gabryel B, Kasprowska D, Kost A, Łabuzek K, Urbanek T (2015) Astrocyty w udarze niedokrwinnym mózgu – potencjalny cel strategii neuroprotektoryjnych. *Postepy Hig Med Dosw* 69:384–397
4. Sacco RL, Kasner SE, Broderick JP, Caplan LR, Connors JJ (Buddy), Culebras A, Elkind MSV, George MG, Hamdan AD, Higashida RT, Hoh BL, Janis LS, Kase CS, Kleindorfer DO, Lee J-M, Moseley ME, Peterson ED, Turan TN, Valderrama AL, Vinters HV (2013) An Updated Definition of Stroke for the 21st Century. *Stroke* 44:2064–2089
5. Boehme AK, Esenwa C, Elkind MSV (2017) Stroke Risk Factors, Genetics, and Prevention. *Circulation Research* 120:472–495
6. Goodman GW, Do TH, Tan C, Ritzel RM (2023) Drivers of Chronic Pathology Following Ischemic Stroke: A Descriptive Review. *Cell Mol Neurobiol* 44:7
7. Jauch EC, Saver JL, Adams HP, Bruno A, Connors JJ (Buddy), Demerschalk BM, Khatiri P, McMullan PW, Qureshi AI, Rosenfield K, Scott PA, Summers DR, Wang DZ, Wintermark M, Yonas H (2013) Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 44:870–947
8. Wardlaw JM, Murray V, Berge E, del Zoppo GJ (2014) Thrombolysis for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev* 2014:CD000213
9. Burgos AM, Saver JL (2019) Evidence that Tenecteplase Is Noninferior to Alteplase for Acute Ischemic Stroke: Meta-Analysis of 5 Randomized Trials. *Stroke* 50:2156–2162
10. Goyal M, Menon BK, Van Zwam WH, Dippel DWJ, Mitchell PJ, Demchuk AM, Dávalos A, Majoie CBLM, Van Der Lugt A, De Miquel MA, Donnan GA, Roos YBWEM, Bonafe A, Jahan R, Diener H-C, Van Den Berg LA, Levy EI, Berkhemer OA, Pereira VM, Rempel J, Millán M, Davis SM, Roy D, Thornton J, Román LS, Ribó M, Beumer D, Stouch B, Brown S, Campbell BCV, Van Oostenbrugge RJ, Saver JL, Hill MD, Jovin TG (2016) Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *The Lancet* 387:1723–1731

11. Østergaard L, Jespersen SN, Mouridsen K, Mikkelsen IK, Jonsdóttir KÝ, Tietze A, Blicher JU, Aamand R, Hjort N, Iversen NK, Cai C, Hougaard KD, Simonsen CZ, Von Weitzel-Mudersbach P, Modrau B, Nagenthiraja K, Ribe LR, Hansen MB, Bekke SL, Dahlman MG, Puig J, Pedraza S, Serena J, Cho T-H, Siemonsen S, Thomalla G, Fiehler J, Nighoghossian N, Andersen G (2013) The Role of the Cerebral Capillaries in Acute Ischemic Stroke: The Extended Penumbra Model. *J Cereb Blood Flow Metab* 33:635–648
12. Koukalova L, Chmelova M, Amlerova Z, Vargova L (2024) Out of the core: the impact of focal ischemia in regions beyond the penumbra. *Front Cell Neurosci* 18:1336886
13. Garcia JH, Liu K-F, Ho K-L (1995) Neuronal Necrosis After Middle Cerebral Artery Occlusion in Wistar Rats Progresses at Different Time Intervals in the Caudoputamen and the Cortex. *Stroke* 26:636–643
14. Broughton BRS, Reutens DC, Sobey CG (2009) Apoptotic Mechanisms After Cerebral Ischemia. *Stroke* 40:e331–e339
15. Mao R, Zong N, Hu Y, Chen Y, Xu Y (2022) Neuronal Death Mechanisms and Therapeutic Strategy in Ischemic Stroke. *Neurosci Bull* 38:1229–1247
16. Zhang M, Liu Q, Meng H, Duan H, Liu X, Wu J, Gao F, Wang S, Tan R, Yuan J (2024) Ischemia-reperfusion injury: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Sig Transduct Target Ther* 9:1–39
17. Yang Y, Guo D, Liu Y, Li Y (2024) Advances in neuroprotective therapy for acute ischemic stroke. *Explor Neuroprot Ther* 4:55–71
18. Sofroniew MV (2014) Multiple Roles for Astrocytes as Effectors of Cytokines and Inflammatory Mediators. *Neuroscientist* 20:160–172
19. Levison SW, Jiang F-J, Stoltzfus OK, Ducceschi MH (2000) IL-6-type cytokines enhance epidermal growth factor-stimulated astrocyte proliferation. *Glia* 32:328–337
20. Malik AR, Lips J, Gorniak-Walas M, Broekaart DWM, Asaro A, Kuffner MTC, Hoffmann CJ, Kikhia M, Dopatka M, Boehm-Sturm P, Mueller S, Dirnagl U, Aronica E, Harms C, Willnow TE (2020) SorCS2 facilitates release of endostatin from astrocytes and controls post-stroke angiogenesis. *Glia* 68:1304–1316
21. Gadea A, Schinelli S, Gallo V (2008) Endothelin-1 Regulates Astrocyte Proliferation and Reactive Gliosis via a JNK/c-Jun Signaling Pathway. *J Neurosci* 28:2394–2408
22. Silver J, Miller JH (2004) Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 5:146–156
23. Wicks EE, Ran KR, Kim JE, Xu R, Lee RP, Jackson CM (2022) The Translational Potential of Microglia and Monocyte-Derived Macrophages in Ischemic Stroke. *Front Immunol* 13:897022
24. Gaire BP (2022) Microglia as the Critical Regulators of Neuroprotection and Functional Recovery in Cerebral Ischemia. *Cell Mol Neurobiol* 42:2505–2525
25. Schilling M, Besselmann M, Müller M, Strecker JK, Ringelstein EB, Kiefer R (2005) Predominant phagocytic activity of resident microglia over hematogenous macrophages following transient focal cerebral ischemia: An investigation using green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Experimental Neurology* 196:290–297
26. Haruwaka K, Ikegami A, Tachibana Y, Ohno N, Konishi H, Hashimoto A, Matsumoto M, Kato D, Ono R, Kiyama H, Moorhouse AJ, Nabekura J, Wake H (2019) Dual microglia effects on blood brain barrier permeability induced by systemic inflammation. *Nat Commun* 10:5816
27. Jolivel V, Bicker F, Binamé F, Ploen R, Keller S, Gollan R, Jurek B, Birkenstock J, Poisa-Beiro L, Bruttger J, Opitz V, Thal SC, Waisman A, Bäuerle T, Schäfer MK, Zipp F, Schmidt MHH (2015) Perivascular microglia promote blood vessel disintegration in the ischemic penumbra. *Acta Neuropathol* 129:279–295
28. Garcia-Bonilla L, Faraco G, Moore J, Murphy M, Racchumi G, Srinivasan J, Brea D, Iadecola C, Anrather J (2016) Spatio-temporal profile, phenotypic diversity, and fate of recruited monocytes into the post-ischemic brain. *Journal of Neuroinflammation* 13:285
29. Jia J, Yang L, Chen Y, Zheng L, Chen Y, Xu Y, Zhang M (2022) The Role of Microglial Phagocytosis in Ischemic Stroke. *Front Immunol* 12:790201
30. Tasca CI, Dal-Cim T, Cimarosti H (2015) In vitro oxygen-glucose deprivation to study ischemic cell death. *Methods Mol Biol* 1254:197–210
31. Gouix E, Buisson A, Nieoullon A, Kerkerian-Le Goff L, Tauskela JS, Blondeau N, Had-Aissoumi L (2014) Oxygen glucose deprivation-induced astrocyte dysfunction provokes neuronal death through oxidative stress. *Pharmacol Res* 87:8–17
32. Wang S, Wang Z, Wang X, Zhang X, Xu T, Miao C (2023) Humanized cerebral organoids-based ischemic stroke model for discovering of potential anti-stroke agents. *Acta Pharmacol Sin* 44:513–523
33. Giorgi C, Castelli V, d'Angelo M, Cimmini A (2024) Organoids Modeling Stroke in a Petri Dish. *Biomedicines* 12:877
34. McBride DW, Zhang JH (2017) Precision Stroke Animal Models: the Permanent MCAO Model Should Be the Primary Model, Not Transient MCAO. *Transl Stroke Res* 8:397–404
35. Mouse Genome Sequencing Consortium (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420:520–562
36. Rat Genome Sequencing Project Consortium (2004) Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 428:493–521
37. Beauchamp A, Yee Y, Darwin BC, Raznahan A, Mars RB, Lerch JP (2023) Whole-brain comparison of rodent and human brains using spatial transcriptomics. *eLife* 11:e79418
38. Traystman RJ (2003) Animal Models of Focal and Global Cerebral Ischemia. *ILAR Journal* 44:85–95
39. Singh AA, Kharwar A, Dandekar MP (2022) A Review on Preclinical Models of Ischemic Stroke: Insights Into the Pathomechanisms and New Treatment Strategies. *Curr Neuropharmacol* 20:1667–1686
40. Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G (1986) Experimental studies of ischemic brain edema. *Nosotchu* 8:1–8
41. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20:84–91
42. Jin X, Imai T, Morais A, Sasaki Y, Chung DY, Ayata C (2024) Hippocampal infarction and generalized seizures predict early mortality after endovascular middle cerebral artery occlusion in mice. *Experimental Neurology* 380:114903
43. Li Y, Tan L, Yang C, He L, Liu L, Deng B, Liu S, Guo J (2023) Distinctions between the Koizumi and Zea Longa methods for middle cerebral artery occlusion (MCAO) model: a systematic review and meta-analysis of rodent data. *Sci Rep* 13:10247
44. Matur AV, Candelario-Jalil E, Paul S, Karamyan VT, Lee JD, Pennyacker K, Fraser JF (2023) Translating Animal Models of Ischemic Stroke to the Human Condition. *Transl Stroke Res* 14:842–853
45. Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM (1981) Focal Cerebral Ischaemia in the Rat: 1. Description of Technique and Early Neuropathological Consequences following Middle Cerebral Artery Occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1:53–60
46. Aboysinghe HCS, Roulston CL (2018) A Complete Guide to Using the Endothelin-1 Model of Stroke in Conscious Rats for Acute and Long-Term Recovery Studies. *Methods Mol Biol* 1717:115–133
47. Uzdensky AB (2018) Photothrombotic Stroke as a Model of Ischemic Stroke. *Transl Stroke Res* 9:437–451
48. Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD (1985) Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol* 17:497–504
49. Knezic A, Broughton BRS, Widdop RE, McCarthy CA (2022) Optimising the photothrombotic model of stroke in the C57Bl/6 and FVB/N strains of mouse. *Sci Rep* 12:7598
50. Harrison TC, Silasi G, Boyd JD, Murphy TH (2013) Displacement of sensory maps and disorganization of motor cortex after targeted stroke in mice. *Stroke* 44:2300–2306
51. Clark TA, Sullender C, Kazmi SM, Speetles BL, Williamson MR, Palmberg DM, Dunn AK, Jones TA (2019) Artery targeted photothrombosis widens the vascular penumbra, instigates peri-infarct neovascularization and models forelimb impairments. *Sci Rep* 9:2323
52. Cotrina ML, Lou N, Tome-Garcia J, Goldman J, Nedergaard M (2017) Direct comparison of microglial dynamics and inflammatory profile in

- phothrombotic and arterial occlusion evoked stroke. *Neuroscience* 343:483–494
53. Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, Clarke SE, Drummond TE, Echols S, Glick S, Ingrao J, Klassen-Ross T, LaCroix-Fralish ML, Matsumiya L, Sorge RE, Sotocinal SG, Tabaka JM, Wong D, van den Maagdenberg AMJM, Ferrari MD, Craig KD, Mogil JS (2010) Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Methods* 7:447–449
 54. Morton DB (2000) A Systematic Approach for Establishing Humane Endpoints. *ILAR Journal* 41:80–86
 55. Burch RL, Russell WMS (1960) The Principles of Humane Experimental Technique. *Medical Journal of Australia* 1:500–500
 56. Qin C, Yang S, Chu Y-H, Zhang H, Pang X-W, Chen L, Zhou L-Q, Chen M, Tian D-S, Wang W (2022) Signaling pathways involved in ischemic stroke: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Sig Transduct Target Ther* 7:1–29
 57. Ospel J, Rex N, Kandregula S, Goyal M (2023) The Vessel Has Been Recanalized: Now What? *Neurotherapeutics* 20:679–692
 58. Rajendram P, Ikram A, Fisher M (2023) Combined Therapeutics: Future Opportunities for Co-therapy with Thrombectomy. *Neurotherapeutics* 20:693–704
 59. Anderson CS, Song L (2024) Promising Efforts to Define a Novel Approach to Neuroprotection for Acute Ischemic Stroke. *JAMA Neurology* 81:317–318
 60. Chamorro Á, Lo EH, Renú A, Leyen K van, Lyden PD (2021) The future of neuroprotection in stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 92:129–135
 61. Levard D, Buendia I, Lanquetin A, Glavan M, Vivien D, Rubio M (2021) Filling the gaps on stroke research: Focus on inflammation and immunity. *Brain, Behavior, and Immunity* 91:649–667
 62. Murray KN, Parry-Jones AR, Allan SM (2015) Interleukin-1 and acute brain injury. *Front Cell Neurosci* 9:18
 63. Kazmi S, Salehi-Pourmehr H, Sadigh-Eteghad S, Farhoudi M (2024) The efficacy and safety of interleukin-1 receptor antagonist in stroke patients: A systematic review. *Journal of Clinical Neuroscience* 120:120–128
 64. Cho H, Shukla S (2020) Role of Edaravone as a Treatment Option for Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Pharmaceuticals (Basel)* 14:29
 65. Liu R, Zhang L, Lan X, Li L, Zhang T-T, Sun J-H, Du G-H (2011) Protection by borneol on cortical neurons against oxygen-glucose deprivation/reperfusion: involvement of anti-oxidation and anti-inflammation through nuclear transcription factor kappaB signaling pathway. *Neuroscience* 176:408–419
 66. Hu R, Liang J, Ding L, Zhang W, Liu X, Song B, Xu Y (2022) Edaravone dextroborneol provides neuroprotective benefits by suppressing NLRP3 inflammasome-induced microglial pyroptosis in experimental ischemic stroke. *Int Immunopharmacol* 113:109315
 67. Fu Y, Wang A, Tang R, Li S, Tian X, Xia X, Ren J, Yang S, Chen R, Zhu S, Feng X, Yao J, Wei Y, Dong X, Ling Y, Yi F, Deng Q, Guo C, Sui Y, Han S, Wen G, Li C, Dong A, Sun X, Wang Z, Shi X, Liu B, Fan D (2024) Sublingual Edaravone Dextroborneol for the Treatment of Acute Ischemic Stroke: The TASTE-SL Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurology* 81:319–326
 68. Lyden P, Buchan A, Boltze J, Fisher M, STAIR XI Consortium (2021) Top Priorities for Cerebroprotective Studies-A Paradigm Shift: Report From STAIR XI. *Stroke* 52:3063–3071

From bench to bedside: experimental animal models in ischemic stroke research

Sylwia Piątek, Ewelina Ziemińska, Palina Milewska, Anna R. Malik✉

Cellular Neurobiology Research Group, Faculty of Biology, University of Warsaw

✉corresponding author: ar.malik@uw.edu.pl

Keywords: astrocytes, microglia, macrophages, MCAo, phototrombotic model, regeneration

ABSTRACT

Stroke is a devastating cardiovascular disease with a high mortality rate, leading to a significant reduction in quality of life and life expectancy. Due to the complexity of the pathophysiological processes following stroke in humans, the use of animal models of stroke, in particular rodent models, is essential for the development of treatments for patients. Transient or permanent middle cerebral artery occlusion (MCAo) and phototrombotic models are the most commonly used to simulate ischemic stroke and are discussed in this review in detail. Furthermore, we provide an overview of the current knowledge on the inflammatory and regenerative responses to stroke, executed mainly by glial cells but also by macrophages infiltrating the post-ischemic brain. Understanding the advantages and disadvantages of different animal models is the basis for their further refinement, allowing for better simulation of post-stroke events and the development of new therapeutic approaches for cerebral ischemia in humans.

