

Magdalena Józwicka, Andrzej Głabiński

Received: 04.12.2012

Accepted: 10.12.2012

Published: 31.12.2012

Modele doświadczalne udaru niedokrwiennego mózgu

Experimental models of ischaemic stroke

Klinika Neurologii i Epileptologii z Oddziałem Udarowym, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Adres do korespondencji: Magdalena Józwicka, Klinika Neurologii i Epileptologii z Oddziałem Udarowym, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Żeromskiego 113, 91-647 Łódź, e-mail: magda-kacperska@o2.pl, aglabinski@gmail.com

Praca finansowana ze środków własnych

Streszczenie

Postępy w zakresie neurologii oraz neuroradiologii mają ogromny wpływ na poprawę jakości diagnostyki i leczenia chorób naczyniowych ośrodkowego układu nerwowego. Udary mózgu pozostają jednym z głównych problemów współczesnej medycyny. Są drugą przyczyną zgonów, a pierwszą inwalidztwa w populacji osób dorosłych na świecie. Udar niedokrwienny mózgu stanowi 80-85% przypadków wszystkich udarów, udar krwotoczny pozostałe 15-20% przypadków (10% to krwotoki mózgowe, a 5% krwotoki podpajęczynówkowe). Wynika z tego, że zdecydowana większość udarów ma charakter niedokrwienny. Ogniskowe niedokrwienie mózgu wywołane jest głównie miejscowym zanikiem bądź spadkiem przepływu krwi, spowodowanym przez zator lub zakrzep, co w konsekwencji prowadzi do deficytu energetyczno-tlenowego w obszarze niedokrwienia. Szacuje się, że co najmniej 1/6 całej populacji jest zagrożona wystąpieniem przynajmniej jednego udaru mózgu w życiu. Jest on niebezpieczną chorobą nie tylko ze względu na śmiertelność, ale również z powodu niepełnosprawności pacjentów, którzy przeżywają udar (około 80% chorych). Do dziś w centrum zainteresowania przedstawicieli wielu dyscyplin naukowych pozostaje poznanie patofizjologii powyższego procesu, a także opracowanie i przedstawienie skutecznych metod terapeutycznych. Modele doświadczalne niedokrwienia mózgu są powszechnie stosowane w badaniach nad jego patogenezą i są przydatne głównie w badaniach biochemicznych oraz patofizjologicznych, nie odgrywają jednak tak znaczącej roli w badaniach nad nowymi terapiami udarów. W poniższej pracy zostały przedstawione najczęściej stosowane modele doświadczalne niedokrwienia mózgu. Omówiono ich zalety, wady, jak również możliwe przyczyny rozbieżności pomiędzy wynikami badań doświadczalnych i klinicznych. Tworzenie nowych modeli doświadczalnych, ich analiza oraz porównywanie wyników z badaniami klinicznymi są nadal istotnym wyzwaniem dla naukowców. W przyszłości badania te mogą przynieść rozwiązanie nurtujących badaczy problemów naukowych związanych z patogenezą i leczeniem udarów mózgu.

Słowa kluczowe: model doświadczalny, niedokrwienie, udar mózgu, neuroprotekcja, mózgowy przepływ krwi

Summary

Progress in neurology and neuroradiology has had a tremendous impact on the improvement of quality of diagnosis and treatment of vascular diseases of the central nervous system. Stroke remains one of the major problems of modern medicine. It is the second most common cause of mortality and the leading cause of adult disability worldwide. Ischaemic stroke accounts for 80-85% of all cases of stroke, while haemorrhagic stroke – for the remaining 15-20% (thereof, 10% are intracerebral haemorrhages and 5% – subarachnoid haemorrhages). Thus, the vast majority of strokes are ischaemic in nature. Focal brain ischaemia is mainly caused by local reduction or cessation of blood flow due to embolism or thrombosis, which in turn leads to energy and oxygen deficit in the area of ischaemia. As estimated, at least 1/6 of the general population is at risk of at least one cerebral ischaemic event over their lifetime. Stroke is an utmost dangerous condition, not only because of mortality risk associated therewith, but also because of severe disability of stroke survivors (nearly 80% of stroke cases). To date, elucidation of pathophysiology of this process, development and introduction of effec-

tive therapies remains the focus of interest of representatives of many scientific disciplines. Experimental models of brain ischaemia are widely used mainly in biochemical and pathophysiological research, but they do not play any significant role in the search for novel stroke therapies. This paper describes most commonly used experimental models of cerebral ischaemia. Their advantages, disadvantages and possible causes of discrepancy between results of experimental and clinical studies are discussed. Development of new experimental models, their validation and correlation with results of clinical trials remain a considerable challenge for investigators. In the future, such studies may provide solution to issues and problems associated with stroke pathogenesis and treatment.

Key words: experimental model, ischaemia, stroke, neuroprotection, cerebral blood flow

WSTĘP

Niezadowalające wyniki leczenia udaru niedokrwiennego mózgu oraz jego znaczna częstość występowania powodują, iż badania patogenezy tego procesu znajdują się nadal w centrum zainteresowania badaczy z wielu dziedzin medycyny. Obecnie niemożliwe jest, by badania nad nowymi lekami nie były poprzedzone badaniami na zwierzętach. W związku z powyższym wciąż wykorzystywane są doświadczalne modele procesu niedokrwiennego w mózgu, których zadaniem jest jak najwierniejsze odwzorowanie mechanizmów rozwoju udaru mózgu.

Mózgowie charakteryzuje się wysoką aktywnością metaboliczną i nie ma możliwości gromadzenia tlenu ani glukozy. Ludzkie mózgowie jest całkowicie zależne od ciągłego dopływu dobrze natlenowanej krwi. Już po około 10 s od wystąpienia jego niedokrwienia następuje utrata przytomności, po 20 s ustaje aktywność bioelektryczna, a po kilku minutach dochodzi do nieodwracalnych uszkodzeń. Poznanie naczyń mózgowia ma podstawowe znaczenie dla zrozumienia jego funkcji oraz wyjaśnienia konsekwencji chorób naczyniowych. Naczyńnictwo tętnicze mózgowia oraz rdzenia kręgowego pochodzi z zakresu dwóch par naczyń: tętnic szyjnych wewnętrznych i tętnic kręgowych. Te pierwsze dostarczają około 80% objętości krwi, zaopatrując kresomózgowie i znaczny obszar międzymózgowia. Te drugie dostarczają około 20% objętości krwi, zaopatrując pień mózgu i mózdzek, część międzymózgowia, rdzeń kręgowy i płaty potyliczne i skroniowe.

UDAR NIEDOKRWIENNY MÓZGU

Udar mózgu wciąż stanowi jedną z głównych przyczyn zgonów i trwałego inwalidztwa w krajach wysoko rozwiniętych. Jest to niejednorodna jednostka chorobowa, będąca zespołem objawów ogniskowych powstałych w wyniku niedokrwienia lub krwotoku do tkanki mózgowej, spowodowanych różnymi przyczynami⁽¹⁾. Rozróżnia się dwa typy udarów: krwotoczny i niedokrwienny. Udary krwotoczne stanowią około 20% wszystkich udarów, pozostałe 80% to udary niedokrwienne, wśród których około 50-80% ma charakter miażdżycowy^(1,2).

Niedokrwienie ośrodkowego układu nerwowego określa się jako zaburzenie miejscowe, wywołane zmniejszeniem dopływu krwi tętniczej do danego obszaru mózgowia, które może prowadzić do uszkodzenia tkanki nerwowej lub całkowitej jej

martwicy⁽³⁾. Niedokrwienie można klasyfikować jako globalne, czyli dotyczące całego mózgu, lub ogniskowe, ograniczone tylko do jego części⁽⁴⁾. Jego stopień oraz następstwa wynikają między innymi z: czasu trwania zaburzeń, stopnia zwężenia lub zamknięcia naczynia doprowadzającego tlen i substancje odżywcze oraz istnienia krążenia obocznego⁽⁵⁾. Niedokrwienie związane z wystąpieniem nagłego incydentu mózgowo-naczyniowego w obszarze bezpośredniego unaczynienia fragmentu mózgowia, przebiegające z zaburzeniem jego czynności i trwające ponad 24 godziny, stanowi podstawę do rozpoznania zespołu klinicznego określanego mianem udaru mózgu^(6,7).

Odkrycie tzw. strefy półcienia (penumbra) było pierwszym krokiem prowadzącym do zrozumienia procesów toczących się w niedokrwionym obszarze mózgowia⁽⁸⁾. Komórki nerwowe umiejscowione w strefie ogniska niedokrwiennego nie otrzymują dostatecznej ilości tlenu i substancji odżywczych, co skutkuje ich martwicą. Obwodowo w stosunku do tego obszaru znajduje się strefa komórek, które, jak wykazano, mogą być zaopatrywane w niezbędne do funkcjonowania substancje, przede wszystkim w tlen, dzięki istnieniu krążenia obocznego^(9,10). Ogromna różnorodność czynników ryzyka niedokrwienia, a następnie reperfuzji uszkodzonego obszaru powoduje, że przebieg procesu niedokrwienia mózgu *in vivo* nie został jeszcze do końca wyjaśniony. Do niedawna sądzono, iż tylko neurony są wrażliwe na działanie niedotlenienia będącego skutkiem niedokrwienia mózgu. Kolejne doniesienia wskazują na znaczącą rolę astrocytów^(11,12). Okazało się, że w warunkach fizjologicznych astrocyty uczestniczą w regulacji mikrośrodowiska mózgu, mają istotny wpływ na utrzymywanie homeostazy w zakresie neuroprzekazników czy równowagi jonowej⁽¹³⁾, biorą również udział w tworzeniu synaps oraz w budowie i utrzymywaniu bariery krew-mózg^(12,14). Jak wykazano, komórki glijowe wpływają także na transmisję synaptyczną, pobudliwość komórek nerwowych oraz ich migrację⁽¹⁵⁻¹⁷⁾. Proces zapalny jest kolejnym ważnym czynnikiem odpowiedzialnym za nasilenie uszkodzenia mózgu w następstwie niedokrwienia^(18,19). Najważniejszymi elementami reakcji zapalnej są aktywacja komórek mikrogleju i astrocytów oraz napływ komórek układu odpornościowego (granulocytów i makrofagów) z krwi obwodowej. Istotną rolę we wszystkich etapach rozwoju reakcji zapalnej indukowanej niedokrwieniem odgrywają chemokiny oraz cytokiny – zarówno pro-, jak i przeciwzapalne, uwalniane w mózgowiu przez astrocyty, neurony oraz komórki mikrogleju i śródbłonna naczyniowego⁽²⁰⁻²⁴⁾.

MODELE DOŚWIADCZALNE UDARU MÓZGU

Jak dotąd nie ma jednego doskonałego modelu doświadczalnego procesu niedokrwienia mózgu. Idealny model powinien odzwierciedlać zmiany zachodzące w mózgu pacjenta podczas rozwoju udaru niedokrwiennego⁽²⁵⁻²⁹⁾. W związku z tym u podstaw doświadczalnego modelu procesu niedokrwienia mózgowia leży ograniczenie dostępu tlenu i glukozy do określonego obszaru tkanki nerwowej. Użyteczny model powinien charakteryzować się dodatkowo prostotą jego wywołania, niezbyt dużą inwazyjnością, powtarzalnością, powinien ponadto być wolny od powikłań i możliwy do zastosowania u różnych gatunków zwierząt. Ważnym aspektem są również niskie koszty.

Najodpowiedniejszym gatunkiem zwierząt do badań doświadczalnych nad niedokrwieniem są gryzonie. Za ich wyborem przemawiają następujące argumenty:

- bardzo dobra znajomość ich procesów fizjologicznych;
- dobra znajomość budowy anatomicznej;
- schemat unaczynienia mózgowia podobny do ludzkiego;
- łatwość i znajomość hodowli przy stosunkowo niewielkich kosztach;
- możliwość ingerencji genetycznej;
- społeczna akceptacja badań.

Tradycyjny podział obejmuje modele doświadczalne odtwarzające warunki całkowitego (globalnego) oraz częściowego (ogniskowego lub wielogniskowego) niedokrwienia^(25,27,29-31) (tabela 1).

Globalne niedokrwienie mózgowia może zostać wywołane zatrzymaniem akcji serca, uciskiem mechanicznym wielkich naczyń na szyi lub we wnętrzu klatki piersiowej⁽³²⁻³⁶⁾ przez zamknięcie tętnic szyjnych wewnętrznych oraz tętnic kręgowych

lub podaniem płynu fizjologicznego do zbiornika wielkiego w celu zwiększenia ciśnienia śródczaszkowego^(37,38), jak również poprzez izolację mózgowia zwierzęcia (dekapitację)⁽³⁹⁾. Każdy model posiada wady i zalety. Niewątpliwie ogromną wadą tych modeli jest fakt, iż zaburzenia funkcji układu krążenia wpływają równocześnie na funkcje innych narządów. Należy tu podkreślić, że wywiera to istotny wpływ na charakter zmian w strukturach ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Ponadto długość niedokrwienia mózgowia zwykle znacznie przekracza czas zatrzymania akcji serca i nie może być precyzyjnie kontrolowana. Istotne znaczenie mają również wysoka śmiertelność zwierząt doświadczalnych, konieczność pracochłonnego monitoringu zwierzęcia w przebiegu pooperacyjnym, czasochłonność i wysokie koszty badań. Do zalet powyższych modeli z pewnością zalicza się możliwość wywołania niedokrwienia w strukturach położonych poza obszarem unaczynienia tętnicy szyjnej wewnętrznej, jak również możliwość oceny zmian zachodzących jednocześnie w różnych strukturach OUN. Dużą zaletą jest możliwość wytworzenia jednakowych pod względem biochemicznym i patofizjologicznym warunków niedokrwienia w całym mózgowiu.

Częściowe niedokrwienie mózgowia wywołuje się przede wszystkim przez zewnątrz- lub wewnątrzczaszkowe zamknięcie tętnicy środkowej mózgu. W przypadku **zewnątrczaszkowego zamknięcia** tętnicy środkowej mózgu popularnie stosowanym sposobem jest wprowadzenie **monofilamentowej nici chirurgicznej** poprzez kikut tętnicy szyjnej zewnętrznej lub poprzez tętnicę szyjną wspólną. Zaokrąglony koniec nici umieszcza się w miejscu podziału tętnicy szyjnej wewnętrznej na tętnicę środkową mózgu oraz tętnicę przednią mózgu⁽⁴⁰⁻⁴²⁾. Umożliwia to wywołanie niedokrwienia w okolicy czołowo-ciemieniowej kory oraz w bocznej części prążkowania. Do niewątpliwych zalet tej metody należą między innymi duża powtarzalność uzyskanych wyników oraz niezbyt długi czas wykonania zabiegu. W modelu tym zazwyczaj dochodzi do wytworzenia stosunkowo dużego obszaru półcienia (penumbrzy). Wadami metody są: brak bezpośredniej kontroli nad położeniem szwu, możliwość perforacji naczynia i wytworzenia krwawienia podpajęczynówkowego, a także częsta hipertermia wynikająca z uszkodzenia podwzgórza. Model ten jest odpowiedni i często wykorzystywany 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. Często stosuje się bezpośrednie uciskanie naczynia specjalnie przygotowaną szklaną pipetą⁽⁴⁰⁾. **Zamknięcie tętnicy środkowej mózgu po uzyskaniu do niej dostępu drogą przezoczołową** należy do rzadziej stosowanych metod⁽⁴³⁾. Wśród jej zalet wymienia się dużą powtarzalność wyników (wielkości i położenie obszaru niedokrwienia). Można dowolnie regulować długość okresu niedokrwienia. Możliwość łatwego uszkodzenia powierzchni kory, wywołania krwawienia podpajęczynówkowego oraz konieczność dobrego opanowania podstawowych zasad techniki mikrochirurgicznej to podstawowe wady tejże metody. Powyższe modele są

Modele całkowitego niedokrwienia mózgowia	Modele częściowego niedokrwienia mózgowia
<p>1) Niedokrwienie <i>in vivo</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Zatrzymanie akcji serca (roztwór KCl) • Obniżenie ciśnienia tętniczego • Migotanie komór • Podanie płynu fizjologicznego do zbiornika wielkiego • Zamknięcie aorty • Dekapitacja (preparaty izolowanego mózgowia) • Zamknięcie gałęzi łuku aorty • Obustronne zamknięcie tętnic szyjnych wewnętrznych • Zamknięcie tętnic szyjnych wewnętrznych i kręgowych <p>2) Niedokrwienie <i>in vitro</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hodowle komórkowe • Skrawki mózgowia 	<p>1) Zamknięcie tętnicy szyjnej wspólnej</p> <p>2) Zamknięcie tętnicy środkowej mózgu:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Dostęp przezoczołowy • Dostęp przezczaszkowy • Dostęp wewnątrznaczyniowy, z zastosowaniem monofilamentowej nici chirurgicznej <p>3) Zastosowanie skrzepliny własnej krwi zwierzęcia do wytworzenia zatoru</p> <p>4) Zastosowanie materiału syntetycznego do wytworzenia zatoru</p> <p>5) Wytworzenie skurczu naczyniowego (endotelina 1)</p> <p>6) Obliteracja naczyń włosowatych:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Zastosowanie endoteliny 1 • Zastosowanie fototrombozy

Tabela 1. Wybrane zwierzęce modele doświadczalne udaru niedokrwiennego mózgowia

powszechnie stosowane, wykorzystuje się je w badaniach nad lekami neuroprotekcijnymi i trombolitycznymi^(28,29).

Kolejna grupa to modele oparte na wewnątrznaczyniowym wytworzeniu zakrzepu krwi lub powstaniu zatoru tętniczego. Powstają najczęściej wskutek wstrzyknięcia skrzepu krwi bądź materiału syntetycznego, takiego jak kolagen, silikon, srebrne mikrosfery⁽⁴⁴⁻⁴⁷⁾. Wytworzenie obszaru niedokrwienia metodą fototrombozy to nic innego jak wstrzyknięcie do układu naczyniowego odpowiedniego barwnika oraz naświetlenie światłem lasera o znanej długości fali wybranego rejonu czaszki lub dorzecza odsłoniętej tętnicy środkowej mózgu⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾. Konsekwencją jest ograniczone uszkodzenie śródbłonka naczyniowego i aktywacji układu krzepnięcia oraz agregacja płytek krwi zamykających światło naczynia. Duże podobieństwo do procesu zakrzepowego występującego w warunkach klinicznych należy uznać za zaletę tej metody. Model ten jest stosunkowo prosty do wykonania pod względem technicznym oraz mało inwazyjny. Do wad tej grupy modeli trzeba 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. Przedstawiona grupa modeli jest wykorzystywana w badaniach nowych leków trombolitycznych, fibrynolitycznych i neuroprotekcyjnych. Znalazła ona również zastosowanie w badaniach patofizjologii procesu trombolitycznego^(25,30,31).

Modele niedokrwienia mózgu *in vitro* prowadzone są w warunkach hodowli komórkowych, dzięki czemu badacze mają duży wpływ na skład otaczającego środowiska, w tym na dostęp glukozy i tlenu (*oxygen-glucose deprivation model*, OGD)^(51,52). Za ich wady uznaje się konieczność utrzymywania tkanek w środowisku, którego skład jest często odmienny od składu płynów występujących w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, jak również narażenie komórek na niekontrolowane uszkodzenie, także niedokrwienne, podczas pobierania materiału.

KTÓRY MODEL DOŚWIADCZALNY WYBRAĆ?

Jak dotąd nie istnieje idealny model doświadczalny procesu niedokrwienia mózgu. Prowadzenie badań doświadczalnych dostarcza wielu pożytecznych wyników, które można odnieść do warunków klinicznych. Jest to możliwe, gdy model doświadczalny wiernie odtworzy warunki patofizjologiczne panujące w organizmie chorego. Na podstawie analizy wyników uzyskanych w badaniach prowadzonych na zwierzęcych modelach doświadczalnych i wyników pochodzących z badań klinicznych określono warunki, które należy spełnione, aby porównać uzyskane dane i wyciągnąć użyteczne wnioski. Warunki te opracowano na podstawie rekomendacji udzielonej przez grupę Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR) w 1999 roku⁽⁵³⁾. W powyższym opracowaniu zwrócono uwagę na kilka ustaleń, w tym na dobór odpowiedniej dawki leku oparty na obserwacji efektów jego działania oraz ocenie jego stężenia w surowicy. Okazało się, że istotne znaczenie dla powtarzalności wyników mają monitorowanie wybranych parametrów fizjologicznych, obiektywna ocena wielkości obszaru

niedokrwienego, jak również wykonanie badań czynnościowych (uwzględniających testy behawioralne), przeprowadzonych we wczesnym i odległym okresie obserwacji. Najbardziej zalecane są doświadczenia z permanentnym zamknięciem tętnicy środkowej mózgu u przedstawicieli gatunków małych gryzoni. Uzyskane wyniki należy poddać ocenie histologicznej.

CO MA WPLYW NA WYNIKI BADAŃ?

Uzyskanie wiarygodnych wyników, które można porównać z wynikami badań klinicznych, jest możliwe dzięki dokładnemu monitorowaniu określonych parametrów fizjologicznych, takich jak: wielkość mózgowego przepływu krwi, temperatura wewnętrzna ciała, stężenia O_2 , CO_2 i glukozy w surowicy, ciśnienie tętnicze^(27,54). Zwrócono uwagę na wpływ hipertermii, hipotermii oraz hiperglikemii na doświadczalne modele udaru. Niekorzystne oddziaływanie hipertermii na przebieg udaru niedokrwienego przedstawiono zarówno w warunkach doświadczalnych, jak i klinicznych. Hipotermia działa korzystnie w warunkach doświadczalnych, jednak nie ma jednoznacznych informacji na temat jej pozytywnego efektu w warunkach klinicznych⁽⁵⁵⁾. Hiper-glikemia wywiera negatywny wpływ na przebieg niedokrwienego udaru mózgu w warunkach doświadczalnych i klinicznych^(54,56). Ukształtowanie koła tętniczego mózgowia jest różne u poszczególnych gatunków ssaków. Odmienności dotyczą budowy gałęzi naczyniowych tętnicy szyjnej wewnętrznej oraz układu kręgowo-podstawnego⁽⁵⁷⁾ i muszą być uwzględniane przy planowaniu badań doświadczalnych na różnych gatunkach zwierząt.

U gryzoni występują bardzo silnie rozwinięte tętnice łączące tylne, co sprawia, że około 60% objętości krwi docierającej do mózgowia pochodzi z układu kręgowo-podstawnego^(30,57). Królik charakteryzuje się zrównoważonym typem budowy koła tętniczego mózgowia. Dalszy odcinek tętnicy tylnej mózgu powstaje z równomiernie ukształtowanego połączenia tętnicy łączącej tylnej i bliższego odcinka tętnicy tylnej mózgu. U ssaków kopytnych (na przykład owcy) w unaczynieniu mózgowia zaznacza się przewaga układu tętnic szyjnych wewnętrznych⁽⁵⁷⁾. U świni stwierdzono występowanie tak zwanej sieci dziwnej (łac. *rete mirabile*) zaopatrywanej w krew przez tętnicę gardłową wstępującą i tętnicę szyjną wewnętrzną, co znacznie utrudnia wywołanie niedokrwienia mózgowia⁽⁵⁸⁾. Myszoszko-czek oraz niektóre gatunki myszy charakteryzują się wyjątkowym ukształtowaniem układu tętniczego mózgowia. Zazwyczaj nie występują u nich tętnice łączące tylne, a tym samym nie można mówić o istnieniu koła tętniczego mózgowia^(59,60). Taki typ budowy układu naczyniowego może sprzyjać wytwarzaniu w warunkach doświadczalnych niedokrwienia w dorzeczu tętnicy szyjnej wewnętrznej lub układu kręgowo-podstawnego.

ROZBIEŻNOŚCI MIĘDZY WYNIKAMI BADAŃ DOŚWIADCZALNYCH I KLINICZNYCH

Chociaż różnorodne zwierzęce modele niedokrwienne odgrywają bardzo ważną rolę w zrozumieniu podstaw patofizjologii procesu niedokrwienia mózgowia, okazuje się, iż ich udział w badaniach nad nowymi lekami wykorzystywanymi w terapii

udarów niedokrwiennego jest zdecydowanie niezadowolająca^(61,62). Wykazano, że wyniki badań doświadczalnych w bardzo wielu przypadkach nie korespondują z wynikami uzyskanymi w trakcie badań klinicznych. Bardzo często pozytywne rezultaty badań nowych leków przeprowadzonych w warunkach doświadczeń na modelach zwierzęcych nie są potwierdzane w próbach klinicznych. Różnice między wynikami uzyskanymi w warunkach doświadczalnych i klinicznych mogą wynikać między innymi z wyboru nieodpowiedniego modelu doświadczalnego, niewłaściwej metody oceny wyników oraz błędnej interpretacji otrzymanych rezultatów.

Coraz częściej kwestionuje się znaczenie zwierzęcych modeli doświadczalnych w badaniach nad nowymi lekami, zwłaszcza o działaniu neuroprotektynym. Mimo to od wielu lat są one nieustannie badane. Przyczyny rozbieżności w wynikach badań doświadczalnych i klinicznych mogą wynikać z niewłaściwego doboru dawek leku. W badaniach klinicznych często stosuje się bardzo duże dawki leku, po których często ujawniają się niepożądane skutki, co wyklucza jego dalsze podawanie^(59,62). Szczególną rolę odgrywa tutaj również długość tak zwanego okna terapeutycznego, tj. czasu upływającego od momentu wystąpienia objawów u pacjenta do chwili podania leku. W warunkach doświadczalnych jest to okres od wywołania niedokrwienia do aplikacji badanego preparatu. W związku z tym należy planować badania w taki sposób, 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 lub wykorzystania takiego zwierzęcego modelu doświadczalnego, który będzie uwzględniał dłużej trwające procesy biochemiczne. Precyzyjne przestrzeganie wszystkich wymogów podczas planowania i przeprowadzania badań doświadczalnych na zwierzętach oraz dalszych badań w fazie klinicznej może pozwolić na uzyskanie wiarygodnych wyników, a co za tym idzie przyczynić się do wprowadzenia nowych środków terapeutycznych do praktyki klinicznej, w tym do leczenia udaru mózgu.

PODSUMOWANIE

Ostatnie lata przyniosły intensywny rozwój wiedzy na temat udaru niedokrwiennego mózgu. Jednocześnie obecne możliwości leczenia tego schorzenia nadal nie są wystarczająco satysfakcjonujące ani dla lekarzy, ani dla pacjentów. Najnowsze dane pochodzące z wielu ośrodków badawczych jednoznacznie wskazują, że szybko rozpoczęte leczenie udaru w połączeniu z zapobieganiem potencjalnym powikłaniom oraz wczesne zastosowanie wtórnej profilaktyki znacząco poprawia rokowanie i jakość życia chorych, którzy przeżyli udar mózgu. Podsumowując, należy przypuszczać, że mimo licznych zastrzeżeń i ograniczeń zwierzęce modele doświadczalne procesu niedokrwienia mózgowia pozostaną niezastąpionym narzędziem w badaniach podstawowych, dotyczących patomechanizmu samego zjawiska, jak również będą odgrywać istotną rolę w weryfikacji nowych terapii udaru mózgu.

PIŚMIENNICTWO:

BIBLIOGRAPHY:

1. Mettler F.A.: Neuroanatomy. Wyd. 2, Mosby, St. Louis 1948.
2. Andziak P.: Rozpoznanie i leczenie miażdżycowych zwojeń tętnicy szyjnej wewnętrznej. Pol. Przegl. Chir. 1993; 65: 287-294.
3. Szczudlik A.: Neuroprotekcja jako kierunek leczenia niedokrwienia mózgu. W: Śmiałowska M. (red.): Neuroprotekcja: XX Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN. Mogilany 2003; 99-105.
4. Bass E.: Cardiopulmonary arrest. Pathophysiology and neurologic complications. Ann. Intern. Med. 1985; 103: 920-927.
5. Foulkes M.A., Wolf P.A., Price T.R. i wsp.: The Stroke Data Bank: design, methods, and baseline characteristics. Stroke 1988; 19: 547-554.
6. Prusiński A., Domżał T.M., Kozubski W., Szczudlik A.: Niedokrwienne udary mózgu. α-Medica Press, Bielsko-Biała 1999.
7. Strosznajder J.B., Czernicki Z.: Mózg a niedokrwienie. Płatan, Kraków 2005.
8. Astrup J., Siesjö B.K., Symon L.: Thresholds in cerebral ischemia – the ischemic penumbra. Stroke 1981; 12: 723-725.
9. Katchanov J., Waeber C., Gertz K. i wsp.: Selective neuronal vulnerability following mild focal brain ischemia in the mouse. Brain Pathol. 2003; 13: 452-264.
10. Kim W.K., Ganca D., Jonakait G.M.: Inhibition of microglial CD40 expression by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is mediated by interleukin-10. J. Neuroimmunol. 2002; 126: 16-24.
11. Gabriel B., Trzeciak H.I.: Role of astrocytes in pathogenesis of ischemic brain injury. Neurotoxicity Res. 2001; 3: 205-221.
12. Markiewicz I., Lukomska B.: The role of astrocytes in the physiology and pathology of the central nervous system. Acta Neurobiol. Exp. 2006; 66: 343-358.
13. Trendelenburg G., Dirnagl U.: Neuroprotective role of astrocytes in cerebral ischemia: focus on ischemic preconditioning. Glia 2005; 50: 307-320.
14. Nedergaard M., Ransom B., Goldman S.A.: New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. Trends Neurosci. 2003; 26: 523-530.
15. Haydon P.G.: Neuroglial networks: neurons and glia talk to each other. Curr. Biol. 2000; 10: R712-R714.
16. Ullian E.M., Sapperstein S.K., Christopherson K.S., Barres B.A.: Control of synapse number by glia. Science 2001; 291: 657-661.
17. Villegas S.N., Poletta F.A., Carri N.G.: A reassessment based on novel data on the developing and mature central nervous system. Cell Biol. Int. 2003; 27: 599-609.
18. Clarkson A.N., Sutherland B.A., Appleton I.: The biology and pathology of hypoxia-ischemia: an update. Arch. Immunol. Ther. Exp. 2005; 53: 213-225.
19. De Simoni M.G., Milia P., Barba M. i wsp.: The inflammatory response in cerebral ischemia: focus on cytokines in stroke patients. Clin. Exp. Hypertens. 2002; 24: 535-542.
20. González-Scarano F., Baltuch G.: Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. Annu. Rev. Neurosci. 1999; 22: 219-240.
21. Minami M., Katayama T., Satoh M.: Brain cytokines and chemokines: roles in ischemic injury and pain. J. Pharmacol. Sci. 2006; 100: 461-470.
22. Minghetti L., Levi G.: Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanooids and nitric oxide. Prog. Neurobiol. 1998; 54: 99-125.
23. Ridet J.L., Malhotra S.K., Privat A., Gage F.H.: Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. Trends Neurosci. 1997; 20: 570-577.
24. Stoll G.: Inflammatory cytokines in the nervous system: multifunctional mediators in autoimmunity and cerebral ischemia. Rev. Neurol. 2002; 158: 887-891.

25. Hossmann K.A.: Cerebral ischemia: models, methods and outcomes. *Neuropharmacology* 2008; 55: 257-270.
26. Hossmann K.A.: Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2006; 26: 1057-1083.
27. Traystman R.J.: Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR J.* 2003; 44: 85-95.
28. Durukan A., Tatlisumak T.: Ischemic stroke in mice and rats. *Methods Mol. Biol.* 2009; 573: 95-114.
29. 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.
30. Hossmann K.A.: Experimental models for the investigation of brain ischemia. *Cardiovasc. Res.* 1998; 39: 106-120.
31. 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.
32. Hossmann V., Hossmann K.A.: Return of neuronal functions after prolonged cardiac arrest. *Brain Res.* 1973; 60: 423-438.
33. Korpatchev W.G., Sysenkov S.P., Thieliz P.S.: Modelirowanie klinicznej smerti i postreanimatiznoy belezni u krys. *Patol. Fiziol. Eksp. Ter.* 1982; 3: 78-80.
34. 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.
35. Barone F.C., Knudsen D.J., Nelson A.H. i wsp.: Mouse strain differences in susceptibility to cerebral ischemia are related to cerebral vascular anatomy. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1993; 13: 683-692.
36. Mitsufuji N., Yoshioka H., Okano S. i wsp.: A new model of transient cerebral ischemia in neonatal rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1996; 16: 237-243.
37. 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 Neurol. Scand.* 1970; 46: 187-202.
38. Pulsinelli W.A., Brierley J.B.: A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 1979; 10: 267-272.
39. Kriegelstein G., Kriegelstein J., Urban W.: Long survival time of an isolated perfused rat brain. *J. Neurochem.* 1972; 19: 885-886.
40. Koizumi J., Yoshida Y., Nakazawa T., Ooneda G.: Experimental studies of ischemic brain edema. I. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn. J. Stroke* 1986; 8: 1-8.
41. Longa E.Z., Wejnstein P.R., Carlson S., Cummins R.: Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989; 20: 84-91.
42. Connolly E.S. Jr, Winfree C.J., Stern D.M. i wsp.: Procedural and strain-related variables significantly affect outcome in a murine model of focal cerebral ischemia. *Neurosurgery* 1996; 38: 523-532.
43. O'Brien M.D., Waltz A.G.: Transorbital approach for occluding the middle cerebral artery without craniectomy. *Stroke* 1973; 4: 201-206.
44. 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.
45. Lauer K.K., Shen H., Stein E.A. i wsp.: Focal cerebral ischemia in rats produced by intracarotid embolization with viscosilicone. *Neurol. Res.* 2002; 24: 181-190.
46. Purdy P.D., Devous M.D., Batjer H.H. i wsp.: Microfibrillary collagen model of canine cerebral infarction. *Stroke* 1989; 20: 1361-1367.
47. Yang Y., Yang T., Lj Q. i wsp.: 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.
48. Watson B.D., Dietrich W.D., Busto R. i wsp.: Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann. Neurol.* 1985; 17: 497-504.
49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR).* *Stroke* 1999; 30: 2752-2758.
54. Green R.A., Odegren T., Ashwood T.: Animal models of stroke: do they have value for discovering neuroprotective agents? *Trends Pharmacol. Sci.* 2003; 24: 402-408.
55. Paschen W.: Regional quantitative determination of lactate in brain sections. A bioluminescent approach. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1985; 5: 609-612.
56. 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.
57. Goetzen B.: Atlas unaczynienia wewnętrznego mózgowia człowieka i zwierząt doświadczalnych. *Anatomia: opisowa, topograficzna, porównawcza i patologiczna.* Ossolineum, Wrocław 1996: 17-30.
58. 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.
59. 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.
60. 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.
61. 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.
62. Kaste M.: Use of animal models has not contributed to development of acute stroke therapies: pro. *Stroke* 2005; 36: 2323-2324.