

PENGUNAAN MENCIT DAN TIKUS SEBAGAI HEWAN MODEL PENYAKIT STROKE

Putri Reno Intan^{1*}, Ariyani Noviantari¹

¹ Pusat Riset Biomedis, Organisasi Riset Kesehatan, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN). *Cibinong Science Center*

Jl. Raya Jakarta-Bogor Km.46 Cibinong Bogor, Jawa Barat 16911

*Email: putrirenointan111@gmail.com

ABSTRAK

Stroke adalah terputusnya aliran darah ke otak akibat pecahnya pembuluh darah ke otak. Stroke terjadi karena tersumbatnya pembuluh darah ke otak sehingga pasokan nutrisi dan oksigen ke otak berkurang. Dalam pengobatan stroke, penelitian terus dikembangkan, baik uji in vitro, in vivo, sampai uji klinik. Pada uji in vivo, dibutuhkan hewan model yang sesuai dengan patogenesis penyakit sehingga mendapat gambaran yang terjadi pada manusia. Tujuan penulisan artikel ini adalah mengkaji berbagai metode yang digunakan dalam pembuatan hewan model penyakit stroke pada mencit dan tikus. Artikel ini merupakan review literatur melalui penelusuran pustaka yang didapatkan dari internet tentang berbagai metode dalam pembuatan hewan model penyakit stroke pada mencit dan tikus, serta kelebihan, dan kekurangan masing-masing metode tersebut. Beberapa model pembuatan hewan coba penyakit stroke adalah model embolik, model intraluminal ilament middle cerebral artery occlusion (MCAO), model fototrombosis, induksi endothelin-1, model kraniotomi, dan lain-lain. Pemilihan model hewan stroke yang tepat diharapkan dapat mengoptimalkan desain studi uji in vivo di laboratorium.

Kata kunci: hewan model, in vivo, mencit, stroke, tikus

PENDAHULUAN

Stroke adalah gejala klinis fokal atau global yang berkembang dengan cepat berupa gangguan fungsi otak yang berlangsung lebih dari 24 jam atau menyebabkan kematian, tanpa penyebab yang jelas selain karena berasal dari vaskular (Coupland dkk., 2017). Menurut laporan Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2013, prevalensi stroke di Indonesia berdasarkan diagnosis tenaga kesehatan sebesar tujuh per 1000 orang penduduk dan yang terdiagnosis oleh tenaga kesehatan atau gejala sebesar 12,1 per 1000 orang penduduk pada tahun 2013 dan meningkat pada tahun 2018 yaitu menjadi 10,9 per 1000 orang penduduk menurut diagnosis dokter. Jadi sebanyak 57,9% penyakit stroke telah terdiagnosis oleh tenaga kesehatan, dan terlihat meningkat seiring dengan peningkatan umur responden, serta prevalensinya sama banyak pada laki-laki dan perempuan (Kemenkes, 2013; Kemenkes RI, 2018).

Pada sebagian besar kejadian stroke dapat disebabkan oleh oklusi sementara dan permanen dari pembuluh darah yang keduanya diikuti dengan kejadian infark otak. Faktor risiko dominan penderita stroke di Indonesia adalah umur yang semakin meningkat, penyakit jantung koroner, diabetes melitus, hipertensi, dan gagal jantung. Stroke sudah muncul pada kelompok usia muda (15-24 tahun) sebesar 0,3%, demikian juga di negara lain (Ghani dkk., 2016).

Penelitian eksperimental dengan menggunakan berbagai macam hewan model penting dilakukan dalam memahami berbagai aspek yang berkaitan dengan patofisiologi selama fase stroke. Kejadian stroke dapat disebabkan antara lain oleh oklusi *transient* dan *permanent*. Salah satu cara membuat oklusi adalah dengan memasukkan benang filamen ke dalam *interna carotis artery* (ICA) sehingga akan mengoklusi *middle cerebral artery* (MCA) (Howells dkk., 2010). Rodensia banyak digunakan dalam pembuatan *middle cerebral artery occlusion* (MCAO) karena lebih *reproducible* dan model yang sesuai dengan kasus cerebral iskemik pada manusia. MCAO pada tikus menyebabkan area yang bersifat *focal cerebral ischemic* yang diikuti dengan kejadian infark (Tamura dkk., 1981; Bederson dkk., 1986) 3 animals were perfused with carbon black and 8 with a FAM fixative (40% formaldehyde, glacial acetic acid, and methanol).

Dalam tahapan penelitian praklinis, pemilihan model stroke yang tepat merupakan hal yang sangat penting karena variasi stroke pada manusia sangat beragam sehingga sangat sulit untuk mendapatkan model stroke yang sangat menyerupai kondisi pada manusia. Hal ini tergantung pada spesies hewan percobaan dan metode induksi stroke, ukuran, tingkat keparahan dan lokasi infark. Misalnya, beberapa teknik melibatkan prosedur seperti *craniectomy* yang dapat mengakibatkan trauma pada tengkorak, dan tidak mungkin terjadi secara spontan pada manusia. Sehingga pemilihan metode induksi stroke perlu dipilih yang paling dekat kemiripannya pada kejadian di manusia.

Penelitian menggunakan hewan banyak memberikan manfaat mengenai pemahaman patofisiologi stroke, dan beberapa spesies hewan seperti mencit, tikus, kelinci dan primata (*nonhuman primates*; NHP) telah digunakan sebagai model untuk mempelajari stroke. Perlu diketahui sejauh mana hewan model stroke menyerupai kondisi pada manusia. Rodensia (tikus dan mencit) paling banyak digunakan karena harganya yang relatif lebih murah dan anatomi sirkulasi *cranial* mirip dengan manusia, tingkat keparahan, durasi, dan lokasi oklusi dapat dikontrol.

Pembuatan hewan model dilakukan untuk mendeteksi kelainan yang terjadi pada otak setelah kejadian stroke, sampai dengan penelitian yang bersifat neuroprotektif untuk memperkecil kematian sel dan volume infark pasca stroke. Studi praklinis menggunakan hewan model memiliki peran utama dalam pemahaman mengenai patofisiologi dan pemilihan terapi stroke. Selama beberapa dekade terakhir, dilakukan pengembangan hewan model stroke yang menyerupai stroke pada manusia. Pada kajian ini akan dibahas beberapa metode pembuatan hewan model stroke menggunakan tikus dan mencit.

METODE

Artikel ini merupakan review literatur tentang berbagai metode dalam pembuatan hewan model penyakit stroke pada mencit dan tikus, serta kelebihan dan kekurangan dari masing-masing metode tersebut. Literatur diperoleh dari berbagai sumber yang telah dipublikasi. Bahan referensi didapatkan dari sumber internet berupa jurnal, buku, laporan penelitian dari dalam dan luar negeri.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Stroke

Berdasarkan *World Health Organization* (WHO), stroke adalah gangguan fungsional susunan saraf (otak) akibat dari gangguan aliran darah di otak dan tidak disebabkan trauma atau tumor di otak (Setyopranoto, 2011). Penyakit ini termasuk penyakit serebrovaskuler dengan berkurangnya aliran darah dan oksigen ke otak dan menyebabkan kematian sel saraf karena pecahnya pembuluh darah ke otak (stroke hemoragik) atau adanya penyumbatan pembuluh darah ke otak (stroke iskemik) (Harukuni dan Bhardwaj, 2006). Stroke akut terjadi setelah 24 jam pertama dari kejadian stroke (Wittenauer dan Smith, 2012).

Stroke menyebabkan kerusakan pada sel saraf, astrosit, oligodendrosit, dan sel endotelial. Stroke juga menyebabkan terganggunya saraf sensorik, motorik, dan kemampuan kognitif pasien. Penyakit ini adalah penyakit yang fatal dan mematikan karena tidak ada obat sampai saat ini. Transplantasi menggunakan sel punca mulai dilakukan untuk mengembalikan fungsi otak setelah terjadi stroke (Ferroni dkk., 2012). Terdapat 3 jenis stroke, yaitu stroke iskemik, stroke hemoragik, dan *transient ischaemic attack* (TIA) (Corbyn, 2014).

a. Stroke Iskemik

Stroke iskemik adalah jenis stroke yang terjadi karena adanya penyumbatan arteri menuju otak oleh gumpalan darah atau penumpukan lemak. Stroke ini paling umum dan cenderung berakibat fatal yang disebabkan oleh trombosis atau emboli. Gejala stroke ini bervariasi tergantung pada lokasi oklusi. Jenis stroke ini dibedakan menjadi 2, yaitu *atherosclerotic ischemic stroke* dan *embolic ischemic stroke*. *Atherosclerotic ischemic stroke* sering terjadi pada lansia yang berlangsung tanpa gejala. Sedangkan *embolic ischemic stroke* terjadi pada pasien penyakit jantung rematik, atrial fibrilasi, ateroma arteri, dan infark miokard. Emboli dapat menyebabkan pendarahan kecil di sekitar obstruksi (Wittenauer dan Smith, 2012).

b. Stroke hemoragik

Stroke hemoragik disebabkan pembuluh darah di otak pecah secara spontan karena adanya hipertensi yang tidak terkontrol dan dapat berakibat fatal. Namun, stroke ini jarang terjadi dibandingkan stroke iskemik. Ada 2 jenis stroke hemoragik, yaitu stroke hemoragik akibat pendarahan intraserebral sekunder yang menyebabkan hipertensi, *angiopathy amyloid cerebral*, atau penyakit arteri degeneratif, dan stroke hemoragik akibat perdarahan *subarachnoid* yang disebabkan oleh pecahnya *aneurisma*. Faktor risiko pendarahan utama pada lansia adalah konsumsi alkohol (tingkat berat) dan hipertensi, sedangkan pada penduduk usia muda pendarahan biasanya terjadi karena penyalahgunaan kokain (Wittenauer dan Smith, 2012).

c. *Transient ischaemic attack* (TIA)

TIA atau '*mini-stroke*' terjadi karena aliran darah ke otak terganggu yang berlangsung kurang dari 5 menit, setelah itu gejala menghilang.

Jenis jenis metode induksi stroke

Banyak jenis hewan telah dikembangkan untuk mempelajari patofisiologi penyakit stroke. Penggunaan hewan model bertujuan agar hasil penelitian dapat diprediksi dan *reproducible*. Beberapa metode hewan model penyakit stroke pada tikus dan mencit adalah sebagai berikut:

Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO)

Intraluminal *filament model of middle cerebral artery occlusion* (MCAO) adalah metode yang paling banyak digunakan untuk induksi stroke. Hal ini dikarenakan model ini menghasilkan persamaan pada penumbra dan *reproducible* infark yang sama pada manusia (Clark dkk., 1997). Kelemahan model dan metode ini adalah terjadinya perluasan kerusakan jaringan di otak. Di beberapa penelitian, kerusakan meluas ke *thalamus*, *substantia nigra* dan hipokampus (Steele dkk., 2008) even after 2 days of reperfusion. Sixty minutes fMCAO followed by 2 hours reperfusion resulted in extensive cell damage in the inner nuclear (>30%

MCA sangat rentan terhadap kejadian iskemik dan oklusi pada manusia, dan 70% kejadian menyebabkan kecacatan. Metode ini paling banyak digunakan pada tikus dan mencit (Bogousslavsky dkk., 1988; Howells dkk., 2010). Metode MCAO bersifat invasif yang minimal, pembuatan oklusi pada arteri karotis dengan memasukkan benang yang bertujuan menghambat aliran darah ke MCA. Lama oklusi untuk menginduksi terjadinya infark pada umumnya selama 60 atau 90 menit atau secara permanen, dan memiliki tingkat keberhasilan 88-100% pada tikus dan mencit (Liu dkk., 2009) our review of literature shows that the infarct variation coefficient of commonly performed stroke models ranges from 5% to 200%. An overall improvement of the commonly used stroke models will further improve the quality for experimental stroke research as well as inter-lab comparability. Many factors play a significant role in causing outcome variation; however, they have not yet been adequately addressed in the Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR

Galur tikus yang paling umum digunakan pada uji praklinis adalah galur Sprague-Dawley, yang memiliki volume infark lebih kecil (O'Collins dkk., 2017). Sementara galur mencit yang paling sering digunakan untuk metode ini adalah *C57BL/6* dan *SV129*. Reprodusibilitas teknik ini tergantung pada banyak faktor, seperti galur hewan, diameter jahitan, berat badan dan umur. Kelebihan dari metode ini adalah mirip dengan stroke iskemik pada manusia dan menghasilkan area penumbra yang sama (Connolly dkk., 1996). Metode MCAO sesuai untuk menghasilkan stroke iskemik dan berkaitan dengan gambaran klinis seperti kematian sel, inflamasi serebral dan kerusakan *blood brain barrier* (BBB) (Kaur dkk., 2019).

Teknik pembuatan model ini diawali dengan memberikan anestesi inhalasi kombinasi 3% *isoflurane* dan oksigen. Suhu tubuh selama prosedur operasi diukur menggunakan *thermometer* dan dijaga antara $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ menggunakan *warm pad*. *Cerebral blood flow* (CBF) diukur bilateral di kedua hemispher menggunakan Laser-Doppler flowmeter optic probe. Probe pada hemisphere kontralateral bertujuan untuk mengetahui adanya

subarachnoid hemorrhage setelah benang dimasukkan. Jika aliran darah turun sebesar 50% hanya pada bagian *ipsilateral hemisphere* maka dikatakan terjadi iskemia (Habib dkk., 2020) despite the reperfusion modalities thrombolysis and thrombectomy. Post-ischemic brain damage is aggravated by an excessive inflammatory cascade involving the activation and regulation of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18 by inflammasomes. However, the role of AIM2 and NLRC4 inflammasomes and the influence of the neuroprotective steroids 17 β -estradiol (E2, tetapi jika aliran darah menurun pada kedua hemisphere menandakan terjadinya ruptur pada arteri diikuti hemoragi pada otak sehingga hewan ini tidak dapat diikuti sebagai hewan percobaan. Sayatan dibuat pada garis tengah leher sepanjang 3 cm dan *common carotid artery (CCA)* kiri dan *nervus vagus* dipisahkan dari arteri. Kemudian dibuat lubang kecil pada dinding CCA menggunakan gunting kecil. Benang berlapis silikon dimasukkan perlahan ke dalam *arteri karotis interna* sampai MCA tersumbat, dan penurunan mendadak nilai CBF (lebih dari 50%) diamati di ipsilateral. Benang MCAO difiksir menggunakan *microclip*. Kondisi ini dipertahankan selama 1 jam, dan aliran darah diamati dan dicatat setiap 10 menit selama oklusi. Kemudian benang dikeluarkan secara perlahan dari *interna carotis artery (ICA)*. Langkah bedah yang sama dilakukan pada kelompok kontrol kecuali untuk penyisipan benang di MCA (Khassafi dkk., 2022).

Craniotomy

Metode ini menggunakan prosedur pembedahan untuk menginduksi oklusi di arteri. Pada teknik ini, penurunan neurologis dapat diinduksi pada mencit dengan *electrocoagulation* yang menyebabkan kerusakan permanen atau mikroaneurisma sampai aliran darah terganggu. Perbedaan volume infark tergantung pada jenis oklusi permanen atau sementara (Popa-Wagner dkk., 1999; Sugimori dkk., 2004). Spesies hewan yang paling banyak digunakan pada metode ini adalah tikus galur *P12 CB-17* (Tsuiji dkk., 2013) such as cerebral palsy and epilepsy. Currently, the rodent models of neonatal stroke that are available exhibit significant inter-animal variability, which makes it difficult to accurately assess the mechanisms of brain injury and the efficacy of candidate treatments. We aimed to introduce a novel, highly reproducible model of stroke, middle cerebral artery occlusion (MCAO).

Kelebihan metode ini terdapat pada ukuran infark yang dapat direproduksi dan penurunan fungsi neurologis, penurunan mortalitas dan visual. Sementara kelemahan metode ini adalah sangat invasif, dapat menyebabkan komplikasi saat prosedur bedah serta membutuhkan ketrampilan bedah.

Teknik pembuatan model ini diawali dengan memberikan sedasi isoflurane (3%), kemudian dianestesi. Hewan difiksasi menggunakan alat *stereotaxic*. Saturasi oksigen diukur menggunakan *oximeter* dan pengukuran suhu tubuh dijaga pada suhu 37,3°C $\pm$ 0,2°C. Sayatan *midsagittal* 2.5 cm dibuat menggunakan scalpel dan dipreparasi sampai tampak tulang tengkorak. Diameter dan lokasi lubang pada cranium tergantung pada tujuan penelitian. Tulang yang paling mudah diakses adalah tulang *parietal*. Pengeboran tulang dilakukan di bawah mikroskop menggunakan *micro drill bit* (0.7 mm) sampai menemukan dura atau sampai dengan potongan tulang di tengah kraniotomi menjadi longgar. Terdapat

2 macam teknik untuk mengekspose jaringan otak. Pertama menjaga dura tetap utuh, kemudian ditipiskan menggunakan jarum kecil. Kedua, merusak dura menggunakan jarum sehingga membentuk celah (Aboghazleh dkk., 2022) making them vulnerable for injury. In addition, they are uniquely characterized with the blood-brain barrier, and an extra caution is required during procedures that involve engagement of cerebral vessels (i.e., craniotomy).

Photo-thrombosis model

Cerebral venous sinus thrombosis (CVST) adalah tromboemboli vena yang jarang terjadi, hanya 1% dari kejadian stroke yang mengakibatkan kerusakan parenkim otak (Bourrienne dkk., 2022). CVST adalah lokasi yang jarang terjadi *thromboemboli vena* (VTE), merupakan penyebab stroke pada manusia dewasa muda (Ferro dkk., 2017). Teknik pembuatan model ini diawali dengan memberikan anestesi dan difiksasi pada alat *stereotaxic*. Lokasi iradiasi dipusatkan 1 mm lateral dan posterior kanan ke *bregma* pada tengkorak. Segera setelah injeksi pewarna fotokimia *Rose Bengal* (20 mg/kg) melalui vena ekor, mencit disinari green light pada 540 nm melalui lokasi iradiasi pada diameter 2 mm selama 2 menit. *Laser speckle contrast imaging system* (Pericam PSI HD system, Stockholm, Sweden) digunakan untuk merekam perubahan aliran darah cortical in vivo. Selama perlakuan, status pernapasan dikontrol dan suhu tubuh dijaga pada 37,5°C dengan bantal pemanas (Yao dkk., 2022).

Model Endothelin-1

Endotelin-1 adalah *peptide long acting* yang bekerja vasokonstriktif melalui injeksi stereotaktis, atau diaplikasikan pada permukaan kortikal saja (Fluri dkk., 2015). Injeksi endotelin-1 menghasilkan penurunan signifikan pada aliran darah otak yang berlangsung lebih lama dan diikuti dengan reperfusi (Biernaskie dkk., 2001). Kelebihan model ini adalah tingkat kematian yang sangat rendah karena teknik yang kurang *invasive*. Tetapi endotelin-1 menginduksi astrositosis dan menyebabkan pertumbuhan aksonal sehingga dapat mengakibatkan salah interpretasi pada evaluasi perbaikan saraf pasca stroke (Uesugi dkk., 1998).

Teknik pembuatan model ini diawali dengan memberikan anestesi *isoflurane* (5% at 1 L/min) dan ditempatkan pada alat stereotaktis. ET-1 diinjeksikan pada motor cortex diarea kedua rostro-caudal: 0.5 dan 2.0 mm rostral dan 2.8 mm lateral bregma dan 1.5 mm di bawah permukaan otak (Syeda dkk., 2022).

Embolic stroke model

Kebanyakan kasus stroke iskemik pada manusia disebabkan karena oklusi arteri (paling sering pada MCA oleh trombus atau emboli). Oklusi emboli pada MCA dengan *clot* darah autologous atau heterolog pada rodensia, merupakan salah satu metode untuk memodelkan fokal dan *multifocal* serebral iskemia, dan menyerupai patogenesis stroke iskemik pada manusia (Chuang dkk., 2018). Bentuk emboli pada metode ini berupa *microsphere*, *macrospere* dan *thromboembolic*. Model *microsphere* dengan pemberian emboli berbentuk bola berdiameter 20-50 μm ke dalam sistem sirkulasi menggunakan mikrokateeter untuk membentuk infark multifokal (Hossmann, 2008). Emboli bentuk

Macrospheres berdiameter 100-400 μm yang dimasukkan ke dalam *intracerebral artery* (ICA) untuk menghasilkan lesio yang dapat direproduksi di MCA (Gerriets dkk., 2003).

Model oklusi tromboemboli dari MCA pada tikus dikembangkan menggunakan injeksi trombin langsung ke dalam lumen MCA, dan menghasilkan clot/bekuan darah. Volume infark tergantung pada ukuran bekuan yang terbentuk. Kekurangan metode ini adalah sangat invasif (*craniotomy*) dan pembentukan bekuan darah yang tidak terstandar sehingga menurunkan reproduktibilitas infark pada otak, serta keterbatasan dalam pengamatan neurologi/sensimotor karena lokasi dan ukuran infark yang kecil (Niessen dkk., 2003; the middle cerebral artery was occluded by intracarotid injection of fibrin-rich clots, prepared either according to established methods by adding thrombin to freshly drawn arterial blood or by spontaneous coagulation. The mechanical properties of clots were determined in vitro by elasticity and plasticity tests. One hour after embolism, thrombolysis was started by intra-arterial application of recombinant tissue plasminogen activator (rtPAMacRae, 2011).

Teknik pembuatan model ini diawali dengan memberikan anestesi dengan injeksi intraperitoneal 6% chloral hydrate (300 mg/kg). Dibuat sayatan pada garis tengah sepanjang 2 cm di permukaan anterior leher tikus, *common carotid artery* (CCA) kiri diisolasi dan diikat menggunakan benang silk 4.0. *external carotid artery* (ECA) kiri dan *internal carotid artery* (ICA) dipisahkan dari dasar tengkorak, *pterygopalatine artery* (PPA) diligasi. Dibuat sayatan kecil di CCA berjarak 2 mm distal dari bifurkasio. Kateter dimasukkan ke dalam ICA melalui sayatan di CCA pada jarak 14-18 mm dari bifurkasi CCA. sebanyak 400 μL darah arteri diambil menggunakan syringe yang berisi 50 μL larutan tromboplastin dan 50 μL 0,025 M CaCl_2 , kemudian dibilas menggunakan larutan 0.9% NaCl. Darah dalam syringe dihomogenkan, dan setelah 20 menit, terbentuk 100 μL clot kemudian diinjeksikan melalui kateter melalui lumen ICA sampai mencapai lokasi yang diinginkan (Ostrova *et al.*, 2021).

KESIMPULAN

Beberapa metode pembuatan hewan coba penyakit stroke adalah model embolik, *model intraluminal filament, middle cerebral artery occlusion* (MCAO), model fototrombosis, induksi endothelin-1, model kraniotomi, dan lain-lain. Pemilihan model hewan stroke yang tepat diharapkan dapat mengoptimalkan desain studi uji *in vivo* di laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Aboghazleh, R., Alkahmous, B., Swissa, E., Mansoor, S., Friedman, A., & Prager, O. (2022). Craniotomy for acute monitoring of pial vessels in the rodent brain. *MethodsX* 9, 101694. doi: 10.1016/j.mex.2022.101694.
- Arkeliuss, K., Vivien, D., Orset, C., & Ansar, S. (2020). Validation of a stroke model in rat compatible with rt-PA-induced thrombolysis: new hope for successful translation to the clinic. *Scientific Reports*, 10(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41598-020-69081-0.
- Bederson, J. B., Pitts, L. H., Tsuji, M., Nishimura, M. C., Davis, R. L., & Bartkowski,

- H. (1986). Rat middle cerebral artery occlusion: Evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*, 17(3), pp. 472–476. doi: 10.1161/01.STR.17.3.472.
- Biernaskie, J., Corbett, D., Peeling, J., Wells, J., & Lei, H. (2001). A serial MR study of cerebral blood flow changes and lesion development following endothelin-1-induced ischemia in rats. *Magnetic Resonance in Medicine*, 46(4), 827–830. doi: 10.1002/mrm.1263.
- Bogousslavsky, J., Melle, G. Van and Regli, F. (1988). The lausanne stroke registry: Analysis of 1,000 consecutive patients with first stroke. *Stroke*, pp.1083–1092. doi: 10.1161/01.STR.19.9.1083.
- Bourrienne, M. C., Gay, J., Mazighi, M., & Ajzenberg, N. (2022). State of the art in cerebral venous sinus thrombosis animal models. (July), 1–10. doi: 10.1111/jth.15816.
- Chuang, B. T., Liu, X., Lundberg, A. J., Toung, T. J., Ulatowski, J. A., & Koehler, R. C. (2018). Refinement of embolic stroke model in rats: Effect of post-embolization anesthesia duration on arterial blood pressure, cerebral edema and mortality. *Journal of Neuroscience Methods*, 307, 8–13. doi: 10.1016/j.jneumeth.2018.06.012.
- Clark, W., Lessov, N., Dixon, M., & Eckenstein, F. (1997) Monofilament intraluminal middle cerebral artery occlusion in the mouse. *Neurological Research*, 19(6), 641–648. doi: 10.1080/01616412.1997.11740874.
- Connolly, E. S., Winfree, C. J., Stern, D. M., Stern, D. M., Solomon, R. A., & Pinsky, D. J. (1996). Procedural and strain-related variables significantly affect outcome in a murine model of focal cerebral ischemia. *Neurosurgery*, 38(3), 523–532. doi: 10.1097/00006123-199603000-00021.
- Corbyn, Z. (2014). Statistics: A growing global burden. *Nature*, 510 (7506 SUPPL.), 5–6. doi: 10.1038/510S2a.
- Coupland, A. P., Thapar, A., Qureshi, M. I., Jenkins, H., & Davies, A. H. (2017). The definition of stroke. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 110(1), 9–12. doi: 10.1177/0141076816680121.
- Ferro, J. M., Boussier, M. G., Canhão, P., Coutinho, J. M., Crassard, I., Dentali, F., ... & European Stroke Organization. (2017). European Stroke Organization guideline for the diagnosis and treatment of cerebral venous thrombosis – Endorsed by the European Academy of Neurology. *European Stroke Journal*, 2(3), 195–221. doi: 10.1177/2396987317719364.
- Ferroni, L., Gardin, C., Tocco, I., Epis, R., Casadei, A., Vindigni, V., ... & Zavan, B. (2012). Potential for Neural Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Mesenchymal stem cells-basics and clinical application* 1, 89-115.
- Fluri, F., Schuhmann, M. K. and Kleinschnitz, C. (2015). Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 3445–3454. doi: 10.2147/DDDT.S56071.
- Gerriets, T., Li, F., Silva, M. D., Meng, X., Brevard, M., Sotak, C. H., & Fisher, M. (2003).

- The macrosphere model: Evaluation of a new stroke model for permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *Journal of Neuroscience Methods*, 122(2), 201–211. doi: 10.1016/S0165-0270(02)00322-9.
- Ghani, L., Mihardja, L. K. and Delima, D. (2016). Faktor Risiko Dominan Penderita Stroke di Indonesia. *Buletin Penelitian Kesehatan*, 44(1), 49–58. doi: 10.22435/bpk.v44i1.4949.49-58.
- Habib, P., Harms, J., Zendedel, A., Beyer, C., & Slowik, A. (2020). Gonadal hormones E2 and p mitigate cerebral ischemia-induced upregulation of the AIM2 and NLRC4 inflammasomes in rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(13), 1–24. doi: 10.3390/ijms21134795.
- Harukuni, I. and Bhardwaj, A. (2006). Mechanisms of Brain Injury after Global Cerebral Ischemia. *Neurologic Clinics*, 24, 1–21. doi: 10.1016/j.ncl.2005.10.004.
- Hossmann, K. A. (2008). Cerebral ischemia: Models, methods and outcomes. *Neuropharmacology*, 55(3), pp. 257–270. doi: 10.1016/j.neuropharm.2007.12.004.
- Howells, D. W., Porritt, M. J., Rewell, S. S., O'collins, V., Sena, E. S., Van Der Worp, H. B., ... & Macleod, M. R. (2010). Different strokes for different folks: The rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 30(8), 1412–1431. doi: 10.1038/jcbfm.2010.66.
- Ismail Setyopranoto (2011). Stroke : Gejala dan Penatalaksanaan. *Cermin Dunia Kedokteran*, 38(4), 247–250.
- Kaur, H., Sarmah, D., Kalia, K., Borah, A., Dave, K. R., Yavagal, D. R., & Bhattacharya, P. (2019). Animal models of ischemic stroke. *Application of Biomedical Engineering in Neuroscience*, 41–50. doi: 10.1007/978-981-13-7142-4_2.
- Kemenkes (2013) *Laporan hasil riset kesehatan dasar (Riskesdas) 2013*. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
- Kemenkes RI (2018). Hasil Riset Kesehatan Dasar Tahun 2018. *Kementrian Kesehatan RI*, 53(9), 1689–1699.
- Khassafi, N., Zahraei, Z., Vahidinia, Z., Karimian, M., & Azami Tameh, A. (2022). Calcitriol Pretreatment Attenuates Glutamate Neurotoxicity by Regulating NMDAR and CYP46A1 Gene Expression in Rats Subjected to Transient Middle Cerebral Artery Occlusion. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 81(4), 252–259. doi: 10.1093/jnen/nlac011.
- Kretz, C. A., Vaezzadeh, N. and Gross, P. L. (2010). Tissue factor and thrombosis models. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(5), 900–908. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.177477.
- Liu, S., Zhen, G., Meloni, B. P., Campbell, K., & Winn, H. R. (2009). Rodent Stroke Model Guidelines for Pre-clinical Stroke Trials (1st edition). *Journal of Experimental Stroke & Translational Medicine*, 02(02), 2–27. doi: 10.4172/1939-067x.1000108.
- MacRae, I. (2011). Preclinical stroke research - Advantages and disadvantages of the

- most common rodent models of focal ischaemia. *British Journal of Pharmacology*, 164(4), 1062–1078. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01398.x.
- Niessen, F., Hilger, T., Hoehn, M., & Hossmann, K. A. (2003). Differences in clot preparation determine outcome of recombinant tissue plasminogen activator treatment in experimental thromboembolic stroke. *Stroke*, 34(8), 2019–2024. doi: 10.1161/01.STR.0000080941.73934.30.
- O'Collins, V. E., Donnan, G. A., Macleod, M. R., & Howells, D. W. (2017). *Animal Models of Ischemic Stroke Versus Clinical Stroke: Comparison of Infarct Size, Cause, Location, Study Design, and Efficacy of Experimental Therapies, Animal Models for the Study of Human Disease: Second Edition*. doi: 10.1016/B978-0-12-809468-6.00020-6.
- Orset, C., Macrez, R., Young, A. R., Panthou, D., Angles-Cano, E., Maubert, E., ... & Vivien, D. (2007). Mouse model of in situ thromboembolic stroke and reperfusion. *Stroke*, 38(10), 2771–2778. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.487520.
- Ostrova, I. V., Kalabushev, S. N., Ryzhkov, I. A., & Tsokolaeva, Z. I. (2021). A novel thromboplastin-based rat model of ischemic stroke. *Brain Sciences*, 11(11), 1–10. doi: 10.3390/brainsci11111475.
- Overgaard, K., Sereghy, T., Boysen, G., Pedersen, H., Høyer, S., & Diemer, N. H. (1992). A rat model of reproducible cerebral infarction using thrombotic blood clot emboli', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 12(3), 484–490. doi: 10.1038/jcbfm.1992.66.
- Popa-Wagner, A., Schröder, E., Schmoll, H., Walker, L. C., & Kessler, C. (1999). Upregulation of MAP1B and MAP2 in the rat brain after middle cerebral artery occlusion: Effect of age. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 19(4), 425–434. doi: 10.1097/00004647-199904000-00008.
- Sommer, C. J. (2017). Ischemic stroke: experimental models and reality. *Acta Neuropathologica*, 133(2), 245–261. doi: 10.1007/s00401-017-1667-0.
- Steele, E. C., Guo, Q. and Namura, S. (2008). Filamentous middle cerebral artery occlusion causes ischemic damage to the retina in mice. *Stroke*, 39(7), 2099–2104. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.504357.
- Sugimori, H., Yao, H., Ooboshi, H., Ibayashi, S., & Iida, M.. (2004). Krypton laser-induced photothrombotic distal middle cerebral artery occlusion without craniectomy in mice. *Brain Research Protocols*, 13(3), 189–196. doi: 10.1016/j.brainresprot.2004.06.001.
- Syeda, W., Ermine, C. M., Khilf, M. S., Wright, D., Brait, V. H., Nithianantharajah, J., ... & Brodtmann, A. (2022). Brain communications long-term structural brain changes in adult rats after mild ischaemic stroke. *Brain Communications*, 4(4), 1–10. doi: 10.1093/braincomms/fcac185.
- Tamura, A., Graham, D. I., McCulloch, J., & Teasdale, G. M. (1981). Focal cerebral ischaemia in the rat: I. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *Journal of Cerebral Blood*

- Flow and Metabolism*, 1(1), 53–60. doi: 10.1038/jcbfm.1981.6.
- Tsuji, M., Ohshima, M., Taguchi, A., Kasahara, Y., Ikeda, T., & Matsuyama, T. (2013). A novel reproducible model of neonatal stroke in mice: Comparison with a hypoxia-ischemia model. *Experimental Neurology*, 247, 218–225. doi: 10.1016/j.expneurol.2013.04.015.
- Uesugi, M., Kasuya, Y., Hayashi, K., & Goto, K. (1998). SB209670, a potent endothelin receptor antagonist, prevents or delays axonal degeneration after spinal cord injury. *Brain Research*, 786 (1–2), 235–239. doi: 10.1016/S0006-8993(97)01431-5.
- Watson, B. D., Dietrich, W. D., Busto, R., Wachtel, M. S., & Ginsberg, M. D. (1985). Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Annals of Neurology*, 17(5), 497–504. doi: 10.1002/ana.410170513.
- Wittenauer, B. R. and Smith, L. (2012). *Priority Medicines for Europe and the World. A Public Health Approach to Innovation Update on 2004 Background Paper Written by Eduardo Sabaté and Sunil Wimalaratna Background Paper 6 . 6 Ischaemic and Haemorrhagic Stroke.*
- Yao, M., Luo, Y., Li, H., Liao, S., & Yu, J. (2022). LncRNA TUG1 contributes post-stroke NLRP3. pp. 1–22.