

Sukcesy i porażki badań nad neuroprotekcją w udarze niedokrwiennym mózgu

Neuroprotection in ischemic stroke – successes and fails

Anna Członkowska^{1,2}, Dagmara Mirowska-Guzel^{1,2}, Andrzej Członkowski²

¹III Klinika Neurologiczna, Instytut Psychiatrii i Neurologii w Warszawie

²Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej, Akademia Medyczna w Warszawie

Neuropsychiatria i Neuropsychologia 2007; 2, 2: 66–70

Adres do korespondencji:

prof. dr hab. med. Anna Członkowska, II Klinika Neurologiczna, Instytut Psychiatrii i Neurologii, ul. Sobieskiego 9, 02-957 Warszawa, tel. +48 22 842 76 83, faks +48 22 842 40 23, e-mail: czlonkow@ipin.edu.pl

Streszczenie

Ze względu na społeczne obciążenie związane z udarem niedokrwiennym mózgu, nadal poszukuje się skutecznych i bezpiecznych form farmakoterapii. Choć wprowadzenie leczenia trombolitycznego stanowiło istotny postęp, to stosowanie tej formy terapii jest możliwe u niewielu chorych. Ogromne nadzieje budzą natomiast leki neuroprotektyjne, których koncepcja działania oparta jest o procesy związane z niedokrwieniem i śmiercią komórek. Mimo przeprowadzenia ogromnej liczby badań doświadczalnych, z zastosowaniem ponad 1000 substancji o działaniu neuroprotektyjnym, zaledwie w przypadku kilku z nich można było przeprowadzić badania z udziałem ludzi. Żaden lek nie został jednak wprowadzony na rynek, ze względu na brak udowodnionej skuteczności lub toksyczność. W 1999 r. opublikowano rekomendacje STAIR (*Stroke Therapy Academic Industry Roundtable*) mające na celu poprawienie metodologii badań eksperymentalnych. Mimo że lek NXY-059 (disufenton) spełniał wszystkie kryteria STAIR i początkowo budził nadzieje na zmniejszenie niesprawności u chorych po udarze niedokrwiennym mózgu, to w trakcie wieloosrodkowych badań klinicznych z randomizacją, przeprowadzonych na potrzeby rejestracji nie udało się wykazać jego skuteczności.

Słowa kluczowe: udar niedokrwienny mózgu, badania eksperymentalne, badania kliniczne, leczenie neuroprotektyjne

Abstract

Ischemic stroke is the leading medical cause of mortality and neurological disability in adult population. Large progress was made by introducing recombinant tissue activator (rt-PA) but according to very strict inclusion criteria, its use is limited to small number of patients. Effective, well-tolerated treatments are needed to decrease disability and improve patients' prognosis. The idea of neuroprotective agent is that it interferes with mechanisms involved in ischemic cascade. Fine results obtained with neuroprotectants in models of ischemia are not reproducible in clinical trials. To improve quality of experimental studies, STAIR (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable) introduced recommendations for preclinical drug testing. NXY-059 was the only drug which fulfilled the STAIR recommendation and much was expected with its use. However the results of large, randomized clinical trials were very disappointed and up till now no neuroprotective drug has been introduced to the market.

Key words: ischemic stroke, experimental studies, clinical trials, neuroprotection

Wstęp

Udar mózgu jest nadal jedną z najważniejszych przyczyn umieralności i niesprawności osób w podeszłym wieku. Na świecie odnotowuje się ok. 15 mln przypadków udarów rocznie, ponad 1/3 pacjentów umiera, a ok. 40% pozostaje

niesprawnych (Millan i Davos 2006; *Stroke Unit Trialist's Collaboration* 1997).

Okolo 85% przypadków udaru jest wynikiem niedokrwienia mózgu, rozwijającego się w wyniku zamknięcia dużego naczynia mózgowego przez zakrzep albo zator, lub zaburzeń przepływu w małych tętnicach przeszywających,

co prowadzi do ograniczonego krążenia krwi w określonym obszarze, oraz niedostatecznej podaży tlenu i substancji odżywczych (Green i Shuaib 2006). W Polsce odnotowuje się ok. 60 tys. nowych przypadków udaru rocznie. Chociaż częstość występowania jest zbliżona do obserwowanej w innych krajach europejskich, to jednak śmiertelność pozostaje nadal wyższa. Wydaje się, że różnica ta nie wynika z odmienności stosowanej farmakoterapii, a raczej z warunków opieki nad chorym z udarem mózgu i postępowania ogólnomedycznego. Wyniki badań wskazują, że poprawa jakości opieki medycznej wydaje się być głównym czynnikiem, który może zmniejszyć śmiertelność w grupie chorych z udarem mózgu (Leira i wsp. 2006).

W Polsce okresowo są publikowane wytyczne grupy ekspertów Narodowego Programu Profilaktyki i Leczenia Udaru Mózgu, dotyczące postępowania w udarze mózgu, w tym organizacji oddziałów udarowych, rehabilitacji i farmakoterapii (*Rekomendacje* 1999 i 2003).

Farmakoterapia

Postępowanie farmakologiczne w udarze niedokrwiennym obejmuje kilka elementów:

- terapię ostrej fazy udaru, zapobiegającą stopniowemu pogarszaniu się stanu neurologicznego,
- profilaktykę pierwotną i wtórną,
- leczenie objawowe prowadzone w celu zmniejszenia ryzyka powikłań.

Badania nowych leków w udarze niedokrwiennym prowadzone są w dwóch kierunkach. Pierwszy z nich to działania mające na celu przywrócenie krążenia w miejscu niedokrwienia (reperfuzja), drugi – zapobieganie niekorzystnym zmianom biochemicznym związanym z kaskadą niedokrwinną (neuroprotekcja) (Green i Shuaib 2006).

Przez wiele lat jedynym lekiem o udokumentowanym w badaniach klinicznych działaniu oraz powszechnie stosowanym w leczeniu udaru niedokrwiennego mózgu był kwas acetylosalicylowy. Należy jednak podkreślić, że chociaż jest to lek dość bezpieczny i może być stosowany u większości chorych z udarem, jednak jego skuteczność jest ograniczona (Adams i wsp. 2007). Znaczącą zmianą w farmakoterapii udaru niedokrwiennego mózgu było zarejestrowanie w 1996 r. przez *Food and Drug Administration* (FDA) alteplazy – preparatu rekombinowanego tkankowego aktywatora plazminogenu (rt-PA) (NINDS 1995). W Europie alteplazę zarejestrowano

w 2002 r., z zastrzeżeniem jej stosowania przez wykwalifikowane ośrodki. W ostatnich badaniach wykazano jednak, że rt-PA jest lekiem bezpiecznym i do 3 godz. od wystąpienia objawów udaru może być rutynowo stosowany nawet przez mniej doświadczonych ośrodków (Wahlgren i wsp. 2007), choć nadal jest to możliwe tylko w przypadku niewielkiego odsetka chorych (w zależności od ośrodka 1–8,5%). Ograniczenia są wynikiem wąskiego okna terapeutycznego, konieczności wykonania badania tomografii komputerowej przed leczeniem oraz istotnego ryzyka ukwrotocnienia ogniska niedokrwinnego. Trwają więc poszukiwania skutecznych, bezpiecznych i możliwych do powszechnego stosowania metod farmakoterapii. Wysiłki te są podejmowane nie tylko w celu poprawy warunków leczenia i zmniejszenia śmiertelności, ale także ograniczenia niesprawności poudarowej. Szczególne nadzieje budzi neuroprotekcja.

Leczenie neuroprotekcyjne

Badania nad substancjami o działaniu neuroprotekcyjnym w udarze niedokrwiennym mózgu rozpoczęły się już w latach 50., były prowadzone w następnych dziesięcioleciach i są kontynuowane. Początkowo były to badania kliniczne, mające teoretyczne podstawy, dopiero w kolejnych latach wymagania etyczne i naukowe sprawiły, że badania z udziałem ludzi musiały być poprzedzone rzetelnymi badaniami doświadczalnymi (O'Collins i wsp. 2006). Dla wielu substancji przebadanych na zwierzętach udawało się uzyskać efekt neuroprotekcyjny, który nawet jeżeli był niewielki, prowadził do badań klinicznych. W ostatnich latach liczba badań eksperymentalnych lawinowo wzrosła – od kilkudziesięciu przeprowadzonych w latach 70., do 800–900 pod koniec lat 90. W tym czasie w ciągu roku toczyło się kilkanaście badań klinicznych (O'Collins i wsp. 2006). Tylko w 2004 r. w trakcie oceny przedklinicznej i klinicznej w różnych chorobach (w tym w niedokrwieniu ośrodkowego układu nerwowego) było 511 substancji o działaniu neuroprotekcyjnym (Kwon i wsp. 2004). Przykłady substancji o różnych mechanizmach działania neuroprotekcyjnego przedstawiono w tab. 1. Dotychczas przeprowadzono badania eksperymentalne z zastosowaniem ponad 1000 substancji o działaniu neuroprotekcyjnym. Okazało się jednak, że w badaniach klinicznych nie udaje się wykazać skuteczności, co więcej – często dawki stosowane u ludzi okazują się toksyczne. Żadnego z badanych leków nie udało się wprowadzić na rynek. W związku

Tabela 1. Przykłady substancji o różnych mechanizmach działania neuroprotekcynowego

Mechanizm działania	Przykłady substancji
modulacja czynności kanałów jonowych	riluzol, lubeluzol, nimodypina, fosfenytoina
agoniści receptora 5-HT _{1A}	repinotan
antagoniści receptorów NMDA	aptiganel, selfotel
agoniści GABA	diazepam, klometiazol
antagoniści receptorów AMPA	NBQX, YM872
zmiatanie wolnych rodników	PBN, NXY-059, edaravone
stabilizacja błon komórkowych	citicolina
działanie przeciwzapalne	enlimomab, rekombinowany czynnik hamujący neutrofile, LeukArrest
zmniejszenie obrzęku mózgu	mannitol, glicerol

z tym podejmowane są wysiłki w celu wyjaśnienia tego zjawiska i poprawienia metodologii badań prowadzonych na zwierzętach. Dlaczego badania eksperymentalne zawodzą? Należy pamiętać, że pacjenci z udarem niedokrwinnym mózgu stanowią bardzo różnorodną grupę w aspekcie mechanizmów prowadzących do niedokrwienia (zakrzep, zator) i lokalizacji ogniska (półkula mózgu, mózdzek, pień mózgu). Ponadto chorzy z udarem to zwykle osoby starsze, dodatkowo obciążone wieloma czynnikami ryzyka, m.in. cukrzycą, nadciśnieniem, chorobą niedokrwinną serca (Muir i Teal 2005). Wydaje się, że doświadczalne modele niedokrwienia, których istnieje przynajmniej kilka, w tym 3 podstawowe – model niedokrwienia ogniskowego i globalnego oraz niedokrwienie uzyskiwane w modelach hodowli komórkowej, nie odzwierciedlają niedokrwienia w ośrodkowym układzie nerwowym u człowieka. Z punktu widzenia wszystkich procesów toczących się w ognisku niedokrwinnym, najbliższy rzeczywistości wydaje się być model niedokrwienia ogniskowego (Hunter i wsp. 1998), ale nadal wiele badań jest przeprowadzanych z wykorzystaniem innych modeli. Wydaje się też, że zwierzęta doświadczalne często nie odzwierciedlają populacji osób z udarem niedokrwinnym (pod względem wieku, płci, czynników ryzyka i chorób towarzyszących). Innym problemem jest fakt, że badania na zwierzętach nie są randomizowane, prowadzone metodą otwartej próby, wybrane punkty końcowe badania eksperymentalnego nie są znaczące w badaniu klinicznym, a uzyskane wyniki charakteryzują się niską powtarzalnością (Rothwell 2005). Bardzo istotnym ograniczeniem wyników badań doświadczalnych jest fakt, że w badaniach klinicznych najistotniejszym punktem końcowym jest stan neurologiczny i funkcjonalny chorych, podczas gdy ocena wyników

badania doświadczalnych prowadzona jest głównie na podstawie zmniejszenia ogniska niedokrwienia (Wahlgren i wsp. 2007). Niestety, wielkość niedokrwienia nie wskazuje, jaki odsetek neuronów nadal funkcjonuje prawidłowo oraz które z nich są zaprogramowane na śmierć w późniejszym czasie (Gladstone i wsp. 2002). Możliwość osiągnięcia sukcesu w badaniach klinicznych ograniczona jest dobozem dawki leku. Zdarza się, że dawka wystarczająca do uzyskania efektu neuroprotekcynowego jest toksyczna dla człowieka (Green i wsp. 2003). Dodatkowo czas, który mija od pierwszych objawów niedokrwienia u człowieka do diagnozy i możliwości podania leku, jest znacznie dłuższy niż okno terapeutyczne substancji stosowanych w badaniach doświadczalnych. Oczywiście, za niepowodzenia badań klinicznych nie można winić tylko nieodpowiedniej metodyki badań przedklinicznych. Trzeba pamiętać także o dodatkowych czynnikach, takich jak zbyt mały efekt terapeutyczny leku, niewłaściwy dobór pacjentów czy nieodpowiednie, mało czułe testy statystyczne służące do przeprowadzenia analiz (van der Worp i wsp. 2005). W celu poprawy metodologii badań już na etapie przedklinicznym, grupa *Stroke Therapy Academic Industry Roundtable* (STAIR) opublikowała w 1999 r. wytyczne, których spełnianie ma na celu przybliżenie modeli doświadczalnych do warunków klinicznych (STAIR 1998; STAIR II 2001; Fisher 2003). Zgodnie z zawartymi wskazówkami substancja kandydująca na lek neuroprotekcynowy powinna zostać przebadana zarówno na gryzoniach, jak i na naczelnych (np. marmosetach) w modelu niedokrwienia ogniskowego, a punktem końcowym, oprócz pomiaru wielkości samego ogniska, powinien być stan funkcjonalny zwierząt. Wymagane jest określenie najlepszej, a jednocześnie łatwej drogi podawania leku (nie dokomorowo czy dokanałowo), prze-

Tabela 2. Jakość danych w *Udarowej skali doświadczalnej* (opracowano na podstawie O'Collins i wsp. 2006)

Lp.	Dane	Opis
1	wymogi laboratoryjne	model ogniskowego niedokrwienia przebadany co najmniej w 2 niezależnych laboratoriach
2	gatunki zwierząt	model niedokrwienia ogniskowego przebadany na 2 lub więcej gatunkach zwierząt
3	warunki zdrowotne zwierząt doświadczalnych	model niedokrwienia ogniskowego przebadany u zwierząt starych lub dodatkowo obciążonych (np. cukrzycą, nadciśnieniem tętniczym)
4	pleć zwierząt doświadczalnych	model niedokrwienia ogniskowego przebadany zarówno u samców, jak i samic
5	reperfuzja	modele czasowego i trwałego ogniskowego niedokrwienia
6	okno terapeutyczne	podanie leku co najmniej w godzinę po wywołaniu niedokrwienia
7	dawka	co najmniej 2 dawki leku przebadane w modelu ogniskowego niedokrwienia
8	droga podania	optymalna, a jednocześnie łatwa do wykorzystania w warunkach klinicznych
9	punkty końcowe	ocena danych histologicznych (wielkość ogniska) i czynnościowych
10	efekt odległy	efekty oceniane co najmniej 4 tyg. po wywołaniu niedokrwienia ogniskowego

prowadzenie badań toksykologicznych, badań określających minimalną i optymalną skuteczną dawkę oraz określenie okna terapeutycznego (STAIR 1998; STAIR II 2001). Podsumowanie wytycznych przedstawiono w tab. 2. Za spełnienie każdego z 10 kryteriów substancja może uzyskać 1 punkt. Skala STAIR ułatwia podjęcie decyzji o dopuszczeniu leku do badań klinicznych.

Jednym z leków budzących w ostatnich latach największe nadzieje naukowców i lekarzy był disulfenton (NXY-059), który został dokładnie przebadany w eksperymentalnych modelach niedokrwienia, uzyskując 10 punktów w skali STAIR. NXY-059 jest pochodną nitronową, mającą zdolność zmiatania wolnych rodników (Green i wsp. 2003). Jego właściwości neuroprotektoryjne wykazano początkowo w badaniach przeprowadzonych na gryzoniach w modelu czasowego i utrwalonego ogniskowego niedokrwienia (czasowe i trwałe zamknięcie tętnicy środkowej mózgu), a następnie potwierdzono w badaniach na naczelnych (Shuaib 2006a, 2006b). Jest to główna odmienność w porównaniu z innymi substancjami pretendującymi do miana skutecznych leków neuroprotektoryjnych w udarze niedokrwiennym mózgu, z zastosowaniem których wcześniej prowadzono badania w modelach zwierzęcych. Marmosety zostały wybrane ze względu na podobieństwo filogenetyczne ich ośrodkowego układu nerwowego do mózgu człowieka oraz ze względu na większy od innych zwierząt stosunek masy mózgu do reszty ciała (Marshall i Ridley 2006). U obu przebadanych gatunków NXY-059 zmniejszał objętość ogniska niedokrwienia oraz zmniejszał niesprawność. Efekt ten osiągnano przy stosowaniu preparatu w oknie terapeutycznym (6 godz.), któ-

re można uzyskać w warunkach klinicznych. NXY-059 pierwszy osiągnął – z badanych do tej pory potencjalnych leków neuroprotektoryjnych – maksymalną liczbę punktów w skali STAIR i przeszedł do badań klinicznych. W 2006 r. w *New England Journal of Medicine* opublikowano wyniki pierwszego z nich (*Stroke-Acute Ischemic NXY Treatment – SAINT I*), przeprowadzonego z randomizacją, metodą podwójnie ślepej próby, kontrolowanego grupą *placebo*. Uczestniczyło w nim 1722 chorych z ostrym udarem niedokrwiennym mózgu, losowo przypisanych do grupy *placebo* lub grupy otrzymującej NXY-059, podawany w ciągu 6 godz. od wystąpienia pierwszych objawów niedokrwienia (Lees i wsp. 2006). W końcowej analizie przeprowadzonej na 1699 chorych okazało się, że NXY-59 istotnie statystycznie poprawił sprawność pacjentów, ocenianą za pomocą skali Rankin w ciągu 90 dni od zachorowania ($p=0,038$). Zarówno śmiertelność, jak i częstość występowania działań niepożądanych nie różniły się między grupami. Nie odnotowano także różnic w skali neurologicznej Narodowego Instytutu Zdrowia (*National Institute of Health Stroke Scale – NIHSS*) ani w skali oceniającej zdolność do wykonywania czynności dnia codziennego (skala Barthel). Bardzo interesujące było natomiast zmniejszenie ryzyka ukrwotoczenia ogniska niedokrwienego w grupie chorych otrzymujących jednocześnie z NXY-059 leczenie trombolityczne ($p=0,036$). W związku z uzyskaniem pozytywnych wyników, zdecydowano się na przeprowadzenie kolejnego badania, które pozwoliłoby na potwierdzenie skuteczności leku i jego rejestrację. Niestety, wyniki opublikowane w 2007 r. okazały się być całkowicie rozczarowujące. W tym drugim badaniu (SAINT II),

w którym wzięło udział 3306 pacjentów, nie udało się potwierdzić żadnego z wcześniej uzyskanych pozytywnych rezultatów (Shuaib i wsp. 2007; Savitz i Fisher 2007).

Podsumowanie

Idealny lek neuroprotekcyny powinien zmniejszać niesprawność poudarową i poprawiać stan neurologiczny chorych, mieć niewiele działań niepożądanych i być łatwy w podawaniu w wystarczająco szerokim oknie terapeutycznym. Mimo wielu badań nie udało się dotychczas znaleźć żadnej substancji, która spełniałaby te kryteria. Choć w teorii efekt neuroprotekcyny wydaje się być łatwy do osiągnięcia, nadal nie wprowadzono na rynek żadnego leku o takim mechanizmie działania. Ostatnie doświadczenia z NXY-059 pokazały, że nawet pierwotnie obiecujące wyniki nie gwarantują osiągnięcia sukcesu. Wizja rutynowego stosowania neuroprotekcji w udarze niedokrwienym mózgu nadal pozostaje odległą.

Piśmiennictwo

1. Adams HP, del Zoppo G, Alberts MJ, et al. Guidelines for the early management of adults with ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, and the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease and Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Groups: the American Academy of Neurology affirms the value of this guideline as an educational tool for neurologists. *Stroke* 2007; 38: 1655-1711.
2. Fisher M; Stroke Therapy Academic Industry Roundtable. Recommendations for advancing development of acute stroke therapies: Stroke Therapy Academic Industry Roundtable 3. *Stroke* 2003; 34: 1539-1546.
3. Gladstone DJ, Black SE, Hakim AM; Heart and Stroke Foundation of Ontario Centre of Excellence in Stroke Recovery. Toward wisdom from failure: lessons from neuroprotective stroke trials and new therapeutic directions. *Stroke* 2002; 33: 2123-2136.
4. Green AR, Ashwood T, Odergren T, Jackson DM. Nitrones as neuroprotective agents in cerebral ischemia, with particular reference to NXY-059. *Pharmacol Therapeut* 2003; 100: 195-214.
5. Green AR, Shuaib A. Therapeutic strategies for the treatment of stroke. *Drug Discov Today* 2006; 11: 681-693.
6. Hunter AJ, Mackay KB, Rogers DC. To what extent have functional studies of ischemia in animals been useful in the assessment of potential neuroprotective agents? *Trend Pharmacol Sci* 1998; 19: 59-66.
7. Kwon MO, Fischer F, Matthisson M, Herrling P. List of drugs in development for neurodegenerative diseases. *Neurodegenerative Dis* 2004; 1: 113-152.
8. Lees KR, Zivin JA, Ashwood T, et al. NXY-059 for acute ischemic stroke. *New Engl J Med* 2006; 354: 588-600.
9. Leira R, Blanco M, Rodríguez-Yáñez M, et al. Non-pharmacological neuroprotection: role of emergency stroke management. *Cerebrovasc Dis* 2006; 21 Suppl 2: 89-98.
10. Marshall JW, Ridley RM. Assessment of functional impairment following permanent middle cerebral artery occlusion in a non-human primate species. *Neurodegeneration* 1996; 5: 275-286.
11. Millan M, Davalos A. The need for new therapies for acute ischaemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2006; 22 (Suppl 1): 3-9.
12. Muir KW, Teal PA. Why have neuro-protectants failed?: lessons learned from stroke trials. *J Neurol* 2005; 252: 1011-1020.
13. NINDS rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischaemic stroke. *New Engl J Med* 1995; 333: 1581-1587.
14. O'Collins VE, Macleod MR, Donnan GA, et al. 1,026 Experimental treatments in acute stroke. *Ann Neurol* 2006; 59: 467-477.
15. Rekomendacje Zespołu Ekspertów Narodowego Programu Profilaktyki i Leczenia Udaru Mózgu. Postępowanie w ostrym udarze mózgu. *Neurol Neurochir Pol* 1999; supl. 4: 13-61.
16. Rekomendacje Zespołu Ekspertów Narodowego Programu Profilaktyki i Leczenia Udaru Mózgu. Organizacja oddziałów udarowych i profilaktyka udaru. *Neurol Neurochir Pol* 2003; supl. 6: 1-40.
17. Rothwell PM. Clinical trials are too often founded on poor quality pre-clinical research. *J Neurol* 2005; 252: 1115.
18. Savitz SI, Fisher M. Future of neuroprotection for acute stroke: in the aftermath of the SAINT trials. *Ann Neurol* 2007; 61: 396-402.
19. Shuaib A. Neuroprotection – STAIR-Way to the future? *Cerebrovasc Dis* 2006; 22 (suppl. 1): 10-17.
20. Shuaib A, Lees KR, Lyden P, et al. NXY-059 for the treatment of acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2007; 357: 562-571.
21. Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR). Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke* 1998; 30: 2752-2758.
22. Stroke Therapy Academic Industry Roundtable II (STAIR-II). Recommendations for clinical trial evaluation of acute stroke therapies. *Stroke* 2001; 32: 1598-1606.
23. Stroke Unit Trialist's Collaboration. How do stroke units improve patient outcome? A collaborative systematic review of the randomized trials. *Stroke* 1997; 28: 2139-2144.
24. Wahlgren N, Ahmed N, Davalos A, et al. Thrombolysis with alteplase for acute ischemic stroke in the Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-Monitoring Study (SITS-MOST): an observational study. *Lancet* 2007; 369: 275-282.
25. van der Worp HB, de Haan P, Morrema E, Kalkman CJ. Methodological quality of animal studies on neuroprotection in focal cerebral ischaemia. *J Neurol* 2005; 1108-1114.