

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE TÎRGU MUREȘ
ȘCOALA DE STUDII DOCTORALE

TÎRGU MUREȘ 2018



UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
TÎRGU MUREȘ

TEZĂ DE DOCTORAT

Markeri imunologici în accidentele vasculare cerebrale ischemice

Doctorand **Adina Goanță (Huțanu)**

Conducător de doctorat Prof. Dr. **Minodora Dobreanu**



Pagină liberă

*“Lucrurile nu sunt greu de făcut.
Greu este să te pui în stare de a le face”
Constantin Brâncuși*

Pagină liberă

LISTA DE PUBLICAȚII

Lucrări științifice publicate în reviste cotate ISI cu factor de impact

1. A Tero-Vescan, S Vancea, **A Huțanu**, R Borka-Balás, M Dobreanu. Concordance and controversy in determining the Omega-3 index in plasma and red blood cells membrane. *Farmacia* 2015; 63(4):504-509. IF=1.348
2. **Adina Huțanu**, Smaranda Maier, Rodica Bălașa, Oana Roxana Oprea, Ștefan Barbu, Septimiu Voidăzan, Minodora Dobreanu. Plasma phosphorylated neurofilament heavy chains as a potential marker for ischemic stroke patients. *Revista Română de Medicină de Laborator* 2018; 26(1): 59-64. IF=0.400
3. **Adina Huțanu**, Mihaela Iancu, Rodica Bălașa, Smaranda Maier, Minodora Dobreanu. Predicting functional outcome of ischemic stroke patients in Romania based on plasma CRP, sTNFR-1, D-Dimers, NGAL and NSE measured using a biochip array. *Acta Pharmacologica Sinica* 2018; 39(7):1228-1236. IF=3.562
4. **Adina Huțanu**, Emoke Horvath, Alex Orădan, Septimiu Voidăzan, Liviu Chiriac, Daniela Muntean, Minodora Dobreanu. Fish-oil preconditioning modulates plasma MCP-1 and TIMP-1 levels after experimental induced transient cerebral ischemia. *Farmacia* 2018; 66(4):602-608. IF=1.507
5. Emőke Horváth, **Adina Hutanu**, Liviu Chiriac, Minodora Dobreanu, Alex Orădan, Előd-Ernő Nagy. Ischemic damage and early inflammatory infiltration are different in the core and penumbra lesions of rat brain after transient focal cerebral ischemia. *in press* 2018. *Journal of Neuroimmunology*. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2018.08.002. IF=2.655
6. **Adina Huțanu**, Mihaela Iancu, Minodora Dobreanu, Oana Oprea, Ștefan Barbu, Smaranda Maier, Amelia Tero-Vescan, Zoltan Bajko, Rodica Bălașa. Extended lipid profile in Romanian ischemic stroke patients in relationship with stroke severity and outcome: a path analysis model. *Acceptat pentru publicare în Archives of Medical Science*. IF=2.344

Lucrări științifice publicate în reviste cotate ISI fără factor de impact

7. Alex Orădan, **Adina Huțanu**, Emőke Horváth, Liviu Chiriac, Minodora Dobreanu. Improved rat stroke model by intraluminal middle cerebral artery occlusion: a special emphasis on surgical technique. *Health Problems of Civilization* 2017; 11(3):200-210. (autor corespondent)

CUPRINS

INTRODUCERE	17
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	19
1.Accidentele vasculare cerebrale ischemice	21
1.1. Epidemiologie	21
1.2. Clasificarea fiziopatologică a accidentelor vasculare cerebrale	21
1.2.1. Accidentele vasculare cerebrale ischemice	22
1.3. Fiziopatologia accidentelor vasculare cerebrale ischemice	24
1.3.1 Metabolismul cerebral	24
1.3.2 Cascada ischemică	24
1.3.3 Mecanisme protective endogene	25
1.4. Clasificarea biomarkerilor periferici	26
1.4.1.Markeri metabolici	26
1.4.2.Markeri de disfuncție endotelială	27
1.4.3.Markeri ai stresului oxidativ	28
1.4.4.Markeri inflamatori	29
1.4.5.Markeri de distrucție neuronală și a BHE	31
1.4.6.Markeri de hemostază și fibrinoliză	32
1.4.7.Chemokine și factori trofici	33
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	35
1. Ipoteza de lucru/obiective	37
2. Metodologie generală	37
3.Modelul experimental pentru studiul citokinelor periferice și a modificărilor morfologice și imunohistochimice induse de ischemia cerebrală, cu și fără precondiționare cu Omega 3 (studiul 1)	41
3.1. Introducere	41
3.2. Ipoteză/Obiective	43
3.3.Material și metodă	43
3.4. Rezultate	49
3.5. Discuții	57
3.6. Concluzii	61
4.Profilul lipidic extins și Indexul Omega3 la pacienții cu accidente vasculare cerebrale ischemice (studiul 2)	63

4.1. Introducere	63
4.2. Ipoteză/Obiective	64
4.3. Material și metodă	64
4.4. Rezultate	66
4.4.1. Analiza comparativă a profilului lipidic între pacienți și lotul martor	66
4.4.2. Relația dintre profilul lipidic și clasificarea AVC conform TOAST, respectiv severitatea ischemiei	70
4.4.3. Evaluarea profilului lipidic în relație cu mRS la externare	70
4.4.4. Evaluarea profilului lipidic în relație cu mRS la 3 luni	72
4.5. Discuții	74
4.6. Concluzii	76
5. Utilizarea tehnologiei Biochip Array în predicția gradului de dizabilitate după AVC ischemice (studiul 3)	79
5.1. Introducere	79
5.2. Ipoteză/Obiective	79
5.3. Material și metodă	80
5.4. Rezultate	82
5.4.2. Relația dintre biomarkei și severitatea ischemiei	83
5.4.2. Relația dintre biomarkerii analizași și mRS la 3 luni	83
5.5. Discuții	89
5.6. Concluzii	91
6. Analiza capacității de predicție a severității și evoluției post ischemice a unui panel de chemokine și factori neurotrofici	93
6.1. Introducere	93
6.2. Ipoteză/Obiective	94
6.3. Material și metodă	94
6.4. Rezultate	96
6.4.1. Comparatii ale distribuțiilor parametrilor la pacienti si lotul control	96
6.4.2. Relația dintre markerii de studiu și subtipurile de AVC conform clasificării TOAST	96
6.4.3. Evoluția în dinamică a valorilor parametrilor de studiu la pacienții cu AVC	97
6.4.4. Asocierea parametrilor de studiu cu severitatea ischemiei	97
6.4.5. Asocierea parametrilor de studiu cu mRS la 3 luni de la externare	99
6.4.6. Relația dintre parametrii de studiu și dependența funcțională (indexul Barthel ziua 5)	102
6.5. Discuții	105
6.6. Concluzii	108
7. Discuții generale	111
8. Concluzii (generale)	113

9. Originalitatea tezei	115
REFERINȚE	117
ANEXE	131

ABREVIERI UTILIZATE ÎN TEXT

ADA-American Diabetes Association

AHA/ASA-American Heart Association/ American Stroke Association

AIT-accident ischemic tranzitor

AKT-Protein kinase B

ALT-alanin aminotransferaza

AST-aspartat aminotransferaza

AT-aterotrombotic

ATP-adenozin trifosfat

AVC-accident vascular cerebral

BAT-biochip array technology

Bcl2/Bax-B-cell lymphoma 2/ BCL2 Associated X Apoptosis Regulator

BDNF-Brain derived neurotrophic factor

BHE-bariera hemato-encefalică

CCD-charge-coupled camera

CD-cluster of differentiation

CE-cardio-embolic

CFI-comparative fit index

CIC-cardiopatie ischemică cronică

COX-ciclooxigenaza

CRP-proteina C reactivă

DAB-diaminobenzidina

DALY-ani de adaptare la viața cu dizabilitate

DAMP-Damage-associated molecular pattern

DG-girusul dentat

DHA-docosahexaenoic acid

DTR-discrete test region

DZ-diabet zaharat

EDTA-Ethylenediaminetetraacetic acid
EPA-eicosapentaenoic acid
Erk1-extracellular signal-regulated kinases
FA-fibrilație atrială
FXIII-factorul XIII
GGT-gama-glutamil transpeptidaza
GPR120-G protein-coupled receptor 120
GPX-1-glutathion peroxidaza 1
HDL-lipoproteine cu densitate mare
HE-hematoxină-eozină
HO-1-hemoxigenaza-1
hsCRP-proteina C reactivă înalt sensibilă
HTA-hipertensiune arterială
IHC-imunohistochimie
IL-interleukina
JAK-Janus tyrosine Kinase
LC/MS-cromatografie lichidă/spectrometrie de masă
LDL-lipoproteine cu densitate mică
LOX-lipooxygenaza
MaR-maresine
MCAO-middle cerebral artery occlusion
MCP-1-Monocyte chemoattractant protein-1
MDA-malondialdehidă
MMP-matrix metaloproteinaza
MPO-mieloperoxidaza
mRNA-microARN
mRS-scala Rankin modificată (scala de apreciere a dizabilității pacientului vascular)
MUFA-acizi grași mononesaturați
NCAM-molecule de adeziune celule neurale
NfH, L, M-neurofilamente cu greutate moleculară mare, mică și medie
NF-κB-factorul nuclear κB
Nfr2-factorul nuclear derivat eritroid 2

NGAL-Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
NIHSS-National Institute of Health Stroke Scale
NMDA-N-methyl-D-aspartat
NPD1-neuroprotectina 1
NSE-enolaza neuron specifică
PAI-1-inhibitorul activatorului plasminogenului-1
PDGF-factorul de creștere derivat din plachete
PE-Phytoerythrin
PPARγ-Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma
PUFA-acizi grași polinesaturați
RANTES/CCL5-Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed, and Secreted/Chemokine ligand 5
RIP-Receptor Interacting Protein
RMN-Rezonanță Magnetică Nucleară
RMSEA-Root Mean Square Error of Approximation
ROS-specii reactive de oxigen
rtPA-activatorul tisular al plasminogenului recombinat
SFA-acizi grași saturați
sICAM-molecule de adeziune intercelulară
SOD-superoxid dismutaza
SPM-mediatorul specifici de limitare a inflamației
SRMR-standardized root mean square residual
STAT3-Signal transducer and activator of transcription 3
sTNFR-receptorul solubil al factorului de necroză tumorală
sVCAM-molecule solubile de adeziune vasculo-celulară
SVO-ocluzia vaselor mici
SVZ-zona subventriculară
TAd-tensiunea arterială diastolică
TAK1-Transforming growth factor beta-activated kinase 1
TAs-tensiunea arterială sistolică
Th-T helper

TIMP-1-inhibitorul tisular al metaloproteinazelor-1

TLI-Tuker-Lewis index

TLR-Toll Like receptor

TNF-factorul de necroză tumorală

TOAST-Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment

TRADD-TNFR1-associated death domain protein

TRAF2-Tumor necrosis factor receptor-associated factor

TTD-total tissue damage

TTDS-scorul de distrucție tisulară totală

VEGF-factorul de creștere endotelială vasculară

vWF-factorul von Willebrand

xMAP-Multi-Analyte Profiling

INTRODUCERE

Conform American Heart Association/American Stroke Association (AHA/ASA) accidentul vascular cerebral (AVC) este “un episod de disfuncție neurologică determinat de ischemia focală a creierului, măduvei spinării sau retinei”. În acest context, infarctul cerebral este definit ca prezența unor date evidente clinice, imagistice sau de altă natură pentru leziunea cerebrală ischemică, într-o zonă de distribuție vasculară definită, care persistă peste 24 ore sau evoluează spre deces, cu excluderea altor cauze [1].

În 2010 prevalența globală a AVC-urilor a fost de 33 milioane de cazuri, mai mult de jumătate dintre pacienți fiind la primul episod ischemic; dintre aceștia 5,2 milioane (31%) au fost persoane cu vârsta sub 65 de ani [2]. Incidența globală pentru AVC a fost de 11,6 milioane de evenimente pentru tipul ischemic și de 5,3 milioane de evenimente pentru tipul hemoragic, frecvența cea mai mare fiind în țările slab dezvoltate și în curs de dezvoltare. În țările bine dezvoltate s-a observat o reducere cu 13% a AVC ischemice și cu 19% a celor hemoragice, dar și a mortalității din această cauză (37%) [2], atât datorită posibilităților diagnostice și terapeutice dar și datorită unui mai bun control al factorilor de risc și a comorbidităților. Mortalitatea globală datorată AVC este considerată actualmente ca fiind a doua cauză de deces după infarctul miocardic acut (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>), în 2010 6,5 milioane de persoane decedând datorită acestei patologii (11,8% din totalul deceselor globale)[2].

În perioada 1990-2013 s-a constatat o creștere a incidenței AVC la persoanele tinere cu vârste cuprinse între 20-64 ani [3].

În România AVC reprezintă cea mai frecventă cauză de dizabilitate cu impact financiar negativ asupra bugetelor de sănătate, și a doua cea mai frecventă cauză de deces, cu 18% din totalul deceselor înregistrate în 2014, conform profilului de țară comunicat de Observatorul European pentru sănătate (<http://www.oecd.org/health/country-health-profiles-eu.htm>). În 2012, România se situa pe locul 5 în lume la mortalitatea post-AVC, cu un număr de 167 decese/100.000 locuitori pentru grupa de bărbați cu vârste între 35-74 ani și 97,3 decese/100.000 locuitori pentru femeile din aceeași grupă de vârstă [2].

AVC datorat întreruperii bruște a fluxului sanguin într-o regiune specifică și depleția glucozei și oxigenului, induce rapid o serie de modificări patologice care culminează cu necroza, apoptoza și moartea neuronală. Astfel, multiplele căi fiziopatologice care evoluează în cascadă în timpul episodului ischemic, deschid calea

spre o pleiadă de markeri periferici a căror investigare permite atât o înțelegere mai bună a mecanismelor fiziopatologice, dar și posibilitatea monitorizării terapiei, a identificării momentului apariției complicațiilor, sau identificarea pacienților cu predispoziție spre o evoluție nefavorabilă și cu deteriorare neurologică rapidă.

Datorită gradului mare de invaliditate post-AVC și a numărului mare de persoane îndepărtate din mediul activ, căutarea de noi terapii sau abordări preventive a devenit imperios necesară. La ora actuală, singurele tratamentele acceptate care reduc semnificativ suprafața țesutului nervos ischemiat, sunt tromboliza cu activatorul tisular recombinant al plasminogenului (rtPA), administrat într-un interval de 3-4,5 ore de la debut sau trombectomia mecanică. Studiile au arătat că anumiți biomarkeri periferici permit evaluarea riscului pacientului de a dezvolta o complicație hemoragică post-tromboliză, putând fi astfel utili în stabilirea eligibilității pentru instituirea terapiei trombolitice.

Până la momentul actual, nici un biomarker periferic nu a fost validat în scop diagnostic sau predictiv în ischemia cerebrală, făcând astfel utilă investigarea multiplelor posibilități oferite de tehnologia actuală. Tehnicile de laborator avansate permit acualmente multiplexarea și identificarea unui număr mare de analiți dintr-un volum redus de probă, oferind astfel posibilitatea caracterizării simultane a mai multor procese fiziopatologice prin prisma biomarkerilor periferici, aducând astfel plus valoare modelelor clinice de diagnostic și tratament.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. Accidentele vasculare cerebrale ischemice

1.1. Epidemiologie

La momentul actual, AVC constituie a doua cauză de deces la nivel mondial (11,8% din totalul deceselor [95% CI, 10,9–13,0%]), și a treia cauză de dizabilitate, evaluată prin anii de viață ajustați la dizabilitate (DALYs) (4,5% din totalul DALYs de toate cauzele [95% CI, 4,1–5,2]) [3].

În România, conform datelor Eurostat din 2017, AVC ocupă locul doi, după bolile cardiovasculare. Deși speranța de viață a crescut de la 71,2 ani în anul 2000, la 75 de ani în anul 2015, rămâne totuși cu 6 ani mai mică decât media europeană [4]. Împreună, bolile cardio-cerebro-vasculare au cauzat în 2014 în medie 951,3 decese la 100 000 de locuitori, de 2,5 ori mai mult comparativ cu media din UE [4].

Prezentarea la o unitate de specialitate în primele ore de la debutul simptomelor oferă mari șanse pacientului de a fi inclus în programul de terapie trombolitică cu rtPA, respectiv alteplaza (administrată i.v sau i.a) sau trombectomie. Administrarea terapiei trombolitice în fereastra terapeutică de până la 4,5 ore (administrarea la 3 ore asigurând beneficii superioare) duce la un prognostic bun al pacientului, indiferent de vârsta sau severitatea ischemiei [5]. Chiar și în condițiile respectării criteriilor de eligibilitate la includerea în terapia trombolitică, un număr mare de pacienți rămân cu prognostic nefavorabil, o serie de complicații putând să apară, precum hemoragia intracerebrală, edemul post-reperfuzie, angioedemul, pe lângă embolizarea secundară sau tromboliza inefficientă [6,7].

Astfel, o serie de markeri (individuali sau în panel) inflamatori, de distrucție a barierei hemato-encefalice (BHE), sau implicați în diverse alte procese fiziopatologice, ar putea oferi informații utile atât pentru un diagnostic de acuratețe în vederea orientării terapeutice rapide, dar și informații referitoare la apariția complicațiilor după recanalizare [8].

1.2. Clasificarea fiziopatologică a accidentelor vasculare cerebrale

Cele mai frecvente AVC sunt cele ischemice, reprezentând 87% din totalul acestora. Apar ca urmare a obstrucției unui vas de sânge, cu reducerea consecutivă a fluxului sanguin la nivel cerebral, sau ca urmare a unei stări de hipoperfuzie sistemică cu afectare cerebrală secundară. Pot fi consecința proceselor aterotrombotice prin

formarea plăcilor aterotrombotice și reducerea fluxului sanguin, sau embolice, ca urmare a formării unor emboli în circulația generală și migrarea acestora la nivel cerebral.

AVC hemoragice, deși mai reduse ca număr (13%), sunt mult mai severe, cu consecințe dramatice asupra țesutului cerebral. Se datorează în special hipertensiunii arteriale, a rupturii anevrismelor cerebrale sau a prezenței malformațiilor arterio-venoase netratate, care în timp duc la slăbirea pereților vasculari.

Accidentul ischemic tranzitor (AIT), este consecința întreruperii temporare a circulației sanguine la nivel cerebral; în aceste situații cauza este îndepărtată de organism prin propriile resurse, circulația fiind restabilită rapid, înainte ca leziunile cerebrale ireversibile să se dezvolte. Reprezintă un semnal de alarmă, fiind un factor predictiv pentru un AVC ulterior.

1.2.1. Accidentele vasculare cerebrale ischemice

Conform datelor furnizate de National Institute of Neurological Diseases and Stroke (NINDS), AVC pot fi ischemice atero-trombotice, cardioembolice și de altă natură, acestea din urmă însumând 3% din această patologie. Includerea în una din categoriile menționate se face pe baza datelor clinice și a investigațiilor imagistice, de multe ori identificarea mecanismului patogenetic rămânând neclar [9]. Un sindrom cerebral focal acut însoțit de disfuncție neurologică cu durată tranzitorie, în general mai mică de 1 oră și fără semne imagistice de infarct, este încadrat ca AIT [1].

AVC ischemice pot avea ca substrat mai multe mecanisme, acestea stând la baza clasificării TOAST (Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment) descrisă de Adams și colab. în 1993, utilizată în studii clinice [10], și care este folosită și astăzi pe larg, atât în studii epidemiologice cât și în cele intervenționale sau de evaluare a prognosticului [11].

Tipul aterotrombotic (AT) - ateroscleroza arterelor mari, intra- sau extracraniene; cu stenoza sau ocluzia acestora și reducerea consecutivă a fluxului sanguin distal (hipoperfuzie), sau desprinderea unui fragment embolic de la nivelul plăcii ateromatoase și migrarea acesteia distal (artery-to-artery embolism). În această ultimă situație embolii desprinși de la nivelul leziunilor ateromatoase duc la obstrucția arterelor indemne situate distal, stabilirea cauzei hemodinamice sau embolice în cazul afectării aterosclerotice a vaselor mari fiind dificilă [12]. Ateroscleroza vaselor mari, responsabilă de aproximativ 15 % din totalul AVC ischemice, cuprinde ateroscleroza carotidei comune, carotidei interne, externe sau a sistemului vertebro-bazilar; poate fi și asimptomatică, gradul de stenoză nefiind întodeauna în corelație cu gradul de ischemie. Toate aceste subtipuri cu diverse localizări, prezintă simptomatologie, riscuri și opțiuni terapeutice asemănătoare [13]. Pacienții prezintă semne clinice de ateroscleroză (cu stenoza >50% sau obstrucția

unei artere importante), cu factori de risc pentru ateroscleroză, sau boală aterosclerotică diagnosticată. Evaluarea imagistică (Doppler carotidian sau transcranian pentru analiza arterelor intracerebrale) este esențială pentru includerea în această categorie, în special în cazul pacienților cu embolizare secundară după ruptura plăcii ateromatoase [14].

Tipul cardioembolic (CE) - în cazul pacienților cu unul sau mai multe surse emboligene sau cu istoric de boală cardiacă. Leziunile cerebrale ischemice sunt similare cu cele din tipul AT, existența leziunilor cerebrale în regiuni vasculare multiple fiind sugestivă pentru tipul cardioembolic [14]. Cardioembolismul este poate cea mai frecventă cauză de AVC ischemic (70%), cu frecvența cea mai mare în teritoriul arterei cerebrale medii. Aparte de embolii produși ca urmare a patologiei aterosclerotice a arterelor mari descrisă anterior, în categoria cardioembolică sunt incluse cauzele embolice de origine cardiacă, fibrilația atrială, trombii atriali sau ventriculari stângi, flutter-ul atrial, fiind doar o parte dintre cauzele incriminate [12].

Tipul lacunar - este sugestiv la persoanele hipertensive, diabetice, care prezintă leziuni cerebrale de dimensiuni reduse și localizare cu predilecție la nivelul capsulei interne, a ganglionilor bazali sau la nivelul talamusului [14]. Sunt afectate arterele mici, arteriolele și capilarele de la nivel cerebral care nu depășesc 2 mm în diametru. În plus, lipsa semnelor imagistice de ateroscleroză, a surselor emboligene, precum și prezența sindromului lacunar sunt sugestive pentru lacunarismul cerebral [12].

Accidentele vasculare de cauze determinate, neobișnuite: în această categorie fiind incluse o serie de afecțiuni care pot duce la ischemia cerebrală (3-7% din cazuri). Dintre acestea, disecția de aortă, vasculitele cerebrale, stările de hipercoagulabilitate fiind printre cele mai frecvente [12].

AVC criptogenice sunt descrise în condițiile în care nu a putut fi determinată cauza, în ciuda investigării amănunțite a pacientului. Posibilele motive pentru încadrarea în această categorie ar fi: prezența comorbidităților cu prognostic rezervat, resurse limitate cu evaluarea incompletă a pacientului sau vârsta avansată. În plus, prezența mai multor etiologii posibile care pot concura la declanșarea AVC, mărește grupul etiologic de cauză nedeterminată [12,14].

1.3. Fiziopatologia accidentelor vasculare cerebrale ischemice

1.3.1 Metabolismul cerebral

Metabolismul fiziologic al creierului necesită aproximativ 20% din cantitatea de oxigen consumată de organism, energia eliberată fiind necesară pentru homeostazia ionică, sinteza și transportul neurotransmițătorilor și menținerea integrității celulare [15]. Substratul energetic necesar, respectiv ATP-ul, se formează preponderent în urma metabolizării glucozei; datorită capacității reduse de stocare a energiei, creierul are nevoie permanentă de materie primă (glucoză și oxigen) pentru menținerea homeostaziei [15].

La un adult tânăr, fluxul sanguin cerebral mediu este de aproximativ 46 ml/100g/min, de 4 ori mai mare la nivelul substanței cenușii comparativ cu substanța albă [15]. Există și o variație cu vârsta, valorile fiind scăzute la nou-născut, atingând maximum până la vârsta de 10 ani, ulterior valorile regresând. În condiții de atrofie cerebrală s-a constatat mai degrabă o reducere a ratei metabolice a glucozei decât o reducere a fluxului sanguin cerebral [15]. Scăderea fluxului sanguin cerebral sub valoarea optimă pentru menținerea homeostaziei metabolice duce la o serie de alterări biochimice și funcționale la nivel cerebral. Astfel, reducerea fluxului sanguin cerebral la valori de 15-20 ml/100g/min, produce o alterare profundă a homeostaziei celulare [15].

1.3.2 Cascada ischemică

Reducerea fluxului sanguin la nivel cerebral duce la privarea de oxigen și glucoză, metabolismul anaerob facilitând instalarea acidozei lactice; depolarizarea neuronală masivă determinată de creșterea influxului de Na^+ și Ca^{2+} și a efluxului de K^+ cu apariția edemului și a necrozei celulare [16]. Adicional se produce un dezechilibru energetic, datorită scăderii producției de ATP, ceea ce are ca urmare scăderea absorbției glutamatului de la nivel sinaptic și creșterea excitotoxicității [17]. Creșterea excesivă a calciului intracelular și eliberarea excesivă a mediatorilor cu rol excitator, accentuează perturbarea homeostaziei calciului prin intermediul receptorilor specifici, crescând susceptibilitatea la apoptoză prin activarea enzimelor catabolice cu degradare proteică și lipidică consecutivă și favorizează formarea speciilor reactive de oxigen [16,17]. În figura 1 este descrisă cascada ischemică, adaptată după Vidale [16].

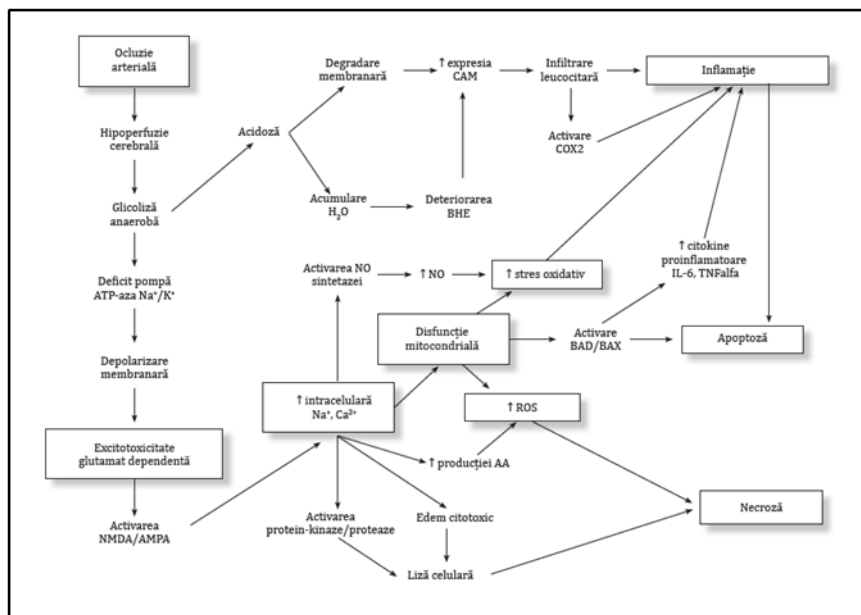


Figura 1. Procesele fiziopatologice care determină cascada ischemică din AVC ischemice (adaptat după Vidale, 2017, Journal of clinical neurology) [16].

1.3.3 Mecanismele protective endogene

Reducerea fluxului sanguin cerebral sub valoarea necesară menținerii homeostaziei celulare declanșează mecanismele protective endogene care au ca scop limitarea leziunilor și păstrarea integrității neuronale în penumbra, zona afectată de ischemie, dar cu mare potențial de recuperare. Inducerea toleranței constituie una dintre modalitățile de reducere a susceptibilității creierului la modificările ischemice [18].

Toleranța ischemică poate fi indusă prin diverse mecanisme, de la expunere la hipo- sau hipertermie, la hipoxie sau din contră, la concentrații crescute de oxigen. În plus, diverse abordări medicamentoase, sau alternative, pot influența în mod pozitiv mecanismele endogene de neuroprotecție, care acționează la diverse nivele ale cascadei ischemice [18]. De exemplu, expunerea creierului pentru o perioadă scurtă de timp la hipoxie non-letală, duce la creșterea toleranței celulelor nervoase la hipoxie în condiții de ischemie mai pronunțată (precondiționarea hipoxică). Alte mecanisme neuroprotective implică creșterea expresiei IL-10 dar și a HSP 70, proteină a cărei sinteză debutează la 1-2 ore de la debutul ischemiei; având rol în limitarea volumului

leziunii, creșterea expresiei moleculelor antiapoptotice Bcl-2 și inhibarea activării monocitelor și macrofagelor [19].

Abordarea strategiilor neuroprotective însă, trebuie să aibă în vedere și faptul că o mare parte dintre citokinele și celulele implicate în procesele patologice din ischemie au rol dual, într-o primă fază fiind neurodistructive, în timp ce în faza tardivă dobândesc proprietăți neuroprotective și neuroregenerative [18,20,21].

1.4. Clasificarea biomarkerilor periferici

Accidentul vascular cerebral este o afecțiune în cursul căreia se produc alterări ireversibile profunde la nivel celular și molecular prin multiple căi fiziopatologice, cu implicarea sau producerea unui număr mare de molecule cuantificabile în periferie. Astfel apare posibilitatea măsurării obiective și relativ precise a proceselor patologice, prin prisma amplitudinii sau evoluției în dinamică a acestor markeri; în plus, oferă posibilitatea monitorizării terapiei instituite sau a progresiei bolii [22].

Pentru ca un biomarker să poată fi utilizat în evaluarea de rutină a pacientului, trebuie să îndeplinească o serie de condiții, fiind necesară astfel validarea acestuia în scop diagnostic; trebuie să aibă un grad mare de sensibilitate și specificitate pentru patologia investigată, dar și să poată fi măsurat cu exactitate și precizie [23]. Trebuie avut în vedere și faptul că modificările biomarkerilor de inflamație locală sau sistemică - sunt influențați de prezența comorbidităților, fiind necesară astfel o analiză riguroasă a rezultatelor în context clinic. În acest sens, un panel de markeri care să analizeze simultan mai multe aspecte patologice ale procesului ischemic, de exemplu inflamația dar și leziunile țesutului cerebral - ar fi util în urmărirea evoluției pacientului. În plus, o serie de markeri (CRP, IL-6, procalcitonina, copeptina) pot fi utili în urmărirea apariției infecțiilor [24,25], dată fiind frecvența mare a acestora în rândul pacienților cu AVC, nefiind însă relevanți pentru estimarea procesului inflamator indus de ischemie per se.

Din considerente practice, clasificarea markerilor - fără a se dori a fi o etalare exhaustivă a acestora - va fi făcută în funcție de diversele procese patogene în care sunt implicați, sau din care rezultă ca metaboliți.

1.4.1. Markerii metabolici

1.4.1.1. Glicemia bazală

Un studiu recent demonstrează o relație non-liniară între deficitul cognitiv la 3 luni post AVC și nivelele glicemice bazale; atât valorile crescute dar și cele scăzute sub 50 mg/dl (considerat a fi pragul neuroglicopenic [26]), se asociază cu deficitul cognitiv [27]. În cazul pacienților diabetici, episoadele hipoglicemice sunt asociate semnificativ

și cu deficitul funcțional nefavorabil evaluat la 3 luni [28]. La pacienții nediabetici însă, deficitul funcțional nefavorabil se asociază cu valori glicemice bazale crescute în prima zi de spitalizare [29], fiind sugerate diverse mecanisme neurotoxice induse de hiperglicemie cu afectarea zonei de penumbra, precum: creșterea lactatului cu acidoză consecutivă, formarea radicalilor liberi în exces sau accentuarea efectelor citokinelor proinflamatoare [30].

1.4.1.2 Profilul lipidic

Dislipidemiile reprezintă un factor de risc pentru bolile cardio-cerebro-vasculare, tratamentele hipolipemiante fiind recomandate în reducerea recurențelor după AVC ischemice [31]. Însă studiile referitoare la parametrii lipidici în faza acută a accidentelor cerebrale ischemice prezintă rezultate contradictorii. Astfel, un studiu a arătat faptul că pacienții cu hiperlipidemie și LDL-colesterol crescut la momentul internării prezintă o rată mai redusă a mortalității pe termen scurt și lung, independent de terapia cu statine [32], în timp ce un alt studiu a sugerat influența pozitivă a colesterolului total și LDL-colesterolului crescut asupra evoluției favorabile doar în cazul bărbaților [33]. În literatură este descris “paradoxul trigliceridelor”, nivele scăzute la internare ale acestui parametru asociindu-se cu un prognostic nefavorabil și cu un grad mai mare de severitate [34].

1.4.1.3. Indexul Omega 3

Indexul Omega 3 reprezintă procentul de acizi grași polinesaturați ω -3- EPA (eicosapentaenoic acid) și DHA (docosahexaenoic acid) din totalul de acizi grași măsurați în plasmă sau membrana eritocitară. Deși numeroase studii experimentale dovedesc acțiunea benefică a PUFA la diverse nivele ale cascadei ischemice, totuși rezultatele studiilor clinice nu sunt pe măsura așteptărilor, în parte datorită dozelor diferite administrate dar și datorită variabilității inter-individuale la o doză dată, sau a factorilor genetici și de mediu [35]. Un studiu recent evidențiază o asociere inversă între nivelul acizilor grași Omega 3 (DHA și EPA) și severitatea ischemiei cerebrale și evoluția la 3 luni. În acest sens, indexul Omega 3 poate fi un candidat pentru markerii de evaluare a severității și prognosticului ischemiei cerebrale [36].

1.4.2. Markerii de disfuncție endotelială

1.4.2.1. Factorul von Willebrand

Factorul von Willebrand (vWF) este o glicoproteină secretată de celulele endoteliale activate, cu rol în favorizarea aderenței și agregării plachetare, fiind astfel un marker al disfuncției endoteliale. Rezultatele din literatură referitoare la evoluția concentrației plasmatice la pacienții cu ischemie cerebrală sunt variabile [37].

1.4.2.2. sVCAM, sICAM

Molecule solubile de adeziune vasculară și celulară, aparțin superfamiliei imunoglobulinelor și facilitează aderarea leucocitelor la nivelul endoteliului vascular, respectiv migrarea transendotelială a acestora [37]. sVCAM apare ca posibil predictor independent al deficitului motor la 3 luni, dar cu o creștere tardivă în decursul a trei săptămâni de la debut [38], în timp ce alt studiu semnalează valori nemodificate în AVC ischemice [37]. Creșterea sICAM se corelează cu deteriorarea neurologică rapidă, fiind relevant cu precădere în AVC ischemice lacunare [37], deși rezultatele par a fi contradictorii [39].

1.4.3. Markerii ai stresului oxidativ

Stresul oxidativ definește dezechilibrul dintre producția de radicali liberi și capacitatea sistemelor antioxidante de a le neutraliza limitând astfel acumularea speciilor reactive de oxigen (ROS) [40]. În acest sens este utilă atât evaluarea componenților plasmatici care suferă modificări în prezența ROS cum ar fi: lipidele - isoprostanul, MDA; proteinele - nitrozilarea tirozinei, formarea legăturilor disulfidice între resturile de cisteină ale glutatationului; denaturarea ADN-ului, dar și evaluarea enzimelor implicate direct în procesele oxidative (MPO) precum și a capacității de apărare antioxidantă a organismului [41]. Cu toate că sistemele antioxidante sunt supraexprimate în condiții de ischemie cerebrală, sunt totuși insuficiente pentru a preveni efectele acumulării ROS [42].

1.4.3.1. Acidul uric

Produs al metabolismului purinelor, prezintă o mare capacitate antioxidantă nonenzimatică, valori crescute fiind asociate cu protecția împotriva radicalilor liberi [43]. În literatură datele sunt contradictorii în ceea ce privește influența nivelelor plasmatiche ale acidului uric asupra severității și evoluției bolii.

1.4.3.2. Mieloperoxidaza (MPO)

Este o enzimă prezentă în granulele celulelor inflamatorii activate - neutrofile, monocite și macrofage, cu rol în special în apărarea imună nespecifică prin generare de acid hipocloric. Este implicată și în patologia cardiovasculară, accentuând disfuncția endotelială prin generarea speciilor reactive de oxigen [41]. În faza acută a AVC ischemice, nivelul seric al MPO pare a fi un predictor al severității și prognosticului nefavorabil [44]. Experimental, MPO este implicată în propagarea leziunilor ischemice cerebrale, creșterea persistentă a MPO în primele 24 ore de la debut fiind relevantă pentru extinderea leziunii [45]. S-a constatat că blocarea MPO duce la creșterea secreției BDNF și amplificarea expresiei markerilor pentru celulele progenitoare neuronale din zonele de neurogeneză, sugerând extinderea efectelor nefaste ale MPO și în faza tardivă prin reducerea celulelor progenitoare [46].

1.4.3.3. Enzimele antioxidante

Catalaza, glutation peroxidaza (GPX-1), și superoxid dismutaza (SOD) permit evaluarea capacității antioxidante a sângelui, gradul de activare al catalazei și SOD fiind în corelație cu evoluția pacientului [47]. În timp ce activitatea plasmatică totală a SOD dar și a Cu-, Zn-, Mn-SOD au fost găsite semnificativ mai mici la pacienți față de lotul control în faza acută a ischemiei cerebrale (probabil datorită consumului în vederea îndepărtării ROS), concentrația plasmatică a SOD (măsurată cu anticorpi monoclonali) a fost superioară la pacienți față de lotul control, o explicație în acest sens putând fi eliberarea extracelulară a acestor enzime după distrucția membranelor [47]. În ceea ce privește catalaza și GPX, atât activitatea cât și concentrația acestora au fost găsite semnificativ mai crescute la ischemici în faza acută comparativ cu lotul martor, sugerând atât creșterea producției cât și activarea acestora în condiții de ischemie [47].

1.4.4. Markeri inflamatori

1.4.4.1. CRP, hsCRP (proteina C reactivă)

Reactant de fază acută ce aparține familiei pentraxinelor, sinteza CRP este indusă de IL-6 - o puternică citokină proinflamatoare supraexprimată în AVC ischemice [37]. A fost găsită ca predictor independent al evoluției nefavorabile după AVC ischemice [37,48], deși, fiind un reactant implicat în apărarea nespecifică este influențat de multiple condiții asociate [49], probabil cu o specificitate redusă chiar și în faza acută a ischemiei [25]; rezultatele în literatură sunt însă contradictorii.

1.4.4.2. NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin)

NGAL (Lipocalin 2) este considerat un reactant de fază acută, cu rol în protecția neutrofilelor de autodegradare, fiind prezent în granulele secundare granulocitare și exprimat cu precădere în țesuturile susceptibile la infecții [50]. La nivelul sistemului nervos central, în condiții de ischemie, este exprimat atât de către microglia și astrocitele activate, dar și de neuroni și celulele endoteliale, cu implicare activă în modularea proceselor inflamatorii, în diferențierea și polarizarea funcțională a microgliei, dar și în modularea neuroinflamației și neurodegenerării [50]. NGAL este activat rapid după ischemia cerebrală indusă experimental, nivelul plasmatic crescând la o oră după injurie, fiind totodată și un factor de agravare după reperfuzie, prin creșterea activității proteolitice a matrix metaloproteinazei - 9 (MMP-9) în urma formării complexelor heterodimerice NGAL/MMP-9 prin intermediul punților bisulfidice [51].

1.4.4.3 sTNFR-1 (receptorul solubil-1 al TNF)

Foarte bine exprimat la nivel cerebral, prezintă un domeniu intracelular – death domain (DD), care determină semnalizarea spre moartea sau supraviețuirea celulară, în funcție de tipul de proteină semnalizatoare cu care interacționează - TRADD (TNFR Associated Death Domain Protein). Astfel, caspaza-8 sau proteine asociate FAS (First Apoptosis Signal) determină apoptoza, în timp ce recrutarea TRAF2 (factorul 2 asociat receptorului TNF) sau RIP (Receptor Interacting Protein) determină activarea căii NF- κ B, cu rol atât pro- cât și anti - inflamator și apoptotic [52]. Practic, prin intermediul receptorilor TNFR-1 și TNFR-2, factorul de necroză tumorală alfa (TNF-alfa) exercită un rol dual: distructiv, prin inducerea inflamației și apoptozei, și protectiv prin inducerea toleranței la ischemie [52]. Nivelul periferic al TNF-alfa crește în primele 6-24 ore de la debut, severitatea leziunii fiind în relație cu nivelul seric al proteinei [52].

1.4.4.4. Interleukinele (IL)

În cursul procesului ischemic, la nivel cerebral, sunt sintetizate o serie de interleukine pro- și anti-inflamatoare, atât de către celulele imune circulante dar și de microglia, astrocite, neuroni și celule endoteliale [52].

IL-1 β , o citokină pro-inflamatoare, slab exprimată constitutiv la nivel cerebral fiind în formă inactivă, este clivată de caspaza-1 la momentul apariției unui proces patologic. Creșterea IL-1 β duce la accentuarea influxului intracelular de Ca²⁺ mediat de receptorii NMDA, determinând moartea neuronală [52]. Microglia activează și crește expresia moleculelor de adeziune la nivelul celulelor endoteliale, cu creșterea infiltratului inflamator, consecutiv distrucției BHE și progresia zonei infarctizate, cu o evoluție nefavorabilă [52].

IL-6 este de asemenea o citokină proinflamatoare în relație directă cu volumul infarctului, dar și cu severitatea și disfuncția motorie post ischemie [53]; dar, ca majoritatea citokinelor, și IL-6 are un rol dual. Un studiu experimental recent a relevat faptul că administrarea IL-6 după ischemie determină scăderea expresiei citokinelor proinflamatoare și a activității MPO cu inhibarea apoptozei, prin activarea căilor anti-apoptotice STAT3 și JAK (Janus tirozin-kinaza) [54]. În plus, producția locală de IL-6 facilitează angiogeneza și remodelarea tisulară post ischemică [55].

IL-10 este o citokină anti-inflamatoare a cărei expresie crește la nivel cerebral în cursul ischemiei, facilitând supraviețuirea neuronală și glială prin inhibarea citokinelor pro-inflamatoare, reducerea activării celulelor imune efectoare, precum a limfocitelor T, macrofagelor și a monocitelor [56]. Totodată protejează endoteliul vascular de stresul oxidativ, limitând astfel infiltratul inflamator și facilitând remodelarea vasculară [56].

1.4.4.5. MCP-1 (proteina chemoatractantă monocitară - 1)

MCP-1 este o chemokină cu rol în migrarea și infiltrarea monocitelor la locul inflamației cu agravarea leziunilor post ischemice; în plus modulează răspunsul limfocitelor Th1 și Th2 [37]. Concentrația plasmatică a MCP-1 la debut este mai mare în formele severe de ischemie, în timp ce valori crescute ale acestei proteine în ziua a șaptea sunt predictibile pentru o evoluție nefavorabilă [57].

1.4.5. Markeri de distrucție neuronală și a BHE

Descoperită de Ehrlich în 1885 și ulterior descrisă de colaboratorul său, Goldmann în 1913, ca o barieră între sistemul nervos central și circulația periferică, bariera hematoencefalică (BHE) reprezintă cea mai mare suprafață de schimb în corpul adultului asigurând atât schimburile ionice și proteice, cât și modularea difuziunii neurotoxinelor și neurotransmițătorilor.

1.4.5.1. NSE (Neuron specific enolaza)

Forma dimerică a enolazei neuron specifice, este prezentă cu precădere în celulele nervoase, cu rol în menținerea homeostaziei celulare, iar în mai mică măsură și în structuri non-neuronale și carcinoame neuroendocrine [58]. O serie de studii au demonstrat corelația mai mare sau mai mică a acestui marker cu deficitul neurologic și severitatea ischemiei [39,59]

1.4.5.2. Neurofilamentele

Sunt proteine structurale neuronale a căror concentrație măsurată în periferie poate servi ca marker surogat pentru distrucția axonală [60]. Sunt structuri proteice specific neuronale care intră în structura citoscheletului și axonilor; se asamblează în heteropolimeri constituiți din subunitățile ușoare (L), medii (M) și grele (H) împreună cu polipeptide specifice alfa-internexina și periferina pentru neuronii sistemului nervos central, respectiv periferic [61]. Deși sunt considerați un marker specific sistemului nervos, un studiu recent a identificat prezența NfH la nivelul celulelor endoteliale miocardice, în urma marcajului cu anticorpi anti NfH 200 kD, sugerând lipsa specificității absolute a acestui marker pentru structurile neuronale [62]. Deoarece capetele C terminale ale lanțurilor H și M sunt bogate în locusuri de lizină-prolină-serină, fiind înalt fosforilate, prezintă o rezistență crescută la acțiunea proteazelor fiind astfel cuantificabile în periferie [63].

1.4.5.3. S100β

Este o proteină homodimerică glială, ce aparține familiei proteinelor transportoare de Ca²⁺, localizată cu precădere în astrocite, este considerată un marker specific pentru distrucția țesutului cerebral și a disfuncției BHE [64], fiind prezentă în concentrație serică foarte mică în condiții fiziologice [58]. Cu localizare

predominant intracelulară, având rol în menținerea homeostaziei calciului, este eliberată extracelular în urma leziunilor ischemice induse de excitotoxicitate [59]. Totuși se pare că există și surse extra-craniene ale acestei proteine, care ar putea influența rezultatele [58].

1.4.5.4. MMP-9 (Matrix Metaloproteinaza 9)

Colagenaza tip IV (gelatinaza B), este o proteină de 92 kDa ce aparține familiei endopeptidazelor. Este secretată de o serie de celule rezidente de la nivel cerebral (astrocite, celule endoteliale, neuroni) - cât și de celule inflamatorii infiltrate, în speță neutrofile [65]. Matrix metaloproteinazele au rol definitoriu în faza acută a ischemiei cerebrale provocând degradarea BHE, lezarea unității neurovasculare cu facilitarea neurodistrucției, extravazării neutrofilelor, degradarea proteinelor joncționale (laminina, ocludina și claudina), favorizând astfel extinderea leziunii și apariția edemului cerebral [66]. Un studiu pe țesut cerebral uman infarctizat a relevat expresia crescută a MMP 9 în zona de infarct, comparativ cu emisfera contralaterală, fiind cel mai frecvent co-exprimată cu markerii de celule endoteliale și neutrofile, în timp ce în penumbra MMP9 a fost co-exprimată cu markeri specifici microgliei [67]. În faza tardivă este implicată în diverse procese de remodelare și de promovare a neuroplasticității; prin degradarea matricei extracelulare permite migrarea celulelor neuronale progenitoare din nișele neurogene (SVZ, DG) la nivelul leziunii, facilitând astfel proliferarea, migrarea și diferențierea neuroblaștilor [68,69]. Dintre inhibitorii endogeni cu rol în modularea activității MMP-lor, se remarcă cu precădere Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP-1), exprimat în condiții patologice, care se leagă necovalent de locusurile active ale MMP-9 limitând activarea și efectele distructive ale acesteia [70].

1.4.6. Markeri de hemostază și fibrinoliză

1.4.6.1. D-Dimerii

D-Dimerii reprezintă produși ai fibrinolizei secundare, mediată de plasmină, fiind crescuți cu precădere în tipul cardioembolic [71]; valorile crescute se asociază pozitiv cu evoluția nefavorabilă și cu o mortalitate crescută [37,39,72]. Numeroase studii sugerează rolul nefavorabil al D-Dimerilor datorită acțiunii pro-coagulante dar și pro-inflamatoare [73,74].

1.4.6.2. PAI-1 (inhibitorul activatorului tisular al plasminogenului-1)

Nivele plasmatice crescute ale acestei proteine duc la o funcție fibrinolică deficitară. Datele din literatură referitoare la evoluția plasmatică a PAI-1 în faza acută a ischemiei sunt reduse. Un studiu recent relatează nivele crescute ale PAI-1 la pacienții cu AVC și apnee obstructivă în timpul somnului [75]. Nivele reduse ale PAI-1 înainte de administrarea terapiei fibrinolitice predispune la hemoragie

subarahnoidiană, posibil datorită accentuării statusului fibrinolitic [76]. Nu s-au găsit diferențe ale valorilor plasmatică ale PAI-1 între pacienții cu grad ușor și sever de dizabilitate, evaluat cu mRS, nefiind considerat astfel un predictor al evoluției bolii [77].

1.4.7. Chemokine și factori trofici

1.4.7.1. RANTES/CCL5 (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted)

RANTES/CCL5 este o chemokină pro-inflamatoare cu rol în recrutarea celulelor inflamatorii la locul leziunii. Deși rezultatele studiilor experimentale sunt discordante, totuși s-a constatat că nivelul plasmatic la 24 ore al RANTES este mai mare la șoarecii supuși ischemiei cerebrale, comparativ cu lotul sham, fiind exprimat cu precădere la nivelul neuronilor din zona peri-lezională [78]. Aceiași autori au constatat o corelare semnificativă a factorilor neurotrofici cu RANTES în plasma pacienților, precum și o creștere a fosforilării căilor Akt și Erk1/2 (pe culturi neuronale), căi implicate în reducerea apoptozei și supraviețuirea neuronală [78]. S-a sugerat astfel un rol neuroprotectiv al RANTES prin acțiunea autocrină/paracrină a acestei chemokine la nivelul zonei perilezionale cu favorizarea producției de factori neurotrofici [78]. Un studiu cu două direcții de cercetare (experimental și observațional) a relevat experimental că RANTES reduce distrucția BHE având astfel un efect neuroprotectiv, iar la lotul de pacienți analizați concentrația RANTES a fost găsită crescută la debut, înainte de terapia de recanalizare [79].

1.4.7.2. BDNF (Brain-derived neurotrophic factor)

BDNF este o neurotrofină care acționează la nivelul resurselor energetice neuronale, inhibă apoptoza și favorizează supraviețuirea neuronală în condiții de ischemie [80]. Nivelul plasmatic al BDNF se reduce cu vârsta; pacienții cu o concentrație mai mică a BDNF în prima zi de la debutul ischemiei prezentând un grad mai mare de dizabilitate după 3 luni, fiind un predictor independent al evoluției nefavorabile [81].

1.4.7.3. NCAM (Neuronal Cell Adhesion Molecule)

NCAM aparține superfamiliei moleculelor de adeziune celulară, exprimată cu precădere la nivelul țesutului nervos, cu rol în proliferarea și creșterea axonală, migrarea și interacțiunea dintre neuroni și celulele gliale. Este implicată în dezvoltarea cognitivă, nivelele plasmatică ale BDNF în cazul pacienților schizofrenici fiind mai mici comparativ cu lotul control [82]. Experimental s-a dovedit că ischemia determină atât reducerea sintezei de NCAM la nivel cortical, dar și creșterea produșilor de scindare proteolitică a NCAM sub acțiunea MMP, exacerbând moartea neuronală [83].

1.4.7.4. PDGF-AA; PDGF-AB/BB

Factorul de creștere derivat plachetar este o glicoproteină cu 5 izoforme: PDGF-AA, PDGF-BB , PDGF-AB și mai recent descoperitele PDGF-CC și -DD. Izoformele AB și BB par să dețină proprietăți angiogenice și neuroprotective [84], fiind esențiale în angiogeneză prin recrutarea pericitelor, totodată reglând tonusul vascular și agregabilitatea plachetară [85]. Valori periferice crescute ale PDGF-AB/BB se asociază cu un risc mai mic de recurență a evenimentelor vasculare cerebrale, putând fi un marker al plasticității vasculare și un predictor pentru o evoluție favorabilă după AVC ischemice [86].

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Ipoteza de lucru/obiective

Cascada ischemică declanșată de întreruperea temporară sau permanentă a circulației sanguine într-o regiune cerebrală specifică, are consecințe majore asupra homeostaziei țesutului nervos. Modificările fiziopatologice se reflectă prin variații ale parametrilor periferici sau prin modificări ale diverselor căi de semnalizare. Astfel, depolarizarea după depleția de oxigen cu activarea canalelor de Ca^{2+} voltaj-dependente, și eliberarea exagerată a glutamatului, care prin intermediul receptorilor specifici N-metil-D-aspartat (NMDA) duc la amplificarea influxului de calciu, concură toate la activarea căilor de inițiere ale apoptozei și necrozei. Moartea celulară din core și penumbra duce la eliberarea DAMP (Damage-Associated Molecular Patterns), cu activarea micogliei, care împreună cu leucocitele infiltrate ca urmare a distrucției BHE duc la eliberarea citokinelor proinflamatoare. Activarea citokinelor, chemokinelor și producția excesivă a ROS vor augmenta distrucția celulară.

Biomarkerii cuantificați în periferie pot fi specifici țesutului cerebral, eliberați ca urmare a leziunii tisulare, sau pot fi markeri sistemici (nespecfici), precum cei inflamatori, care reflectă mai degrabă răspunsul sistemic în condiții de ischemie cerebrală. Pentru clarificarea gradului de implicare sau a originii unui parametru periferic în patogenia ischemiei cerebrale, este necesară atât utilizarea unui lot martor (fără patologie cerebrală asociată), dar și evaluarea în dinamică a acestor parametrii.

Scopul tezei este de a identifica un panel de markeri periferici cu capacitate predictivă asupra severității și a gradului de disfuncție motorie la pacienții cu ischemie cerebrală la externare și la 3 luni de la debutul bolii. Se va încerca identificarea și crearea unor paneluri de markeri care să caracterizeze cât mai multe procese patologice implicate în distrucția neuronală post-AVC ischemic. Astfel, studiul își propune cuantificarea în dinamică a parametrilor de laborator în faza acută a bolii, respectiv în intervalul 1-5 zile de la debut, și evaluarea corelației acestora cu severitatea ischemiei dar și cu predicția gradului de disfuncție motorie la externare sau la 3 luni de la externare. Identificarea unor astfel de biomarkeri periferici ar aduce plus valoare diagnosticului clinic, în speranța unui mai bun management al pacientului cu AVC ischemic.

2. Metodologie generală

Teza de doctorat a avut mai multe direcții de cercetare; astfel în prima fază s-a urmărit evaluarea pe un model experimental frecvent utilizat, a influenței acizilor grași polinesaturați Omega-3 asupra proceselor inflamatorii și neurodistructive din

ischemia cerebrală, dat fiind faptul că în grupul studiat (pacienți și lot martor) indexul Omega 3 a fost relativ redus. Evaluarea modificărilor centrale și periferice, induse de ischemie, a fost făcută atât direct, prin analiza morfologică și imunohistochimică a țesutului cerebral din core și penumbra și a splinei, cât și indirect, prin cuantificarea biomarkerilor în periferie cu ajutorul unui panel de citokine (IL-6, TNF-alfa, VEGF, TIMP-1 și MCP-1) care să reflecte amplitudinea leziunii cerebrale; evaluarea parametrilor periferici fiind și modalitatea curentă de investigare a pacienților în etapa ulterioară.

Studiul observațional și prospectiv, include pacienți care s-au prezentat cu simptomatologie de AVC ischemic, în primele 72 ore de la debut, în Clinica de Neurologie 1 a Spitalului Clinic Județean de Urgență Tîrgu Mureș. Diagnosticul de certitudine a fost pus de medicul specialist neurolog pe baza evaluării clinice -deficit neurologic caracteristic leziunii focale cerebrale, brusc instalat cu durată > 1 oră, și imagistic - CT cerebral nativ sau CT cerebral de perfuzie, angio CT, examinare Doppler carotidian/vertebro-bazilar sau angiografia vaselor cerebrale. Au fost excluși pacienții cu AVC ischemic tranzitor (deficite neurologice cu durată sub 1 oră) sau hemoragic. Lotul control, potrivit ca vârstă și sex cu pacienții, a fost recrutat dintre persoanele care s-au prezentat în ambulatorul de specialitate al laboratorului pentru investigații de rutină.

Proiectul a fost aprobat de către Comisia de Etică a Spitalului Clinic Județean de Urgență Tîrgu Mureș și de Comisia de Etică a Universității de Medicină și Farmacie Tîrgu Mureș (nr. 112/17.11.2014) și s-a desfășurat în conformitate cu cerințele Declarației de la Helsinki. Studiul experimental a avut avizul Comisiei de Etică a Universității de Medicină și Farmacie Tîrgu Mureș (nr. 8/11.01.2016), desfășurându-se în conformitate cu reglementările internaționale privind studiile pe animale de laborator, și a Directivei Europene 2010/63/EU.

Criteriile de includere în studiul observațional prospectiv au fost: vârsta peste 18 ani, diagnostic cert de accident vascular cerebral ischemic, fără antecedente de AVC în ultimele 3 luni, fără scleroză multiplă sau alte patologii cerebrale evidente, fără boli maligne sau infecțioase/ inflamatoare evidente, fără traumatisme cerebrale. Doar pacienții care au semnat consimțământul informat au fost incluși în studiu. Severitatea bolii a fost evaluată în dinamică, începând cu momentul internării, de către un medic specialist neurolog, cu ajutorul scalei NIHSS (National Institute of Health Stroke Scale). Această scală permite aprecierea gradului de afectare neurologică a pacienților cu AVC, evaluând un număr de 11 parametri al căror grad de influențare variază în funcție de severitatea leziunii cerebrale. Severitatea este evaluată gradual, cu un scor de la 0-42 puncte, unde 0 = fără simptomatologie de AVC, 1-4 = AVC ușor, 5-15 = AVC moderat, 16-20 = AVC moderat spre sever și 21-42 = AVC sever [87].

Gradul de dizabilitate a fost evaluat cu scala Rankin modificată (mRS), atât la externare cât și la 3 luni, pacienții fiind împărțiți în grupul cu disfuncție motorie ușoară cu mRS cuprins între 0-2 și grupul cu deficit sever cu mRS cuprins între 3-6. Evaluarea la 3 luni a fost făcută de un specialist neurolog pe baza unui chestionar după un interviu telefonic.

Factorii de risc considerați relevanți pentru studiu au fost: fumatul, diabetul zaharat (DZ), fibrilația atrială (FA), hipertensiunea arterială (HTA) și dislipidemia. HTA a fost definită ca TA sistolică ≥ 140 mm Hg, TA diastolică ≥ 90 mm Hg, sau terapie cu antihipertensive instituită anterior; dislipidemia a fost definită de următoarele valori ale lipidelor serice: colesterol total > 200 mg/dl, trigliceride > 150 mg/dl, LDL colesterolul > 130 mg/dl și HDL colesterolul < 40 mg/dl, sau terapie hipolipemiantă instituită anterior. DZ a fost considerat în prezența criteriilor American Diabetes Association (ADA): glicemia bazală ≥ 126 mg/dl, glicemia "random" ≥ 200 mg/dl, istoric de DZ sau terapie hipoglicemiantă instituită. Prezența FA a fost considerată pe baza istoricului de FA, sau ca urmare a identificării electrocardiografice din cursul spitalizării.

Clasificarea etiopatogenică a accidentelor vasculare cerebrale a fost făcută conform clasificării TOAST (Trial of Org 10172), în tipul AT (aterotrombotic), CE (cardioembolic), SVO (patologia vaselor mici, lacunar) și de alte etiologii determinate sau nedeterminate [14]. Includerea în tipul AT a fost făcută pe baza evidențelor clinice și imagistice de stenoză arterială semnificativă (peste 50%) sau prezența trombilor de origine aterosclerotică, cu excluderea cauzelor cardioembolice. Diagnosticul de AVC de tip CE a fost făcut prin identificarea obstrucției arteriale datorată embolilor cu punct de plecare cardiac, cu prezența a cel puțin unei surse emboligene [14] (cele mai frecvente fiind FA, flutter-ul atrial și insuficiența cardiacă congestivă, etc). În categoria AVC lacunare au fost incluse cele fără stenoză semnificativă a arterelor carotide interne și fără surse emboligene, caracterizate clinic de prezența sindromului lacunar, și imagistic de leziuni mici cu localizare subcorticală [14]. În categoria celor de alte cauze au fost incluse cele de cauză determinată (hipercoagulopatii, vasculite autoimune, infecțioase, etc), cele de etiologie nedeterminată fiind considerate cele fără o cauză evidentă, sau cu mai multe cauze posibile [14].

A fost evaluat profilul lipidic extins al pacienților și lotului control incluși în studiu, acesta cuprinzând pe lângă parametrii clasici lipidici și acizii grași plasmatici și membranari eritrocitari.

Prin tehnica Biochip Array Technology, a fost studiat pe un subgrup de pacienți un panel de markeri periferici (CRP, NGAL, sTNFR-1, NSE și D-Dimerii) care oglindesc atât modificările inflamatorii dar și procesele de distrucție neuronală și fibrinoliză secundară). În plus, un panel de 10 citokine, chemokine și factori trofici (RANTES, MPO, BDNF, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, NCAM, sVCAM, sICAM, PAI-1 și Cathepsina) a fost

evaluat în dinamică prin tehnica multiplex pe bile magnetice, prin tehnologia xMAP (Luminex, Austin Texas, USA).

În urma analizei statistice au fost identificați markerii periferici cu capacitate predictivă asupra gradului de disfuncție motorie evaluată la externare sau la 3 luni de la externare, precum și gradul de îmbunătățire a predicției în comparație cu modelul clinic bazal (varstă, sex și NIHSS la internare) după adăugarea unuia sau mai multor markeri simultan la modelul bazal.

Găsirea unor markeri specifici țesutului nervos poate fi utilă în managementul pacientului cu AVC servind diverselor scopuri: diagnostice, de stabilire a etiologiei, de evaluare a degradării neurologice precoce sau a apariției complicațiilor post tromboliză, de stabilire a prognosticului în ceea ce privește gradul de disfuncție motorie. Deoarece accidentele vasculare cerebrale prezintă o fiziopatologie heterogenă, un panel de mai mulți biomarkeri va oferi informații mult mai detaliate, care să oglindească cât mai bine gradul de distrucție neuronală.

După identificarea unor posibili markeri surogat pentru leziunea țesutului nervos, validarea lor pe un număr reprezentativ de pacienți și stabilirea semnificației lor prognostice va fi o nouă provocare.

3. Modelul experimental pentru studiul citokinelor periferice și a modificărilor morfologice și imunohistochimice induse de ischemia cerebrală, cu și fără preconditionare cu Omega 3 (studiul 1)

3.1. Introducere

Găsirea unor oportunități terapeutice în diverse domenii medicale, implică folosirea prealabilă a unor modele experimentale animale cu afecțiuni spontane sau induse, care să mimeze cât mai fidel patologia umană. Dintre animalele de laborator pentru studiul proceselor patologice vasculare cerebrale, a potențialelor metode preventive sau a terapiilor post-ischemice, șobolanii sunt de departe cei mai utilizați, în parte datorită similitudinii structurilor vasculare cerebrale cu cele umane [88].

Au fost dezvoltate mai multe modele de alterare a fluxului sanguin la nivelul arterei cerebrale medii (ACM) (cea mai afectată la om), temporare sau permanente, fiecare având avantaje și dezavantaje, utilizarea unui model în defavoarea celui alt făcându-se în funcție de obiectivele studiului [89]. În Tabelul 1 sunt sumarizate avantajele și dezavantajele modelelor experimentale pentru inducerea ischemiei cerebrale la șobolani.

În primele ore de la debutul ischemiei, sinteza de citokine proinflamatoare (TNF-alfa, IL-6, IL-1) crește, având peak-ul la aproximativ 24 ore de la debut [90]; adițional infiltrarea leucocitară post-reperfuzie amplifică și agravează leziunile [91].

Majoritatea celulelor și citokinelor supraexprimate în condiții de ischemie, au efecte duale. Un exemplu este microglia/macrofagele care au capacitate de polarizare spre fenotipul M1 cu efecte citotoxice prin secreția de citokine proinflamatoare și specii reactive de oxigen, respectiv M2 care eliberează factori neurotrofici benefici în neuroprotecție și neuroregenerare [92]. TNF alfa, este de asemenea o citokină cu rol dual, fiind implicată atât în neuroinflamație [93] dar și în neuroprotecție [94], profilul depinzând de tipul celulelor producătoare dar și de locul de acțiune și tipul receptorilor asupra cărora acționează [95].

MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1/CCL2) este o chemokină pro-inflamatoare a cărei expresie crește în faza acută a ischemiei cerebrale în corelație cu severitatea ischemiei, fiind un predictor al evoluției bolii [57]; facilitează acumularea atât a monocitelor și macrofagelor la locul leziunii, dar și a neutrofililor, indirect prin activarea endoteliului de către citokinele pro-inflamatoare [96]. Un studiu recent

relatează reducerea expresiei MCP-1 la un model experimental de ischemie-reperfuzie intestinală în condiții de preconditionare cu Omega-3 [97].

Tabelul 1. Avantajele și dezavantajele diverselor modele experimentale de ischemie cerebrală indusă la șobolani.

Model experimental	Avantaje	Dezavantaje
Modelul cu craniotomie cu ligatura ACM	Vizualizarea facilă a obstrucției ACM; reproductibilitate bună	Metodă invazivă, cu complicații
Fototromboza ACM	Ischemie bine delimitată, prin administrarea intravasculară urmată de iradierea unui agent fotoactiv; invazivitate redusă	Edem vasogenic masiv Zona de <i>penumbra</i> redusă/absentă, fiind nepotrivită pentru studiul agenților neuroprotectivi
Injectarea de Endotelina-1	Vasoconstricție dependentă de doză în regiunea ACM Minim invazivă	Datorită expresiei receptorilor de Endotelina-1 la nivelul astrocitelor este favorizată astrocitoza, ducând la influențarea rezultatelor în studiile de regenerare
Modelul embolic cu trombi autologi sau microsferă injectate intraarterial	Reproduce cel mai fidel procesele patologice de la om	Variabilitate mare a rezultatelor, obstrucție cu localizări multiple datorită trombilor multipli
Injectarea trombinei intraarterial la nivelul ACM	Util în studiul terapiilor trombolitice	Variabilitate mare a volumului infarctului
Modelul cu fir intraluminal	Mai puțin invaziv decât craniotomia; permite obstrucția controlată (permanentă/temporară) Reproductibilitate bună dacă se folosesc fire de dimensiuni corespunzătoare	Lezarea hipotalamusului cu hipertermie Ruptura vasculară cu hemoragie subarahnoidiană Necesită abilități chirurgicale

Adaptat după Fluri et al. Drug Design, Development and Therapy, 2015 [89]

Pe lângă leziunile induse la nivel cerebral, ischemia determină și o activare a sistemului imun periferic pe cale simpatică, cu contracție splenică și atrofie urmată de imunodepresie [98], splenectomia după MCAO părând a avea rol benefic în reducerea volumului infarctului cerebral și ameliorarea deficitului funcțional, prin reducerea infiltrării cu celule inflamatorii de origine splenică și a citokinelor proinflamatoare [99].

O serie de studii experimentale demonstrează rolul protectiv al acizilor grași polinesaturați dacă sunt administrați înainte sau imediat după evenimentul ischemic. Astfel, preconditionarea cu Omega 3 ar duce la reducerea inflamației în general, și a volumului infarctului cerebral în particular, prin multiple mecanisme revizuite pe larg în literatură: inhibarea sintezei eicosanoizilor și citokinelor proinflamatoare, sinteza Neuroprotectinei D1 (ND1) și a resolinelor [100,101] și modificarea raportului Bcl2/Bax în favoarea mecanismelor antiapoptotice [102].

Distrucția barierei hemato-encefalice în condiții de ischemie are loc bifazic, în faza timpurie fiind implicate MMP-2 și MMP-9, în timp ce în faza tardivă creșterea expresiei MMP-9 activată duce la distrucția masivă a barierei hemato-encefalice

datorită degradării laminei bazale, a legăturilor intercelulare și a zonei occludens, cu apariția edemului vasogenic, a infiltratului inflamator masiv și transformarea hemoragică [103]. Studiile postmortem la om au relevat faptul că în core expresia MMP-9 se asociază cu precădere cu infiltratul neutrofil, în timp ce în penumbra aceasta este cu preponderență exprimată la nivelul țesutului microglial [67,103]. Modularea expresiei MMP-9 este realizată de către TIMP-1, nivele crescute fiind considerate un mecanism protectiv la creșterea MMP-9 [103]. În plus, TIMP-1 prezintă și o activitate anti-apoptotică neuronală, independentă de rolul de inhibitor asupra MMP-9 activată [104].

3.2. Ipoteză/Obiective

Obiectivele acestui studiu au fost:

1. Validarea în laborator a unui model experimental de ischemie cerebrală cu fir intraluminal, utilizat pe larg, în vederea analizării modificărilor survenite la nivel cerebral în condiții de suprimare a fluxului sanguin, în condițiile preconditionării cu Omega 3.
2. Studiul modificărilor morfologice și imunohistochimice din core și penumbra, la animalele preconditionate cu Omega 3, în comparație cu un lot fără suplimentare prealabilă.
3. Analiza modificărilor morfologice și imunohistochimice de la nivel splenic.
4. Studiul comparativ al citokinelor periferice TNF alfa, IL-6, MCP-1, VEGF și TIMP-1 la loturile de animale luate în studiu (cu și fără preconditionare cu Omega 3), precum și analiza eventualelor corelații ale acestor citokine cu modificările morfologice și imunohistochimice.

3.3. Material și metodă

Obstrucția temporară a arterei cerebrale medii cu fir intraluminal (MCAO)

Studiul experimental a fost aprobat de comisia de etică a Universității de Medicină și Farmacie din Tîrgu Mureș și s-a desfășurat în conformitate cu recomandările europene pentru studiile pe animale (Directiva 2010/63/EU a Parlamentului European și a Consiliului pentru protecția animalelor).

În vederea inducerii ischemiei cerebrale în zona irigată de ACM, am folosit tehnica firului intraluminal, descrisă pentru prima dată de Koizumi în 1986 [105] care a suferit o serie de îmbunătățiri de-a lungul timpului. Pentru studiu s-au folosit 30 șobolani masculi, adulți, rasa Wistar cu greutatea cuprinsă între 280-320 grame, provenind de la Biobaza Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" din Cluj Napoca. Animalele au fost acomodate la temperatura ambiantă, în mediu

controlat și cu acces liber la apă și hrană și au fost aleator împărțiți în grupul sham (S) (n=10), grupul cu ischemie (I) (n=10), și grupul preconditionat cu ulei de pește bogat în Omega 3 (O) (n=10).

Preconditionarea s-a făcut timp de trei săptămâni prin administrarea intraperitoneală (i.p) a 3,5 ml/kgc emulsie fosfolipidică conținând ulei de pește înalt purificat, care corespunde unei concentrații de aproximativ 70 mg/kgc EPA (eicosapentaenoic acid) și 80 mg/kgc DHA (docosahexaenoic acid). La grupul cu ischemie a fost administrată pe aceeași cale soluție salină. Pe lângă EPA și DHA, emulsia fosfolipidică a avut în compoziție și o cantitate mică (0,02 mg/ml) de alfa-tocoferol ca și antioxidant. Deoarece în literatură sunt studii care au arătat că alfa-tocoferolul în doză redusă (folosit ca și antioxidant) nu influențează volumul ischemiei comparativ cu loturile martor (cu ser fiziologic), nu am inclus în studiu și un lot adițional cu suplimentare de alfa-tocoferol [106,107].

Toate procedurile chirurgicale - introducerea firului intraluminal, îndepărtarea firului după 90 minute, precum și recoltările de sânge subsecvente - au fost făcute sub anestezie generală cu izofluran. În vederea efectuării procedurii chirurgicale, anestezia a fost indusă (în camera de inducție) cu 3,5% izofluran în mixtură de oxigen medical, și menținută pe mască cu 1,5% izofluran (Baxter). În timpul procedurii chirurgicale, animalul a fost poziționat liber cu capul în hiperextensie pe o pernă încălzită (Docol Corp, USA) la 37 °C pentru a preveni hipotermia pe parcursul intervenției, fiind cunoscut efectul neuroprotectiv al acesteia în ischemia cerebrală [108]. După dezinfecția și incizia tegumentelor între manubrium și stern s-a trecut la secționarea fasciei superficiale și a grupelor musculare subiacente în vederea expunerii complexului carotidian. O grijă deosebită s-a avut pentru a evita secționarea nervului vag (Fig 2).

După disecția arterei carotide comune și interne de nervul vag și de structurile înconjurătoare, a fost vizualizată artera pterigopalatină, care datorită poziției anatomice (fiind ramura extracranială a arterei carotide interne) poate permite inserția firului la acest nivel.

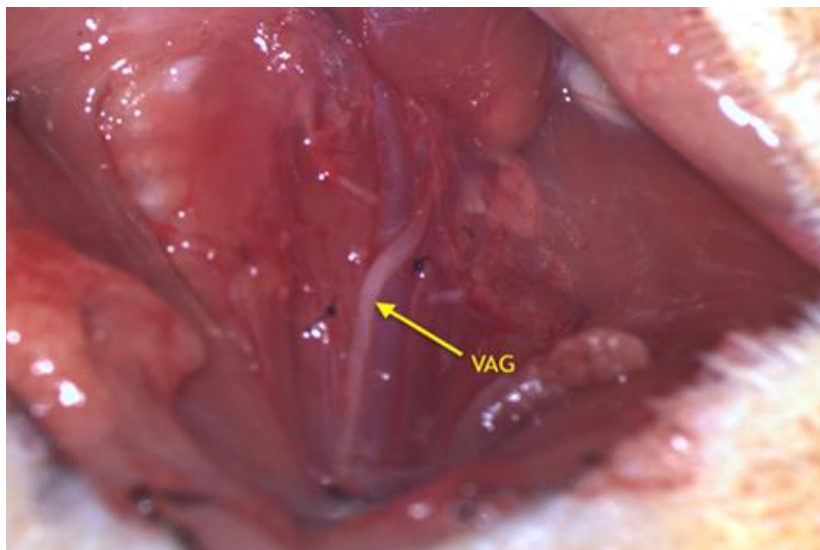


Figura 2 Expunerea arterei carotide comune și a nervului vag.

În acest sens, la acest nivel se poate aplica un clips sau o ligatură temporară [109], sau poate fi suficientă doar disecarea arterei cerebrale interne de structurile adiacente, până la emergența arterei pterigopalatine pentru o mai bună vizualizare (Fig 3) [110].

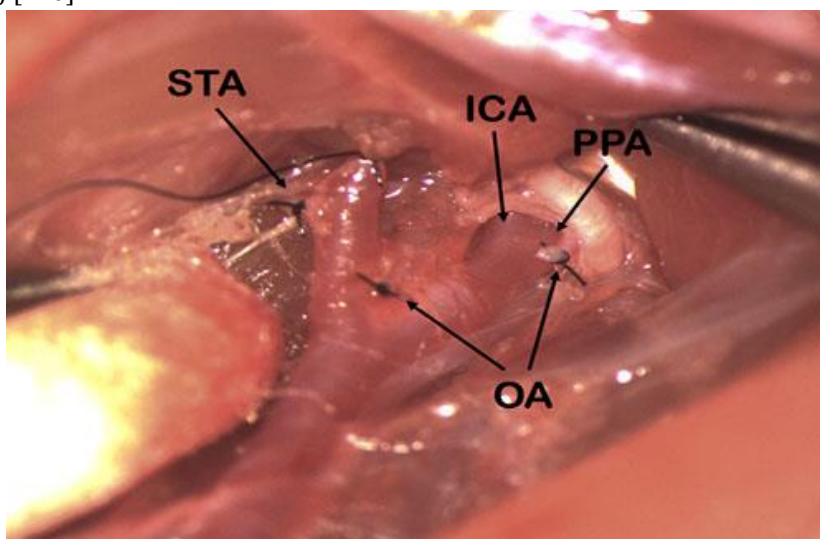


Figura. 3 Bifurcația arterei carotide comune.

În stânga se vizualizează artera tiroidiană superioară (STA), artera carotidă internă (ICA) cu emergența arterei pterigopalatine (PPA) și artera occipitală care a fost secționată (OA) [110]. Imagine publicată în Health Problems of Civilization. Orădan et al. 2017; 11(3). Copyright: Pope John Paul II State School of Higher Education in Białá Podlaska.

Monofilamentele de silicon utilizate au fost calibrate pe dimensiunea animalului, respectiv 4-0, diametrul 0,185 mm, cu învelișul ocluderului de diametru $0,39 \pm 0,02$ mm (Doccol Corp, USA).

Înainte de incizia tegumentelor s-a injectat subcutanat Bupivacaină, iar după îndepărtarea firului intraluminal (după 90 minute), s-a administrat Tramadol și soluție salină subcutanat, pentru reducerea durerii și prevenirea deshidratării [110]. Pentru grupul sham procedurile au fost identice până la pasul de expunere a bifurcației carotidiene, firul intraluminal nefiind introdus. Procedurile de analgezie și hidratare au fost identice cu cele ale grupului ischemic. Post-operator, după revenirea din anestezie precum și la 24 ore de la reperfuzie, animalele au fost evaluate din punct de vedere al deficitului motor cu ajutorul scalei de cinci puncte [111]: 0= fără deficit; 1= deficit ușor (imposibilitatea de face extensia membrului superior contralateral); 2= deficit moderat (rotire în partea contralaterală); 3= deficit sever (cădere înspre partea opusă ischemiei); 4= imposibilitatea de a merge spontan.

Pentru confirmarea ischemiei, la 24 ore a fost efectuată evaluarea imagistică cu RMN Turbo RARE (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement) (BrukerBioSpec 70/16 USR scanner) la Centrul Național de Rezonanță Magnetică Nucleară, Facultatea de Fizică, Universitatea Babeș-Bolyai Cluj Napoca sub anestezie generală, cu un protocol care să permită reconstrucția 3D a regiunii ischemice (www.slicer.org).

Recoltarea sângelui în vederea evaluării citokinelor periferice s-a făcut la 6 și 24 ore de la reperfuzie, sub anestezie indusă cu izofluran, din artera retro-orbitală cu ajutorul unor tuburi fine heparinate. Sacrificarea a fost făcută după evaluarea imagistică, la 24 ore de la reperfuzie, sub anestezie profundă prin dislocare cervicală. Creierul, splina și fragmente de țesut osos au fost prelevate, spălate în tampon fosfat salin și păstrate în formalină pentru prelucrare histologică și IHC.

Analiza morfologică și imunohistochimică a țesutului cerebral

În vederea evaluării morfologice și imunohistochimice, creierul a fost prelevat și prelucrat în totalitate din direcția rostru-caudală, inclus în blocuri de parafină fiind prelucrate după metoda histologică standard. O parte din secțiunile seriate obținute au fost colorate cu Cresil Violet/Nissl și hematoxilină-eozină (HE), pentru identificarea regiunilor anatomice cerebrale interesate de ischemia acută (aferente teritoriului irigat de ACM) și selectarea ariilor reprezentative în vederea evaluării modificărilor morfologice induse în penumbra și core. Adițional au fost analizate secțiuni necolorate pentru identificarea și tipizarea celulelor inflamatorii (macrofage, neutrofile, limfocite T) și a celulelor gliale. Identificarea și cuantificarea acestor celule în core comparativ cu penumbra a fost realizată prin metode imunohistochimice (IHC) folosind marcaje celulare specifice pentru diferite tipuri de celule (CD15, CD68, CD3), respectiv enzime (MMP-9, COX-2) și factori plasmatici (FXIII) [112].

Gradul ischemiei a fost evaluat separat în grupul I și O pe baza prezenței celor 4 modificări caracteristice induse de ischemie:

- a.Necroza eozinofilică acută și vacuolizarea neuronală (A)
- b.Degenerare neuronală și nucleii picnotici (B)
- c.Prezența edemului (C)
- d.Prezența infiltratului inflamator (D)

Toate modificările sus amintite au fost evaluate în comparație cu țesutul normal al emisferei contralaterale, respectiv al lotului sham. Pentru determinarea exactă a gradului de distrucție tisulară totală - total tissue damage (TTD), secțiunile colorate cu HE și Nissl au fost scanate cu Mirax Digital Slide Scanner și examinate cu microscopie digitală folosind programul aferent Panoramic Viewer 1.15.4 [112]. Evaluarea separată a celor 4 modificări patologice la nivelul țesutului neural s-a realizat pe baza unui sistem de scor, fiecărei variabile fiindu-i atribuită o valoare de la 1-10 în funcție de numărul celulelor interesate de modificare (pentru modificările de tip A și B), respectiv în funcție de procentul suprafeței interesate (pentru tipul C și D de modificări) [113], valorile fiind raportate pe arii tisulare examinate cu obiectivul 20. Scorul final care caracterizează fidel distrucția neuronală s-a calculat prin însumarea celor patru scoruri, scorul de distrucție tisulară totală (TTDS) fiind în concordanță cu gravitatea leziunii.

Pentru determinarea subtipurilor celulelor inflamatorii care caracterizează ischemia acută în primele 24 de ore, au fost folosiți următorii anticorpi: anti-CD15 clona Carb-3 (Dako), anti-CD68 ab 955 pentru neutrofile și monocite/macrofage, anti-CD3 clona ab21703 (Abcam) pentru limfocite T, anti-MMP9 (Novocastra) și anti-COX2 ab CX-294 (Dako) pentru enzime. Pentru marcarea factorului XIII s-au folosit anticorpii anti-FXIII clona E980.1 (Novocastra), protocoalele și diluțiile fiind în conformitate cu indicațiile date de producători. Pentru marcajul secundar s-au folosit anticorpii de capră anti IgG șobolan, iar produsul reacției a fost vizualizat cu 3,3'-diaminobenzidina (DAB), contracolorarea nucleilor fiind efectuată cu hematoxilină. Pentru fiecare antigen determinat s-au folosit controale pozitive și negative. În cazul controlului negativ anticorpus primar a fost înlocuit cu ser de blocare a proteinelor. Similar cu secțiunile pentru analiza morfologică, și secțiunile marcate imunohistochimic au fost scanate cu Mirax Digital Slide Scanner. Din fiecare caz s-au selectat cinci focare cu prezența celulelor care exprimă antigenul cercetat (metoda „hot spot”). Aceste focare au fost captate cu o mărire de 20x și ulterior prelucrate cu ajutorul programului de morfometrie Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>), conform protocolului programului. În prima fază a fost făcută segmentarea colorimetrică, care a avut ca rezultat o imagine color, care conține structurile celulare imunomarcate (imunomarcajul color îmbunătățește semnificativ potențialul segmentării colorimetrice, DAB-ul oferind un contrast bun). A doua fază o reprezintă selectarea suprafeței celulelor imunocolorate și măsurarea suprafețelor pozitive, obținându-se

astfel aria totală celulară, raportată la aria totală tisulară examinată. Rezultatul final a fost calculat prin media rezultatelor obținute pentru cele cinci arii examinate.

Analiza morfologică și imunohistochimică a țesutului splenic

Volumul (V) elipsoid al splinei a fost calculat cu ajutorul formulei care folosește dimensiunile măsurate ale organului, respectiv lungimea (L), grosimea (T) ambele măsurate în plan sagital și lățimea (W) măsurată în plan transversal [114]. Analiza arhitecturii splenice, a pulpei albe (diametrul maximal al foliculilor și zonele cu celule T și B) și a pulpei roșii a fost făcută pe secțiuni sagitale cu colorație HE.

Măsurarea citokinelor periferice

Pentru analiza în dinamică a citokinelor periferice, a fost recoltat sânge în eprubete cu EDTA la 6 respectiv 24 ore de la reperfuzie, în anestezie indusă cu izofluran. După recoltare, sângele a fost centrifugat iar plasma separată, alicotată și păstrată la -80 °C până la prelucrare.

Colesterolul total și trigliceridele, precum și funcția hepatică, respectiv activitatea serică a aspartat-aminotransferazei (AST) și alanin-aminotransferazei (ALT) au fost analizate pe analizorul Cobas Integra 400 Plus (Roche Diagnostics).

Citokinele din plasmă au fost analizate cu un panel de 5 parametri: IL 6, TNF-alfa, VEGF, MCP-1 și TIMP-1 (EMD Millipore, Merck, Germany) prin tehnica multiplex pe platforma Flexmap 3D (Luminex, Austin USA), conform instrucțiunilor date de producător.

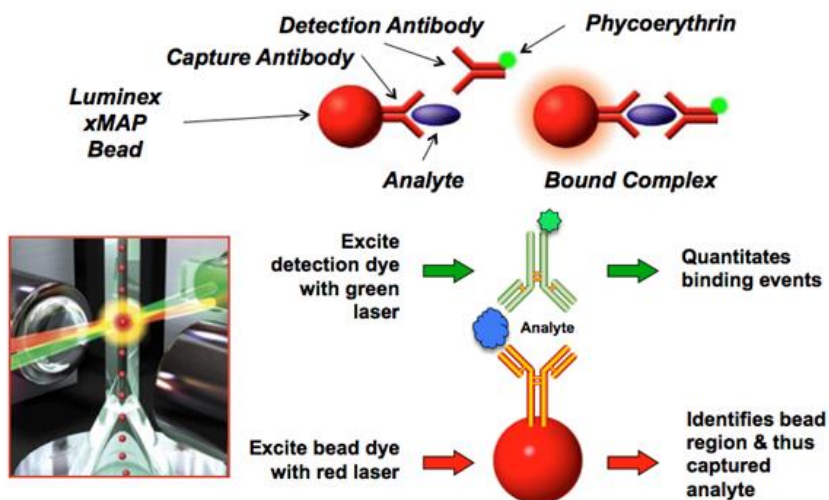


Figura. 4 Imagine de ansamblu a tehnicii multiplex xMAP Luminex. <https://www.thermofisher.com>

Tehnologia multiplex xMAP (Luminex, Austin USA) se bazează pe analiza prin flow-citometrie a unui număr variabil de parametri cuplați pe un suport solid marcat cu anticorpi specifici – în cazul de față bile magnetice cu diametrul de 6 microni - identificabile printr-un cod de culoare (de la roșu la infraroșu), fiecare set de bile fiind acoperit cu un anticorp specific. Analizorul dispune de două lasere de detecție unul roșu (635 nm) care permite clasificarea bilelor și unul verde (532 nm) care cuantifică concentrația proteinelor de interes în funcție de intensitatea semnalului fluorescent (PE) dezvoltat la finalul reacției imunoenzimatice (Fig 4). Tehnologia este utilă deoarece permite evaluarea unui număr mare de parametri (citokine, proteine) dintr-un volum mic de probă (aproximativ 50 μ l).

Analiza statistică

Descrierea variabilelor cantitative s-a realizat cu ajutorul indicatorilor de centralitate și dispersie: medie (SEM) \pm DS iar pentru comparația grupurilor am folosit testul t-student sau Mann-Withney, după caz. Măsurătorile repetate au fost evaluate cu analiza univariată a varianței (ANOVA) utilizând ca analiză post-test ajustarea Bonferroni. Corelația dintre citokinele periferice și volumul ischemiei, respectiv intensitatea expresiei variatelor tipuri de celule inflamatorii imunomarcate analizate, a fost făcută utilizând coeficientul de corelație Spearman. Pragul de semnificație statistică în cazul tuturor testelor bilaterale a fost stabilit la $p < 0,05$.

3.4. Rezultate

Evaluarea motorie

La finalul experimentului la 24 ore de la reperfuzie, evaluarea deficitului motor a fost făcută cu ajutorul scalei în 5 puncte. Din grupul I două animale au murit, iar unul nu a dezvoltat deficit motor adecvat (de cel puțin 2 puncte). În continuare au fost luate în studiu doar animalele care au prezentat cel puțin scorul 2 la evaluarea motorie.

Evaluarea imagistică a ischemiei cerebrale

La 24 ore după reperfuzie, prezența ischemiei a fost verificată imagistic cu RMN cu un protocol turbo RARE, care să permită reconstrucția 3 D a zonei ischemice. În figura 5 este o imagine reprezentativă pentru cele trei loturi de studiu (Sham, Ischemie și Omega 3). În modul de achiziție RMN-T2W, ischemia apare ca o zonă hiperintensă din regiunea subcorticală și a striatumului, corespunzătoare regiunii irigate de ACM. Pentru fiecare animal luat în studiu, au fost achiziționate câte 32 de imagini seriate la RMN; cele prezentate în figura de mai jos fiind cele corespunzătoare celei de a 16-a secțiuni.

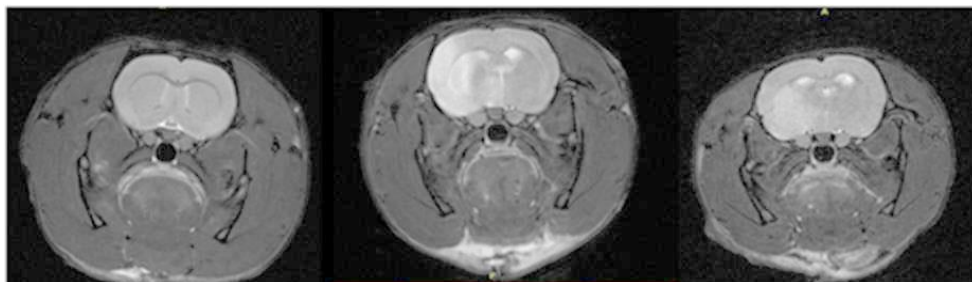


Figura. 5 Imagine reprezentativă pentru ischemia cerebrală

Achiziție T2W RMN; în stânga - lotul Sham - fără leziuni ischemice, în centru - lotul cu Ischemie (I) - zona de ischemie este reprezentată de porțiunea hiperintensă de la nivelul emisferei stângi; în dreapta - lotul cu Omega 3 (O) - zona de ischemie la grupul preconditionat cu ulei de pește. Rezultate publicate în Farmacia 2018; 66(4):602-608 [115]

Evaluarea influenței Omega-3 asupra parametrilor analizați imunohistochimic în core și penumbra

Analiza comparativă penumbra versus core ale celulelor inflamatorii care exprimă pe suprafață CD15 (neutrofile), CD68 (monocite și macrofage), CD3 (limfocitele T), CD4 (LT helper) și CD8 (LT citotoxice), precum și expresia MMP-9, a COX2 și a factorului XIII (factorul stabilizator al fibrinei) este sumarizată în Tabelul 2 sus (pentru lotul I) respectiv Tabelul 2 jos (pentru lotul O). Se observă că expresia CD68, CD3, FXIII și COX2 a fost semnificativ mai mare în penumbra versus core la grupul I, în timp ce la grupul O doar expresiile markerilor CD68 și CD3 a fost crescută în core comparativ cu penumbra, restul parametrilor fiind fără diferențe semnificative între cele două regiuni.

Tabelul 2. Analiza comparativă între *penumbra* și *core* a expresiei markerilor analizați la IHC la grupul cu ischemie tranzitorie (sus) și grupul preconditionat cu Omega 3 (jos).

Analiza comp. P – C (I)	Diferența între <i>penumbra-core</i>						t	p
	Media	DS	SEM	Intervalul de încredere de 95%				
				Limita inferioară	Limita superioară			
CD 15	0,61	1,47	0,55	-0,74	1,98	1,11	0,311	
CD 68	0,54	0,42	0,16	0,16	0,93	3,46	0,013	
F XIII	0,56	0,37	0,14	0,22	0,91	4,05	0,007	
MMP 9	-0,15	0,34	0,13	-0,46	0,15	-1,21	0,272	
COX 2	1,46	0,34	0,13	1,15	1,77	11,51	0,000	
CD 3	0,40	0,10	0,04	0,31	0,49	10,43	0,000	
CD 4	0,02	0,14	0,05	-0,10	0,15	0,49	0,640	
CD 8	0,02	0,06	0,02	-0,03	0,08	1,12	0,304	
P – C (O)								
CD 15	-0,04	0,95	0,30	-0,72	0,64	-0,13	0,897	

CD 68	-0,34	0,44	0,14	-0,65	-0,02	-2,40	0,040
F XIII	-0,11	0,19	0,06	-0,25	0,03	-1,79	0,108
MMP 9	0,06	0,23	0,07	-0,11	0,22	0,79	0,446
COX 2	0,06	0,53	0,17	0,32	0,43	0,33	0,747
CD 3	-0,29	0,29	0,09	-0,51	-0,09	-3,22	0,010
CD 4	-0,04	0,36	0,15	-0,43	0,34	-0,29	0,780
CD 8	-0,03	0,12	0,05	-0,16	0,09	-0,69	0,520

p=penumbra; c=core; DS=deviația standard; SEM=Eroarea standard a mediei; p obținut după analiza cu testul student (t).

Rezultatele analizei comparative a modificărilor din core și penumbra între lotul cu și fără precondiționare cu Omega-3 este detaliată în Tabelul 3.

Tabelul 3. Comparația expresiei markerilor celulelor inflamatorii, a MMP9 COX2 și FXIII în core și penumbra între loturile cu (O) și fără precondiționare (I) cu Omega-3.

Marker	Grup	N	Media	DS	p
pCD15	I	8	6,36	0,73	0,001
	O	9	4,86	0,70	
cCD15	I	8	5,69	1,25	0,19
	O	9	5,03	0,73	
pCD68	I	8	2,28	0,65	0,003
	O	9	1,42	0,34	
cCD68	I	8	1,81	0,29	0,87
	O	9	1,79	0,29	
pFXIII	I	8	1,72	0,39	0,001
	O	9	1,06	0,17	
cFXIII	I	8	1,25	0,18	0,38
	O	9	1,17	0,18	
pMMP-9	I	8	7,54	0,23	0,002
	O	9	7,10	0,26	
cMMP-9	I	8	7,65	0,35	0,001
	O	9	7,06	0,20	
pCOX-2	I	8	5,03	0,55	0,001
	O	9	4,05	0,27	
cCOX-2	I	8	3,83	0,31	0,67
	O	9	3,91	0,42	
pCD3	I	8	1,42	0,15	0,001
	O	9	0,87	0,27	
cCD3	I	8	1,07	0,09	0,084
	O	9	1,20	0,18	
pCD4	I	8	0,52	0,21	0,31
	O	5	0,41	0,11	
cCD4	I	8	0,41	0,22	0,20
	O	5	0,59	0,24	
pCD8	I	8	0,16	0,07	0,98
	O	5	0,16	0,08	
cCD8	I	8	0,13	0,04	0,13
	O	5	0,21	0,13	

C=core, p=penumbra; DS=deviația standard; p obținut după analiza cu testul student (t).

Se observă că expresia markerilor pentru celulele inflamatorii (CD15, CD68, CD3) a COX2 și a FXIII a fost semnificativ mai mare la grupul I față de grupul O, cu precădere în penumbra, în timp ce MMP-9 este semnificativ mai mare la grupul I atât în core cât și în penumbra ($p=0,001$) [112].

La evaluarea morfologică cu HE și Nissl (Fig. 6) a scorului total făcut între cele 4 categorii de modificări morfologice, respectiv: vacuolizare (A) + degenerare (B) + % edemului (C) + % ariei infiltrate cu celule inflamatorii (D), s-a observat o tendință de creștere a scorului total la grupul I ($30,2 \pm 2,77$) comparativ cu grupul O ($25,8 \pm 4,32$), fără a atinge însă pragul de semnificație statistic ($p=0,09$). Analizate separat, infiltratul inflamator a fost semnificativ mai mare la grupul I ($5,0 \pm 0,71$) comparativ cu grupul O ($2,4 \pm 0,55$), $p=0,0002$ [115].

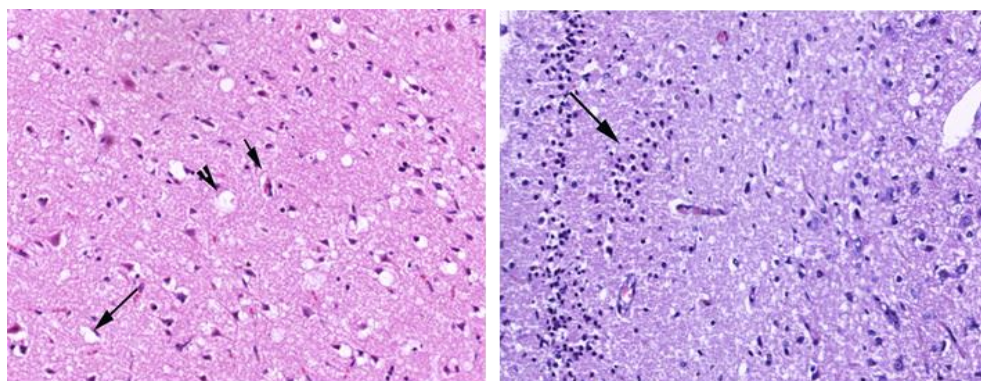


Figura. 6 Modificările morfologice vizualizate cu magnificație 200X;

stânga (colorație HE) săgeata scurtă = vacuolizare neuronală; săgeata lungă = nucleii picnotici și vacuolizarea neuropilului; vâr de săgeată = aria de edem cu degenerare. În dreapta (colorație CV/Nissl) se observă infiltratul inflamator care înconjoară zona de ischemie. Imagine publicată în Health Problems of Civilization. Orădan et al. 2017;11(3) [110]. Copyright: Pope John Paul II State School of Higher Education in Biała Podlaska.

Evaluarea influenței ischemiei și administrării Omega-3 asupra morfologiei splenice

În timp ce arhitectonica splenică este nemodificată în grupul sham (Figura 7), în loturile I și O aceasta denotă o reducere a pulpei albe, cu o slabă demarcare a foliculilor limfoizi, cu centrul germinal slab conturați cu tendință de confluență. Totodată la grupul O, la nivelul pulpei roșii sinusurile venoase apar colabate cu număr redus de hematii (Figura 8). În timp ce la grupurile S și I hematopoieza este reprezentată de prezența cu precădere a agregatelor mici de celule eritopoietice și megacariocite (Figura 9), în grupul O apare o accentuare a hematopoiezei extramedulare cu hiperplazie mieloidă (Figura 10).

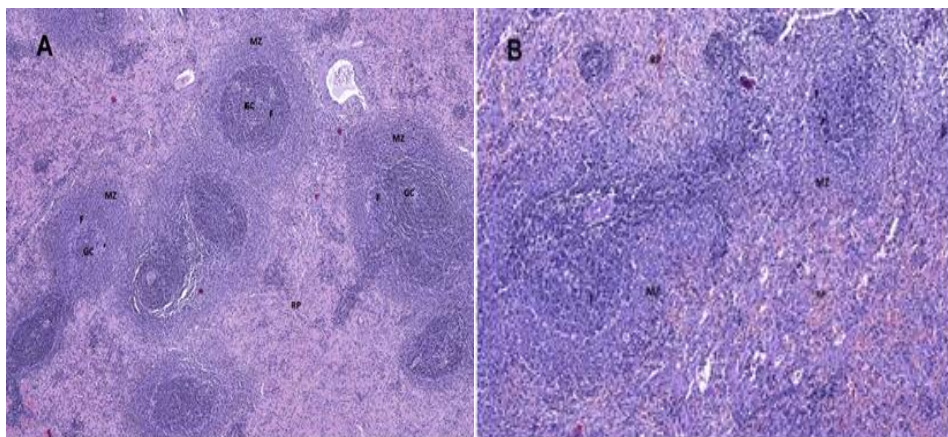


Figura 7. Morfologia splinei la grupul sham: foliculii cu centrii germinali și zona marginală foarte bine demarcate (colorație HE; 1,5X).

Figura 8. Morfologia splenică la grupul O. Sinusurile venoase colabate (colorație HE, 5X).

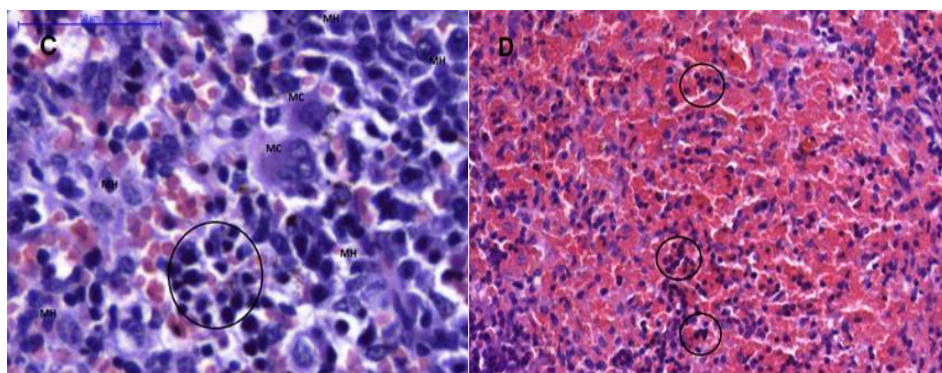


Figura 9. Hiperplazie mieloidă cu hematopoieză medulară accentuată la grupul O, cu insule granulopoietice (colorație HE, 20X).

Figura 10. Aspectul hematopoiezei extramedulare, la grupul S și I, cu insule mici de celule eritropoietice și rare megacariocite (colorație HE, 10X).

În urma analizei morfometrice digitale a pulpei albe a splinei, diametrul zonei marginale în grupul O a fost găsit semnificativ mai mare comparativ cu grupul I (Tabel 4).

Tabelul 4. Analiza morfometrică digitală a splinei; comparație între grupul cu ischemie și cel precondiționat cu Omega 3.

Parametrul	Grupul I (n=7)	Grupul O (n=10)
Volumul ischemiei (mm ³)	406 (68-941,4)	323,8 (177,2-384)
Volumul splenic (mm ³)	489 (452-509)	525 (501,5-544,3)
Pulpa albă (Ø, mm)	573,8 (550-597,6)	581,4 (542,9-675)
Zona marginală (Ø, mm)	84,8 (82-90,2)*	103,4 (81,4-118,4)*

*pragul de semnificație stabilit la $p < 0,05$

Efectul administrării Omega-3 asupra lipidelor și transaminazelor plasmatice

La finalul studiului nu au fost diferențe semnificative între parametrii lipidici, doar transaminazele au fost semnificativ mai mari la grupul I. În tabelul 5 sunt sumarizate rezultatele parametrilor biochimici analizați la finalul studiului. Rezultatele biochimice nu au fost disponibile pentru 4 subiecți din grupul S și pentru 3 din grupul I.

Tabelul 5. Analiza parametrilor biochimici la finalul studiului

Parametru	S (n=6)	I (n=7)	O (n=10)	p
AST (U/L)	175,8 (114,7-317,0)	286,8 (150,0-1637,7)	196,2 (153,3-264,1)	0,061
ALT (U/L)	63,4 (52,0-70,0)	58,5 (32,2-1509,8)	42,2 (27,9-52,5)	0,0029
Colesterol total (mg/dl)	56,0 ± 7,91	69,1 ± 5,95	58,4 ± 2,65	0,209
Trigliceride (mg/dl)	86,1 ± 10,3	89,4 ± 19,5	67,7 ± 3,91	0,339

Datele au fost prezentate ca media ± DS pentru variabilele cu distribuție Gaussiană și sau ca mediană (min-max) pentru distribuții cu deviații de la legea normală de probabilitate. AST=aspartat aminotransferaza; ALT=alanil aminotransferaza; p obținut din ANOVA cu analiza post-hoc realizată cu testul de comparație multiplă.

Efectul administrării Omega-3 asupra dinamicii citokinilor periferice

Evoluția în dinamică a citokinilor periferice la 6 respectiv 24 ore de la reperfuzie în interiorul grupurilor S, I și O este sumarizată în Tabelul 6.

Tabelul 6. Evoluția în dinamică a citokinilor periferice în cadrul grupurilor studiate.

Parametru (pg/ml)	Sham (S)		p
	6 h (n=7)	24 h (n=9)	
TNF alfa	32,67 ± 2,35	33,20 ± 2,13	0,220
IL-6	0,205 ± 0,050	0,166 ± 0,007	0,517
VEGF	0,048 ± 0,010	0,038 ± 0,010	0,08
MCP-1	0,938 ± 0,310	0,690 ± 0,187	0,241
TIMP-1	10,35 ± 1,54	8,69 ± 0,94	0,626

Ischemie (I)			
Parametru (pg/ml)	6 h (n=7)	24 h (n=7)	p
TNF alfa	65,43 ± 5,62	59,71 ± 2,08	0,300
IL-6	0,588 ± 0,100	0,428 ± 0,020	0,326
VEGF	0,178 ± 0,090	0,226 ± 0,117	0,185
MCP-1	1,516 ± 0,260	1,627 ± 0,194	0,794
TIMP-1	30,24 ± 8,43	37,28 ± 4,85	0,188
Omega-3 (O)			
Parametru (pg/ml)	6 h (n=10)	24 h (n=10)	p
TNF alfa	71,90±2,84	62,0±2,31	0,013
IL-6	1,462±0,690	1,259±0,590	0,232
VEGF	0,213±0,136	0,269±0,171	0,194
MCP-1	1,389±0,142	0,798±0,060	0,003
TIMP-1	15,49±3,19	14,22±1,79	0,565

Datele au fost prezentate ca media ± DS; p obținut în urma aplicării testului t-student. TNF=factorul de necroză tumorală; IL-6=interleukina-6; VEGF=factorul de creștere endotelială vasculară; MCP-1= proteina chemoatractantă monocitară-1; TIMP-1 inhibitorul tisular al matrix metaloproteinazelor-1 (rezultate publicate în Farmacia. 2018; 66(4):602-608) [115].

Variația între loturi la 6 ore respectiv 24 ore este descrisă în Tabelul 7, în Figura 11 fiind reprezentate graficele corespunzătoare parametrilor semnificativi statistic.

Tabelul 7. Citokinele periferice analizate în dinamică la 6 h și 24 h

pentru cele trei grupuri luate în studiu				
Parametru (pg/ml)	S (grup 1)	I (grup 2)	O (grup 3)	p
TNFAfa; 6 h	32,67 ± 2,35	87,14 ± 5,92	71,90 ± 2,84	<0,0001
TNFAfa; 24h	33,20 ± 2,14	81,43 ± 4,44	62,00 ± 2,31	<0,0001
IL-6; 6 h	0,205 ± 0,05	0,588 ± 0,105	1,462 ± 0,69	0,208
IL-6; 24 h	0,166 ± 0,007	0,488 ± 0,016	1,259 ± 0,59	0,118
VEGF; 6 h	0,048 ± 0,02	0,178 ± 0,09	0,213 ± 0,14	0,562
VEGF; 24 h	0,038 ± 0,01	0,226 ± 0,11	0,269 ± 0,171	0,351
MCP-1; 6 h	0,938 ± 0,31	1,516 ± 0,26	1,389 ± 0,14	0,229
MCP-1; 24 h	0,69±0,18	1,627±0,19	0,798±0,06	0,0001
TIMP-1; 6 h	10,35 ± 1,54	30,24 ± 8,43	15,49 ± 3,19	0,034
TIMP-1; 24h	8,69 ± 0,94	37,28 ± 4,85	14,11 ± 1,79	<0,0001

Datele au fost prezentate prin medie ± DS; p obținut după aplicarea metodei ANOVA cu testul de comparabilitate multiplă Bonferroni (rezultate publicate în Farmacia. 2018; 66(4):602-608) [115]

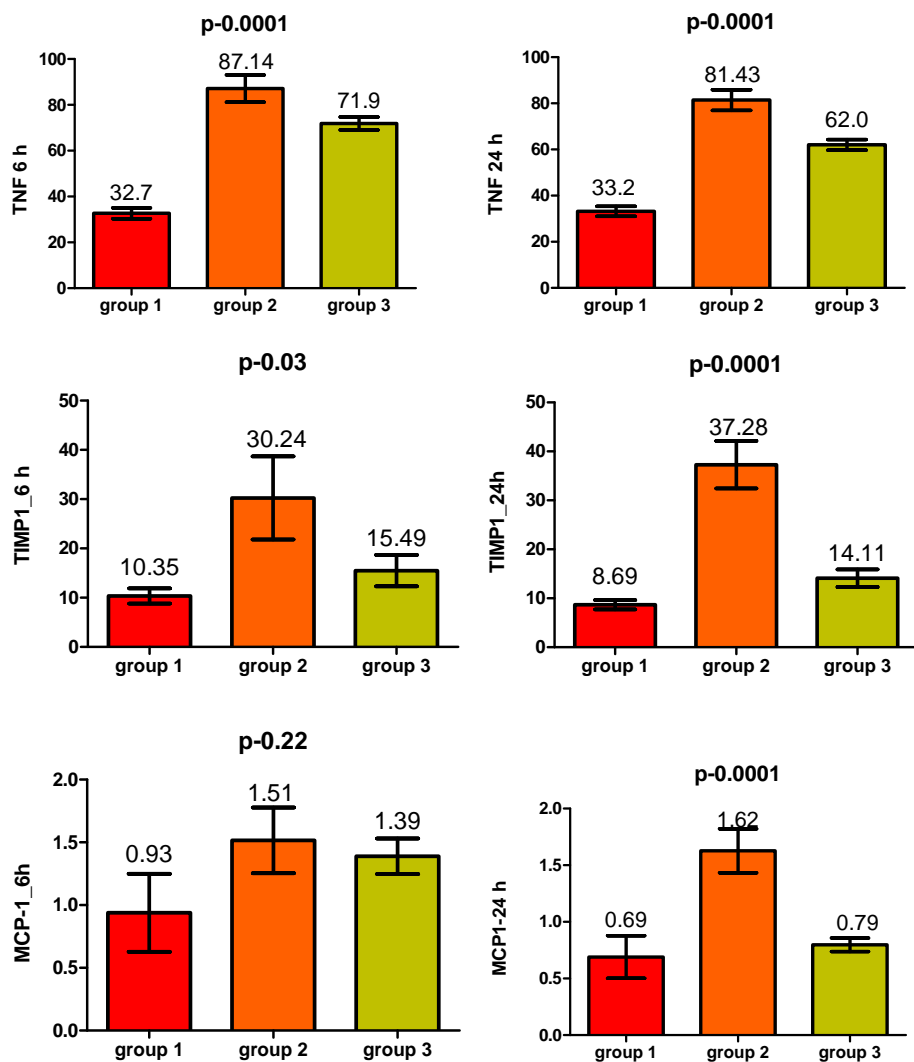


Figura 11. Reprezentarea grafică a modificărilor dinamice ale citokinelor în periferie între cele trei grupuri de studiu.

Grupul 1=sham (S); Grupul 2= ischemie (I); Grupul 3=precondiționat cu ulei de pește Omega-3 (O). În cazul TIMP-1 evaluat la 6 ore, diferența este semnificativă statistic doar între Grupul 1 (S) vs Grupul 2 (I); evaluarea TIMP-1 la 24 ore relevă diferență semnificativă între Grupurile 1 (S) vs 2 (I) și între grupurile 2 (I) vs 3 (O). MCP-1 evaluat la 24 ore, relevă diferențe semnificative statistic între grupurile 1 (S) vs 2 (I) și respectiv 2 (I) vs 3 (O), cu valori apropiate între grupurile 1 (S) și 3 (O).

3.5. Discuții

Studiul și-a propus investigarea influenței acizilor grași polinesaturați Omega-3 administrați înainte de inducerea ischemiei cerebrale tranzitorii asupra gradului de infiltrare cu celule inflamatorii în penumbra, zona care este afectată după reperfuzie prin accentuarea proceselor inflamatorii, apoptoză și degenerare neuronală [116], dar și asupra MMP-9 și TIMP-1 de a căror dinamică depinde gradul de afectare a barierei hematoencefalice. În plus, analiza gradului de implicare al splinei și a hematopoiezei extramedulare după MCAO a fost un alt obiectiv urmărit.

Ischemia a fost indusă prin păstrarea firului intraluminal în ACM timp de 90 minute, urmată de verificarea imagistică a extinderii zonei ischemice prin RMN. Analiza morfologică a țesutului cerebral afectat, în comparație cu emisfera contralaterală, denotă o prezență mai redusă a infiltratului inflamator la grupul care a primit 3 săptămâni Omega-3 în comparație cu grupul la care s-a administrat soluție salină (I). Rezultatul analizei morfologice este în concordanță cu modificările IHC, la grupul I gradul de infiltrare cu neutrofile (CD15), monocite/macrofage (CD68) și limfocite T (CD3) în penumbra fiind semnificativ mai mare comparativ cu grupul O; în plus celulele care exprimă CD15 și MMP-9 sunt cele mai numeroase în infiltratul inflamator. Gradul de infiltrare cu neutrofile și macrofage/monocite activate după reperfuzie, celule care reprezintă o sursă importantă de radicali liberi dar și de MMP-9, reprezintă un factor agravant pentru leziunile post-ischemice cu reperfuzie, în general independent de durata ischemiei [117]. În zona centrală de ischemie (core), MMP-9 este exprimată intracelular atât de neutrofile cât și de macrofage/microglia cu aspect amoeboid caracteristic formelor reactive. Referitor la infiltratul inflamator din ischemia indusă experimental, revizuirea recentă a literaturii sugerează rolul negativ și al limfocitelor T; totuși opiniile referitoare la timpul scurs până la obținerea peak-ului limfocitar la nivelul țesutului cerebral sunt contradictorii, unele studii sugerând un interval aproximativ cuprins între 5-7 zile, în timp ce altele raportează un peak al limfocitelor T la 6 ore [117]. Totodată markerii folosiți pentru limfocitele T au fost variabili, unele studii folosind CD5 (marker exprimat și de un subset al limfocitelor B), în timp ce altele au analizat CD8, NK, LTreg [117]. Totuși este cert că infiltrarea perivasculară precoce cu neutrofile care exprimă intens MMP-9 și este în corelație cu distrucția laminei bazale de la nivelul BHE este urmată de infiltrarea cu limfocite T și monocite periferice, cu amplificarea proceselor inflamatorii [117]. Rezultatele prezentului studiului sunt în concordanță cu cele din literatură. La 24 ore după reperfuzie infiltratul inflamator reprezentat atât de neutrofile, care exprimă intracelular MMP-9, dar și de limfocitele T (CD3) și macrofage/microglia de aspect amoeboid, sunt prezente în penumbra, zona în care neuronii sunt încă viabili dar care este afectată de extinderea proceselor inflamatorii în lipsa unei terapii adecvate. Așa

cum reiese din datele prezentate anterior, la grupul cu administrare prealabilă de Omega-3 infiltratul inflamator din penumbra și expresia MMP-9 sunt semnificativ mai reduse comparativ cu grupul cu administrare de soluție salină (martor). Un studiu experimental care investighează influența Omega-3 administrat imediat după inducerea ischemiei cerebrale, relevă faptul că expresia COX2 este semnificativ mai redusă la grupul tratat comparativ cu grupul control și sham [107]. COX2 este un mediator exprimat doar în condiții patologice, cu rol în sinteza prostaglandinelor și tromboxanilor din acidul arahidonic (AA). Un studiu relativ recent asupra proceselor patologice din artrită (o condiție care implică printre altele și hipoxia la nivel articular) sugerează apariția disfuncției mitocondriale în condițiile creșterii expresiei COX2 și a prostaglandinei E2 (PG-E2), cu eliberarea de MMP și accentuarea distrucției articulare [118], subliniind rolul MMP în propagarea leziunilor.

Studiul de față a relevat exprimarea COX2 cu precădere în penumbra, această expresie fiind semnificativ mai redusă la grupul cu administrare de Omega-3 față de grupul fără suplimentare de Omega-3. Mecanisme posibile ar fi suprimarea COX2 prin competiție cu AA, dar și afectarea sintezei COX2 la nivel transcripțional, prin inhibarea căii NF-kB, reducerea ROS și a activării căii ERK1/2 precum și inhibarea căii Protein Kinazei C (PKC) [119].

FXIII este exprimat de o parte dintre celulele CD68 pozitive, respectiv neutrofilele și macrofagele/microglia activate; se regăsește cu precădere la grupul I în penumbra, putând astfel sugera o legătură între activarea acestor celule și FXIII. Factorul FXIII este factorul stabilizator al fibrinei, produs în special de trombocite și monocite/macrofage, având rol atât în procesele de vindecare dar și în cele patologice cu generare de trombi. Recent a fost studiat ca marker de activare alternativă a macrofagelor, expresia FXIII mRNA corelându-se cu expresia unor citokine de tip Th2 și chemokine [120]. Sunt puține date în literatură cu privire la rolul FXIII în AVC și cu atât mai puțin în cele experimentale, cu preconditionare. La pacienții cu AVC ischemic concentrația FXIII a fost găsită în concordanță cu severitatea episodului ischemic, evaluată cu NIHSS [121].

În acest studiu analiza citokinelor a fost făcută doar în periferie, nemăsurarea acestora în lizatul tisular cerebral fiind una dintre limitări. Trebuie avut în vedere faptul că modificările care au loc la nivel central (celulare și umorale) pot să nu oglindească neapărat starea markerilor din periferie, mai ales dacă țesutul și sângele sunt recoltate în momente apropiate, în special datorită timpului necesar traversării BHE. Evaluarea celor trei loturi cu tMCAO, respectiv S, I și O, a relevat faptul că nivelurile plasmatiche la 6 ore și 24 ore de la reperfuzie ale TNF-alfa și TIMP-1 sunt semnificativ mai mari la grupul I comparativ cu S și O, în timp ce pentru MCP-1 tiparul este același doar pentru determinarea la 24 ore [115].

Un alt aspect important care reiese din studiu este reducerea semnificativă a concentrațiilor TNF-alfa și MCP-1 între cele două determinări (la 6 și respectiv 24 ore) la grupul pretratat cu Omega-3 în comparație cu grupul la care s-a administrat soluție salină, unde nivelul celor două citokine a rămas relativ constant [115]. Această observație sugerează rolul acizilor grași polinesaturați Omega-3 în reducerea sintezei de citokine proinflamatoare și a chemotactismului celular în condiții de ischemie cerebrală. Nu am găsit diferențe între loturi în ceea ce privește IL-6, în literatură fiind și alte studii cu rezultate similare [122]. O revizie recentă a literaturii relevă faptul că unele dintre efectele antiinflamatoare ale acizilor grași polinesaturați ar fi mediate de PPAR γ , fie prin legare directă, fie prin intermediul mediatorilor specifici de rezoluție a inflamației- specialised proresolving mediators (SPM). Astfel, în prezența DHA și EPA se reduce activarea căii NF-kB și expresia MCP-1 concomitent cu creșterea expresiei PPAR γ mRNA, în timp ce în prezența unui antagonist al PPAR γ efectele devin inverse [123].

TIMP-1 aparține familiei inhibitorilor endogeni de matrix metaloproteinaze (TIMP 1-4), care se leagă necovalent de locusurile active ale MMP-lor [70]. Spre deosebire de ceilalți membri ai familiei, exprimați constitutiv, TIMP-1 este exprimat doar în condiții patologice, ca răspuns la activarea MMP-9. Studiile experimentale au arătat că supresia TIMP-1 în condiții de ischemie indusă experimental este urmată de creșterea expresiei MMP-9, cu exacerbară leziunilor BHE și a degradării neuronale, în timp ce șoarecii transgenici cu TIMP-1 supraexprimat au prezentat o degradare semnificativ mai mică a BHE, în condițiile unui traumatism cerebral [70]. Raportul MMP-9/TIMP-1 a fost propus ca marker pentru evaluarea edemului cerebral și a gradului de distrucție neuronală în condiții de ischemie, eliberarea de TIMP-1 de la nivelul neuronilor, celulelor gliale [103] dar și a celulelor endoteliale [124] având rolul de a contracara efectul MMP-9. Mecanismele protectoare ale TIMP-1 nu se limitează doar la inhibarea MMP-9, reducerea influxului de calciu cu scăderea citotoxicității glutamat-indusă sau reducerea apoptozei, fiind sugerate. Un studiu experimental efectuat pe șoareci TIMP-1 $-/-$, a demonstrat creșterea concentrației și activității enzimatice a MMP-9 în comparație cu tipul sălbatic, cu accentuarea distrucției BHE și a apoptozei neuronale [104]. Date referitoare la evoluția TIMP-1 în condițiile administrării Omega-3 în special pe modelele ischemice, sunt relativ reduse. Un studiu experimental care a investigat influența concentrației DHA de la nivel cerebral asupra activității enzimatice ale MMP-9 și TIMP-1 precum și asupra deficitului motor după traumatisme cerebrale, a relevat faptul că expresia TIMP-1 este în directă corelație cu concentrația de DHA, un nivel redus al acidului docosahexaenoic asociindu-se cu expresia redusă a mRNA TIMP-1. Deoarece experimentul nu a stabilit o corelație între concentrația DHA și activitatea MMP-9 sau volumul leziunii, s-a sugerat rolul anti-apoptotic al TIMP-1, independent de inhibarea MMP-9 [125].

În studiul actual, după ischemia indusă 90 minute cu fir intraluminal, analiza IHC a țesutului cerebral a evidențiat expresia MMP-9 în core și penumbra dar și concentrația periferică a TIMP-1 ca fiind semnificativ mai mari la lotul martor (I) comparativ cu lotul cu suplimentare Omega 3 (O) [115], sugerând o dependență între cele două variabile. Suplimentarea cu acizi grași polinesaturați duce la reducerea expresiei MMP-9 la nivelul core și penumbra concomitent cu scăderea concentrației plasmatice a TIMP-1, putând reduce astfel gradul de distrucție a BHE și implicit a structurilor neuronale. Totodată evaluarea în dinamică a MCP-1 a evidențiat o scădere semnificativă a concentrației la grupul O, sugerând o reducere a infiltrării cu neutrofile - sursă importantă de MMP-9, prevenind astfel agravarea distrucției BHE.

Studiul corelațiilor între concentrațiile plasmatice ale citokinelor periferice și volumul ischemiei a evidențiat în grupul O o asociere semnificativă statistic între concentrația MCP-1 la 6 ore și volumul ischemiei ($r=0,853$, $p=0,003$), aspect pe care nu îl regăsim însă și la grupul I posibil datorită numărului mai redus de animale la final și a unei variabilități mai mari a volumelor la acest lot. Concentrația MCP-1 la 6 ore se corelează semnificativ și cu expresia CD15 în penumbra la grupul I ($r=0,928$, $p=0,006$), dovedind rolul acestei chemokine în infiltrarea precoce cu neutrofile, mult mai accentuată la grupul martor (fără precondiționare cu Omega-3). Infiltrarea neutrofilelor apare precoce, la aproximativ 30 minute după evenimentul ischemic, ducând la progresia leziunilor prin eliberarea factorilor proinflamatori, a speciilor reactive de oxigen sau eliberare de MMP-9 cu amplificarea distrucției neuronale și degradarea BHE [126]. Rezultate din literatură arată că nivelul acestei chemokine crește la 6 ore după inducerea ischemiei experimentale, iar administrarea antagoniștilor are ca rezultat reducerea infiltratului inflamator și a volumului ischemiei [126]. Rezultatele studiului actual sunt în concordanță cu datele descrise în literatură, subliniind în plus rolul antiinflamator al acizilor grași polinesaturați Omega-3, prin reducerea expresiei periferice a MCP-1 la 24 ore de la ischemia experimentală, și concomitent reducerea infiltratului inflamator în penumbra (fapt evidențiat prin scăderea expresiei CD15 la grupul O în comparație cu grupul fără precondiționare). Totodată expresia factorului XIII - cu rol în activarea macrofagelor/microgliei pe cale alternativă - este mai redusă la animalele cu suplimentare de Omega 3.

Contractia splenică, cu reducerea consecutivă a volumului splenic determină un influx de celule imune, parte din ele ajungând la nivel cerebral cu accentuarea răspunsului imun patologic. În grupul tratat cu Omega 3 s-a constatat o creștere a hematopoiezei extramedulare, similar cu alte rezultate din literatură [127] cu hiperplazie mieloidă, care ar putea avea efect dual, ca mulți alți parametri implicați. Pe de-o parte poate accentua leziunile ca urmare a fluxului secundar de neutrofile la nivel cerebral, dar pe de altă parte, poate reduce susceptibilitatea la infecții, fiind cunoscut faptul că imunosupresia post AVC determină frecvent infecții asociate.

Studiul aduce date suplimentare referitoare la impactul suplimentării cu Omega-3 asupra proceselor inflamatorii care au loc în condiții de ischemie cerebrală experimentală, în special asupra dinamicii plasmatică a MCP-1, TIMP-1 precum și a expresiei FXIII, de altfel puțin investigat în literatură în relație cu procesele inflamatorii.

Există totuși și câteva limitări ale studiului: numărul relativ redus de animale care au rămas la finalul studiului în grupul I, cu posibil impact asupra semnificației statistice; necuantificarea în periferie a MMP-9 pentru a folosi raportul MMP-9/TIMP-1 ca marker de distrucție a BHE; în plus nu a fost evaluat gradul de acumulare al acizilor grași în celule (hematii sau țesut cerebral).

3.6. Concluzii

Acizii grași polinesaturați Omega-3 reduc expresia celulelor inflamatoare (neutrofile, monocite activate/macrofage, limfocite T) în penumbra precum și expresia MMP-9 atât în core cât și în penumbra, zona cu neuroni viabili, dar care este în continuare supusă stresului inflamator post-reperfuzie. O altă posibilitate de implicare a Omega-3 în reducerea inflamației este sugerată de reducerea expresiei FXIII citosolic cu rol în activarea pe cale alternativă a macrofagelor.

În plus, preconditionarea cu Omega-3 determină o dinamică favorabilă a concentrației plasmatică a TNF-alfa și a MCP-1, sugerând o reacție inflamatoare sistemică mai redusă cu efecte mai puțin distructive. La nivel splenic, Omega 3 determină o accentuare a hematopoiezei extramedulare cu hiperplazie mieloidă.

4. Profilul lipidic extins și Indexul Omega 3 la pacienții cu accidente vasculare cerebrale ischemice (studiul 2)

4.1. Introducere

Lipidele au roluri controversate în patologia ischemiei cerebrale, datele din literatură fiind și ele contradictorii. Este bine cunoscut faptul că terapia hipolipemiantă este obligatorie ca metodă de prevenție secundară după un AVC ischemic. În schimb, rezultate contradictorii apar în faza acută a AVC; în timp ce unele studii relatează nivele plasmatiche reduse ale colesterolului total [128–130] și ale trigliceridelor [34,131,132] la pacienții cu grad crescut de dizabilitate post AVC (mRS ≥ 3), altele corelează pozitiv nivelul trigliceridelor cu severitatea ischemiei cerebrale la debut, evaluată cu NIHSS [133].

O altă clasă importantă de lipide este reprezentată de acizii grași, clasificați în saturați (SFA), mononesaturați (MUFA) și polinesaturați (PUFA). Numeroase studii, în special experimentale, au evidențiat implicarea acizilor grași polinesaturați Omega-3 ($\omega 3$ -PUFA) în reducerea volumului infarctului la nivel cerebral prin diverse mecanisme: inhibarea stresului oxidativ și inflamația prin creșterea expresiei factorului Nrf2 și HO-1, reducerea activării microgliei și implicit a secreției de citokine proinflamatorii [100]. În condiții de inflamație, din DHA și EPA se secretă mediatori specializați în reducerea inflamației (SPM). Astfel, DHA va servi ca substrat pentru sinteza mediatorilor din seria D (Resolvinele D1-D5) și a neuroprotectinei (NPD 1), în timp ce EPA va servi ca substrat pentru mediatorii din seria E (Resolvinele E1, 2) [134]. În plus, din DHA la nivelul macrofagelor, în prezența 12-LOX, se sintetizează maresinele MaR1 și MaR 2 [135], mediatori cu puternice acțiuni antiinflamatoare, implicate în grăbirea procesului de vindecare, prin reducerea migrării neutrofilelor și favorizarea fagocitozei de către macrofage [136].

Prin secreția mediatorilor lipidici și modularea semnalizării intracelulare, $\omega 3$ -PUFA reduc inflamația la nivel vascular [36]; în plus imediat după inducerea ischemiei cerebrale se sintetizează la nivel neuronal NPD1, cu rol în reducerea infiltrării leucocitare și a secreției de citokine proinflamatoare la nivel local [137], reducerea apoptozei precum și favorizarea neurogenezei [138]. În urma cuplării cu receptorul GPR120, $\omega 3$ -PUFA inhibă activarea și fosforilarea Transforming Growth Factor beta-Activated Kinase 1 (TAK1), ducând la inhibarea căilor pro-inflamatorii dependente de TNF alfa și TLR [139]. DHA administrat la scurt timp după inducerea ischemiei are rol

protectiv asupra integrității BHE, reducând volumul infarctului și îmbunătățind testele funcționale, așa cum arată un studiu experimental recent [140].

DHA se regăsește cu precădere în creier și la nivelul retinei, în timp ce EPA este prezent în proporție mult mai redusă la acest nivel. Sinteza acizilor grași polinesaturați ω -3 și ω -6 are loc prin elongări și desaturări repetate ale acizilor grași esențiali - alfa linolenic (ALA), respectiv linoleic (LA), procesul fiind mai selectiv în favoarea ω -3 decât a ω -6 PUFA [137]. Nivelurile plasmaticice ale acizilor grași sunt determinate atât de aportul alimentar cât și de sinteza endogenă sub acțiunea Δ 6 și Δ 5 - desaturazelor [141]; în timp ce nivelul plasmatic reflectă aportul alimentar recent, concentrația măsurată la nivelul membranelor eritrocitare reflectă mai fidel pool-ul de acizi grași acumulat pe durata de viață a acestora [142]. Totuși compoziția lipidelor membranare eritrocitare se modifică rapid corespunzător aportului [137] și necesităților, fiind utilă astfel determinarea concomitentă a acizilor grași atât în plasmă cât și la nivel membranar. Expresia concentrației ω 3-PUFA este dată de indexul Omega 3, acesta reprezentând suma EPA+DHA exprimat ca procent din totalitatea acizilor grași determinați [142]. Deoarece studii anterioare referitoare la Indexul Omega 3 au făcut referire în general la populația asiatică, rezultatul putând fi diferit de populația caucaziană, Superko și colab. a analizat acest parametru pe populația sănătoasă din SUA, relevând faptul că IQR pentru Indexul Omega 3 a fost situat în intervalul 2,5% - 5,7% [35]. O valoare a indexului Omega 3 mai mică de 4 a fost asociată cu un risc crescut de mortalitate prin boli cardiovasculare [142].

4.2. Ipoteză/Obiective

Scopul studiului a fost de a evalua profilul lipidic extins - colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, trigliceride, acizi grași saturați, mono și polinesaturați - la pacienții cu AVC ischemice și la un grup martor. Adicional s-a analizat influența profilului lipidic asupra gradului de dizabilitate post AVC ischemic la externare și la 3 luni, evaluat cu mRS. Nu am găsit date în literatură referitoare la Indexul Omega 3 în populația din România, prin urmare, includerea în studiu a unui lot martor a furnizat informații utile în acest sens.

4.3. Material și metodă

Din cei 124 de pacienți care s-au prezentat la Clinica de Neurologie 1, în perioada ianuarie 2015 – iulie 2016, cu simptomatologie de AVC ischemic, în intervalul de 72 ore de la debutul bolii, 114 au fost eligibili pentru studiul profilului lipidic, restul având cel puțin un criteriu de excludere. Alături de pacienți, în studiu au fost incluși și 40 de martori, cu distribuție similară în privința caracteristicilor

demografice (vârstă și sex) cu pacienții incluși, care s-au prezentat în serviciul de ambulator pentru investigații de rutină și care îndeplineau criteriile de includere. Compoziția plasmatică și membranară a acizilor grași a fost disponibilă doar pentru 65 pacienți dintre cei 114 și la toți martorii incluși.

Evaluarea clinică s-a făcut de către medicul neurolog folosind scala NIHSS la internare și în dinamică pe parcursul spitalizării. Gradul de dizabilitate a fost evaluat cu mRS la externare, fiind dihotomizat din punct de vedere al gradului de dizabilitate în evoluție favorabilă: pacienți cu mRS < 3 și nefavorabilă (grad mare de dizabilitate) cu mRS ≥ 3. Clasificarea etiopatogenică s-a făcut conform clasificării TOAST în tipul AT, CE, patologia vaselor mici și de alte cauze [10].

Recoltarea probelor și determinările de laborator

Pentru determinarea profilului lipidic, recoltarea sângelui s-a făcut în prima dimineață după internare. Pentru parametrii lipidici clasici s-a recoltat sânge în tub cu accelerator de coagulare, s-a lăsat 30 min la temperatura camerei după care s-a centrifugat, iar serul a fost alicotat și stocat la -80 grade C până la testare. Colesterolul total, HDL-colesterolul și trigliceridele au fost măsurate pe analizorul Architect 4000 (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois), iar LDL-colesterolul a fost obținut din calcul cu formula Friedewald.

Pentru cuantificarea acizilor grași din plasmă și din membrana eritocitară, sângele a fost recoltat în eprubetă cu Na-heparină; după centrifugare plasma a fost alicotată iar eșantioanele de plasmă și eritrocite au fost păstrate la -80 grade până la testare. Evaluarea acestora s-a făcut prin cromatografie lichidă/spectrometrie de masă (LC/MS), (Agilent 1200 HPLC Series system, Agilent Technologies, Santa Clara, USA). După hidroliza membranelor fosfolipidice, extracție în hexan și concentrare prin evaporare, acizii grași au fost analizați prin LC/MS, după compararea cu o mixtură de standarde înalt purificate (minim 98%) de concentrații cunoscute (Sigma-Aldrich și Caiman Chemical Company). Concentrațiile standardelor utilizate au fost: 100 µg/mL pentru acidul stearic, EPA, lauric, linoleic; 400 µg/mL pentru acidul arahidonic; 250 µg/mL pentru acidul oleic și 10 µg/mL pentru acidul adrenic și DHA, standardul intern fiind Ketoprofenul (Farmacopeea Europeană). Analiza timpilor de retenție s-a făcut cu QuantAnalysis 5.2, soft special pentru LC/MSD Agilent Technologies [143]. Timpii de retenție pentru spectrul ionic al acizilor grași studiați au fost: m/z = 257 din 301 la Rt = 2.0 min pentru EPA; m/z = 199 si Rt = 1.4 min pentru lauric acid; m/z = 283 din 327 pentru DHA la Rt = 2.5 min; m/z = 259 din 303 la Rt = 2.7 pentru acidul arahidonic; m/z = 255 la un Rt = 4.3 min pentru acidul palmitic; pentru acidul adrenic m/z = 287 din 331 la un Rt = 4.3 min; m/z = 281 la Rt = 4.7 min pentru acidul oleic; m/z = 283 la Rt = 8.2 min pentru acidul stearic și m/z = 279 la Rt = 3.1 min pentru acidul linoleic. Pentru standardul intern de ketoprofen m/z a fost 253 cu Rt = 2.8 min [143].

Acizii grași măsurați au fost grupați în:

- acizi grași saturați (SFA): 16:0 acid palmitic, 18:0 acidul stearic și 12:0 acidul lauric;
- acizi grași mononesaturați Omega-9 (MUFA): 18:1 acidul oleic;
- acizi grași polinesaturați Omega-6 (ω 6-PUFA): 18:2 acidul linoleic, 22:4 acid adrenic și 20:4 acid arahidonic;
- acizi grași polinesaturați Omega-3 (ω 3-PUFA): 22:6 DHA și 20:5 EPA.

Analiza statistică

Datele au fost analizate cu mediul avansat de programare statistică și grafică R-versiunea 3.4.0. Compararea distribuției variabilelor continue între cele două loturi (pacienți versus martori) s-a realizat folosind testul Student (t), pentru datele parametrice sau testul Mann-Whitney, pentru datele neparametrice. Descrierea sintetică a datelor cu distribuție normală s-a realizat cu ajutorul mediei \pm DS, în timp ce datele cu distribuție neparametrică au fost exprimate ca mediană și interval intercvartilic (IQR). Analiza bivariată a asocierii dintre variabilele calitative s-a făcut cu testul Chi-pătrat (χ^2) sau testul exact al lui Fisher.

Analiza de cale a fost folosită pentru a evalua simultan relațiile dintre parametrii profilului lipidic (HDL-colesterol, colesterol total, trigliceride), vârsta, sexul, NIHSS la internare și gradul de dizabilitate măsurat prin mRS la externare și la 3 luni. Deoarece acizii grași au fost evaluați pe un eșantion mai redus, nu au fost incluși în analiza modelului de cale. Diagrama de cale prezintă coeficienții de regresie parțiali în forma standardizată a influenței variabilelor exogene asupra variabilelor endogene.

Adecvarea modelului la date a fost descrisă folosind următoarele criterii: testul Chi-pătrat (χ^2), rădăcina medie patrată a erorii de aproximare (RMSEA) $<0,05$, testul de semnificație pentru RMSEA (cu ipoteza nulă ca RMSEA $\leq 0,05$), rădăcina medie pătrată a reziduurilor standardizate SRMR $<0,08$, indexul comparativ de potrivire al modelului (CFI) și indexul lui Tucker și Lewis (TLI) $\geq 0,90$.

Rezultatele au fost considerate semnificative pentru un nivel de semnificație estimat $p < 0,05$ ($\alpha = 0,05$).

4.4. Rezultate

4.4.1. Analiza comparativă a profilului lipidic între pacienți și lotul martor

Media de vârstă în grupul pacienților a fost $71,68 \pm 10,22$ ani, femeile reprezentând 57% din totalul pacienților incluși în studiu, în timp ce în grupul control procentul femeilor a fost de 57,5% media de vârstă a martorilor fiind $67,90 \pm 13,95$

ani; diferența dintre grupuri nefiind semnificativă statistic în raport cu vârsta ($p=0,070$) și genul ($p=0,985$). Nu s-au găsit diferențe semnificative statistic în ceea ce privește terapia hipolipemiantă, majoritatea pacienților având terapia instituită după internare; doar 8,8% ($n=10$) pacienți și 10,0% ($n=4$) martori fiind sub tratament cu statine la momentul recoltării.

Analiza comparativă a parametrilor lipidici între grupul pacienților și al martorilor este descrisă în Tabelul 8. Concentrațiile serice pentru toate fracțiunile lipidice sunt semnificativ mai mici în lotul de pacienți comparativ cu grupul martor; $p=0,0005$ pentru colesterol, $p=0,038$ pentru trigliceride, $p=0,016$ pentru HDL-colesterol și $p=0,006$ pentru LDL-colesterol. Nu am găsit diferențe între valorile medii ale colesterolului, trigliceridelor și HDL-colesterolului în cazul pacienților cu sau fără tratament prealabil cu statine ($p>0,05$).

Tabelul 8. Valorile bazale ale parametrilor la pacienți comparativ cu lotul control

Parametrii de laborator (mg/dl)	Grup control (n=40)	Pacienți AVC (n=114)	p
Colesterol total	214,7 ± 42,8	184,1 ± 45,7	0,0005
Trigliceride	118,8 (94,2-151,5)	103,6 (79,0-135,5)	0,038
HDL-colesterol	52,3 ± 12,3	47,0 ± 11,2	0,016
LDL-colesterol	133,9 ± 38,3	113,6 ± 39,9	0,006

Pentru colesterol total, HDL-colesterol și LDL-colesterol, rezultatele sunt exprimate prin medie ± DS, în timp ce trigliceridele sunt exprimate ca mediană (percentila 25%-percentila 75%); comparația grupurilor s-a făcut cu testul Student (t) pentru grupuri independente cu varianțe egale sau cu testul Mann-Whitney pentru trigliceride (distribuție non-parametrică).

Analiza prin LC/MS a acizilor grași din plasmă și membrana eritrocitară poate fi vizualizată în Figura 12, unde este detaliată cromatograma cu timpii de retenție pentru parametrii analizați.

Rezultatele obținute pentru determinările acizilor grași în plasmă și în membrana eritrocitară la pacienți comparativ cu grupul control sunt sumarizate în Tabelul 9, respectiv Tabelul 10.

Dintre acizii grași saturați, acidul palmitic măsurat în plasmă este ușor crescut la pacienți față de lotul control, fără a atinge pragul de semnificație statistică; în schimb acidul stearic și lauric sunt semnificativ mai mici la pacienți față de grupul martor ($p<0,001$ pentru acidul stearic și $p<0,001$ pentru acidul lauric). Acidul oleic ($\omega 9$ -mononesaturat) în plasmă este semnificativ mai mare la pacienți față de martori ($p=0,009$).

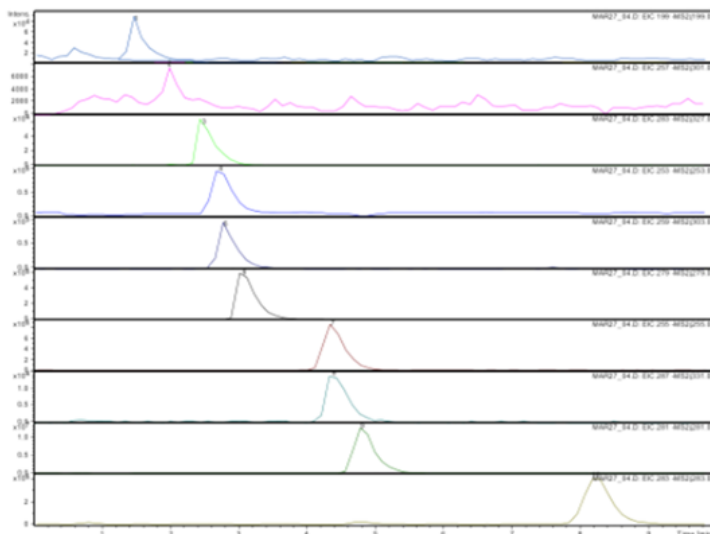


Figura 12. Cromatograma pentru determinările plasmatice ale acizilor grași.

Timpii de retenție pentru acizii grași analizați: 1. Acid lauric (1,4 min); 2. EPA (2,0 min); 3. DHA (2,5 min); 4. acid arahidonic (2,7 min); 5. Ketoprofen (2,8 min); 6. acid linoleic (3,1 min); 7. acid palmitic (4,3 min); 8. acid adrenic (4,3 min); 9. acid oleic (4,7 min) și acid stearic (8,2 min). Rezultate publicate în Farmacia, 2015, 63(4) [143].

Dintre $\omega 6$ -PUFA, acidul linoleic și adrenic au valori plasmatice semnificativ mai reduse la pacienți față de martori ($p < 0,001$), în timp ce AA este prezent în concentrație ușor crescută la pacienți față de martori, fără semnificație statistică ($p = 0,942$). În ceea ce privește $\omega 3$ -PUFA, EPA și DHA plasmatici, prezintă valori semnificativ mai mici la pacienți față de martori ($p = 0,051$ pentru EPA și $p < 0,001$ pentru DHA). Deși concentrația plasmatică a AA nu a fost diferită semnificativ între cele două grupuri, raportul AA/DHA+EPA a fost semnificativ mai mare la pacienți vs grupul control ($p < 0,001$).

În cazul determinărilor acizilor grași din membrana eritocitară, un trend similar cu cel plasmatic s-a observat pentru acizii grași saturați și mononesaturați, în schimb, toți acizii $\omega 6$ -polinesaturați luați în studiu prezintă valori mai crescute la pacienți față de martori, însă fără semnificație statistică. Concentrația membranară a DHA a fost semnificativ mai mică la pacienți 2,71 (1,03-9,28) $\mu\text{g/ml}$ față de lotul control 4,62 (3,19-6,19) $\mu\text{g/ml}$, $p = 0,029$ iar raportul AA/DHA+EPA a avut valori semnificativ mai mari 31,44 (22,07-44,02) $\mu\text{g/ml}$ la pacienții ischemici comparativ cu lotul martor 19,9 (14,17-23,93) $\mu\text{g/ml}$, $p < 0,001$ înclinând astfel balanța spre componenta proinflamatoare. Indexul Omega-3, reprezentând procentul $\omega 3$ -PUFA

raportat la totalitatea acizilor grași măsurați, a fost semnificativ mai mic la pacienții ischemici 1,35 (0,73-2,30) comparativ cu lotul control 1,97 (1,67-2,51), $p=0,002$.

Tabelul 9. Nivelul bazal al acizilor grași saturați, mono- și polinesaturați măsurați în plasmă la pacienții cu AVC comparativ cu lotul control.

AG plasma (μg/ml) mediana (IQR)	Pacienți AVC (n=65)	Grupul control (n=40)	p
Acizi grași saturați			
Palmitic acid	282,59 (220,04-395,16)	248,84 (226,82-281,22)	0,083
Stearic acid	137,22 (83,41-187,94)	181,37 (155,96-205,84)	<0,001
Lauric acid	2,12 (0,99-3,55)	4,20 (1,32-6,46)	<0,001
Acizi grași mononesaturați-ω9			
Oleic acid	736,86 (603,72-1047,41)	633,36 (535,01-727,15)	0,009
Acizi grași polinesaturați-ω6			
Linoleic acid	35,45 (27,21-46,22)	49,11 (46,47-59,83)	<0,001
Adrenic acid	0,47 (0,16-0,96)	1,35 (0,99-1,80)	<0,001
Arahidonic acid	26,43 (15,46-43,62)	24,58 (17,99-35,63)	0,942
Acizi grași polinesaturați-ω3			
EPA	0,037 (0,02-0,06)	0,043 (0,03-0,08)	0,051
DHA	3,10 (2,28-5,92)	7,86 (5,75-9,29)	<0,001
AA/DHA+EPA	9,09 (4,85-12,85)	3,52 (2,07-5,03)	<0,001

EPA-eicosapentaenoic acid; DHA-docosahexaenoic acid; AG-acizi grași; AA=arahidonic acid; datele sunt exprimate ca mediană și IQR (percentila 25%-percentila 75%); valoare p obținută prin aplicarea testului Mann-Whitney.

Tabelul 10. Nivelul bazal al acizilor grași saturați, mono- și polinesaturați măsurați în membrana eritrocitară la pacienții cu AVC comparativ cu lotul control.

AG membrana eritrocitară (μg/ml) mediana (IQR)	Pacienți AVC (n=65)	Grup control (n=40)	p
Acizi grași saturați			
Palmitic acid	124,12 (86,41-206,25)	136,65 (115,73-189,29)	0,362
Stearic acid	1,82 (1,22-2,88)	2,24 (1,67-3,08)	0,038
Lauric acid	0,23 (0,17-0,33)	0,31 (0,20-0,49)	0,027
Acizi grași mononesaturați-ω9			
Oleic acid	3,18 (1,90-5,75)	1,50 (1,13-2,19)	<0,001
Acizi grași polinesaturați-ω6			
Linoleic acid	3,27 (1,98-6,90)	2,47 (1,64-3,77)	0,076
Adrenic acid	6,44 (2,24-12,18)	4,49 (2,96-7,30)	0,200
Arahidonic acid	111,89 (43,75-199,38)	102,51 (59,70-138,69)	0,597
Acizi grași polinesaturați-ω3			
EPA	0,46 (0,17-1,07)	0,51 (0,20-0,86)	0,888
DHA	2,71 (1,03-9,28)	4,62 (3,19-6,19)	0,029
AA/DHA+EPA	31,44 (22,07-44,02)	19,9 (14,17-23,93)	<0,001
Omega 3 index	1,35 (0,73-2,30)	1,97 (1,67-2,51)	0,002

EPA-eicosapentaenoic acid; DHA-docosahexaenoic acid; AG-acizi grași; AA=arahidonic acid; datele sunt exprimate ca mediană și IQR (percentila 25%-percentila 75%); valoare p obținută prin aplicarea testului Mann-Whitney.

4.4.2. Relația dintre profilul lipidic și clasificarea AVC conform TOAST, respectiv severitatea ischemiei

Conform clasificării TOAST, tipul AT a reprezentat 58,8% (n=67) din cazuri, tipul CE 37,1% (n=43) și doar 3,4% (n=4) a reprezentat SVO. Concentrația serică a colesterolului total, LDL-colesterolului și ale trigliceridelor au fost mai mari în tipul AT comparativ cu tipul CE+SVO ($p=0,002$ pentru colesterol, $p=0,001$ pentru LDL-colesterol și $p=0,015$ pentru trigliceride). În schimb concentrațiile plasmatice ale AA și DHA au fost semnificativ mai mari în tipul CE+SVO (37,11 (IQR: 18,59-58,16)) față de tipul AT (20,68 (IQR: 13,75-32,99)), $p=0,011$ pentru AA și 3,78 (IQR: 2,89-6,25) versus 2,69 (IQR: 1,99-5,61) $p=0,037$ pentru DHA. Pentru restul acizilor grași luați în studiu nu au fost găsite diferențe semnificative ale concentrațiilor între tipurile de AVC conform clasificării TOAST, doar o tendință spre semnificație statistică pentru acidul lauric ($p=0,051$), linoleic ($p=0,083$) și adrenic ($p=0,067$), valorile fiind mai mari în tipul CE+SVO comparativ cu tipul AT.

În relație cu severitatea ischemiei evaluată cu NIHSS la internare nu au fost găsite diferențe semnificative ale acizilor grași, plasmatici sau membranari, între formele ușoare de AVC (NIHSS ≤ 4) și moderate/severe (NIHSS > 4), în schimb colesterolul total și LDL-colesterolul au fost semnificativ mai reduse la pacienții cu NIHSS > 4 ($p=0,011$ pentru colesterol total și $p=0,046$ pentru LDL-colesterol), pentru trigliceride tendința fiind aceeași, dar fără semnificație statistică ($p=0,066$).

4.4.3. Evaluarea profilului lipidic în relație cu mRS la externare

Analiza parametrilor lipidici în relație cu gradul de dizabilitate evaluat cu mRS la externare este sumarizată în Tabelul 11, fiind stratificată în funcție de instituirea terapiei cu statine după internare.

S-a observat că pacienții la care nivelurile colesterolului total și ale trigliceridelor sunt mai scăzute, prezintă mRS ≥ 3 la externare $p=0,028$ pentru trigliceride și $p=0,030$ pentru colesterol. Deoarece la majoritatea pacienților terapia hipolipemiantă a fost instituită după internare, iar analiza profilului lipidic a fost făcută în prima zi după debutul bolii, nu putem concluziona că aceste valori serice mai scăzute s-ar datora statinelor.

Nu au fost găsite diferențe în cazul acizilor grași între pacienții cu mRS < 3 și mRS ≥ 3 , cu excepția acidului stearic plasmatic. În acest caz, pacienții cu un deficit funcțional sever și mRS ≥ 3 au avut valori plasmatice ale acidului stearic semnificativ mai mari, cu mediana 158,9 (IQR 131,2-196,7) $\mu\text{g/ml}$, comparativ cu pacienții cu mRS < 3 cu mediana de 96,5 (IQR 68,4-167,8) $\mu\text{g/ml}$, $p=0,021$.

Tabelul 11. Analiza bivariată a profilului lipidic în relație cu deficitul funcțional evaluat cu mRS la externare

Parametrii demografici				
Număr total de pacienți	mRS externare			p
	n=114	<3 (n ₁ =72)	≥ 3 (n ₂ =42)	
Vârsta, ani (media ± SD)	71,7±10,2	69,4±9,6	75,7±10,1	0,001
Barbați (n, %)	49 (43%)	37 (51,4%)	12 (28,6%)	0,02
<i>Stratificarea pacienților în funcție de mRS la externare și terapia cu statine</i>				
Parametru (mg/dl)	statine	mRS <3	mRS ≥ 3	p
Colesterol total (media ± SD)	da(a) nu(b)	195,7±45,1 157,4±66,1	176,5 ±35,1 145,4 ±41,9	0,030 0,704
HDL-colesterol (media ± SD)	da(a) nu(b)	48,9±11,2 45,4±6,3	45,2±11,9 39,3±5,6	0,126 0,090
LDL-colesterol (media ± SD)	da(a) nu(b)	121,4±39,8 87,9±60,4	109,7±31,8 90,3±36,7	0,137 0,935
Trigliceride (mediana, IQR)	da(a) nu(b)	112,2(82,6-138,0) 99,7(86,5-161,4)	98,6(72,0-128,2) 84,2(76,0-84,7)	0,170 0,028

DS=deviația standard; n=numărul de cazuri; p-valoarea obținută prin testul χ^2 (Chi2) și testul t-Student pentru eșantioane independente cu varianțe egale, sau testul Mann-Whitney; (a grupul cu terapie cu statine: n1=64; n2=36; (b grupul fără terapie cu statine: n1=8; n2=6.

Pentru analiza de cale au fost folosite corelațiile Spearman (Tabelul 12); s-au observat corelații semnificative statistic între mRS la externare și variabilele incluse în modelul analizei de cale, acizii grași și terapia hipolipemiantă nefiind incluse ca variabile.

Tabelul 12. Corelațiile între variabilele analizate (analiza Spearman) (mRS la externare)

Variabile	1	2	3	4	5	6	7
Vârsta	1,00						
Sexul	0,05	1,00					
NIHSS internare	0,26*	0,09	1,00				
Trigliceride	-0,24*	-0,09	-0,20*	1,00			
HDL-colesterol	-0,08	0,08	-0,13	-0,24*	1,00		
Colesterol total	-0,25*	-0,10	-0,25*	0,45*	0,26*	1,00	
mRS externare	0,33*	0,21*	0,69*	-0,24*	-0,20*	-0,24*	1,00

*coeficient de corelație Spearman semnificativ ($p < 0,05$)

În figura 13 este descrisă asocierea dintre variabilele incluse în modelul analizei de cale; săgețile unilaterale descriu direcția variabilelor exogene spre cele endogene, în timp ce săgețile bilaterale indică corelațiile dintre variabilele incluse în model. Din diagrama de cale s-a observat că valori crescute ale HDL-colesterolului și trigliceridelor se asociază cu un mRS mai mic la externare ($\beta = -0,229$ pentru HDL-colesterol și $\beta = -0,190$ pentru trigliceride), în timp ce colesterolul total nu prezintă asociere semnificativă ($\beta = -0,055$). După ajustare pentru vârstă și sex, severitatea ischemiei la internare prezintă asociere pozitivă cu mRS ($\beta = 0,263$).

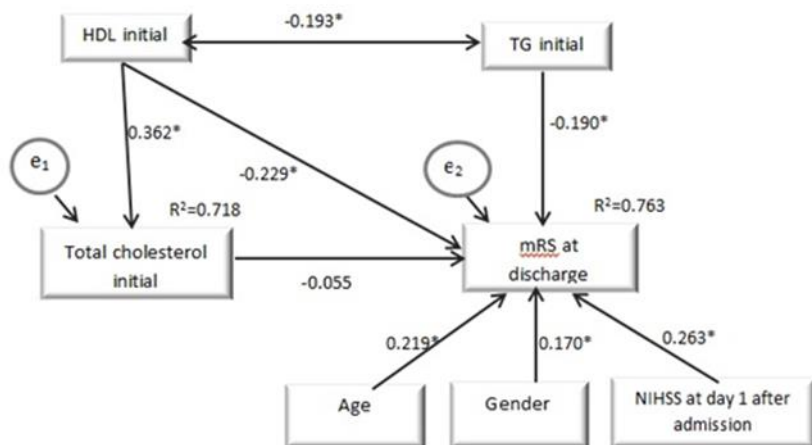


Figura 13 Diagrama analizei de cale pentru modelul testat cu mRS evaluat la externare.

Coeficientul de cale standardizat (β_i) și varianțele reziduale (e_i) pentru variabilele dependente. HDL-colesterol; TG= trigliceride; mRS=scala Rankin modificată; NIHSS=National Institute of Health Stroke Scale; nivelul de semnificație pentru coeficientul de cale $p < 0,05$

4.4.4. Evaluarea profilului lipidic în relație cu mRS la 3 luni

Analiza stratificată în funcție de terapia cu statine și mRS la 3 luni, a arătat faptul că pacienții cu mRS ≥ 3 evaluat la 3 luni prezentau nivele semnificativ mai reduse ale trigliceridelor indiferent de prezența sau absența terapiei cu statine, în timp ce colesterolul total și HDL-colesterolul au fost semnificativ mai reduse la pacienții cu mRS ≥ 3 cu terapie instituită după episodul ischemic (Tabelul 13).

Tabelul 13. Analiza bivariată a relației dintre profilul lipidic la internare și mRS la 3 luni, cu stratificare în funcție de terapia hipolipemiantă instituită după internare.

Parametru (mg/dl)	mRS 3 luni			p
	Statine	mRS < 3 (n ₁ =66)	mRS ≥ 3 (n ₂ =23)	
Colesterol total (media \pm DS)	da(a)	199,5 \pm 42,9	161,2 \pm 35,3	0,001
	nu(b)	157,4 \pm 66,0	136,1 \pm 39,3	0,530
HDL-colesterol (media \pm DS)	da(a)	49,4 \pm 11,1	45,6 \pm 10,9	0,204
	nu(b)	45,4 \pm 6,3	38,0 \pm 5,1	0,052
LDL-colesterol (media \pm DS)	da(a)	124,3 \pm 39,1	99,1 \pm 33,3	0,016
	nu(b)	88,0 \pm 60,4	82,2 \pm 34,5	0,851
Trigliceride (mediana, IQR)	da(a)	114,8(85,0-137,0)	74,7(69,0-99,5)	<0,0001
	nu(b)	99,7(86,5-161,4)	84,4(84,0-84,7)	0,045

DS=deviația standard; p-obținut după analiza cu Student-t pentru grupuri cu varianțe egale sau Mann-Whitney exact test; (a grupul cu terapie cu statine: n₁=58; n₂=18; (b grupul fără terapie cu statine: n₁=8; n₂=5.

Pentru analiza de cale s-au folosit corelațiile Spearman descrise în Tabelul 14; se observă corelații semnificative statistic pentru majoritatea variabilelor luate în calcul și mRS la 3 luni.

Tabelul 14. Corelațiile dintre variabilele analizate, analiza Spearman (mRS la 3 luni)

Variabile	1	2	3	4	5	6	7	8
Vârsta	1,00							
Sexul	0,05	1,00						
NIHSS ziua1	0,26*	0,09	1,00					
Trigliceride	-0,24*	-0,09	-0,20*	1,00				
HDL-colesterol	-0,08	0,08	-0,13	-0,24*	1,00			
Colesterol	-0,25*	-0,10	-0,25*	0,45*	0,26*	1,00		
mRS ext	0,33*	0,21*	0,69*	-0,24*	-0,20*	-0,24*	1,00	
mRs 3 luni	0,46*	0,11	0,66*	-0,40*	-0,16	-0,34*	0,92*	1,00

*coeficient de corelație semnificativ ($p < 0,05$)

Modelul testat și descris în Figura 14 a avut o bună adecvare la date (statistica $\chi^2 = 6,94$; $df=5$; $\chi^2/df=1,39 < 2$, factorul de corecție Satorra–Bentler=0,86, $p=0,225$), RMSEA robustă=0,071, $p=0,325$ pentru ipoteza nulă ca $RMSEA \leq 0,05$, SRMR=0,045, CFI =0,980, și TLI =0,941. A existat o dependență liniară negativă semnificativă statistic între colesterol și mRS la 3 luni, pacienții cu un grad mai mare de dizabilitate având la internare valori mai reduse ale colesterolului ($\beta=-0,17$, $p=0,031$). În plus, mRS pe termen lung s-a corelat liniar pozitiv cu severitatea ischemiei evaluată cu NIHSS la internare ($\beta=0,55$, $p<0,001$) și cu vârsta ($\beta=0,22$, $p=0,001$) (Figura 14).

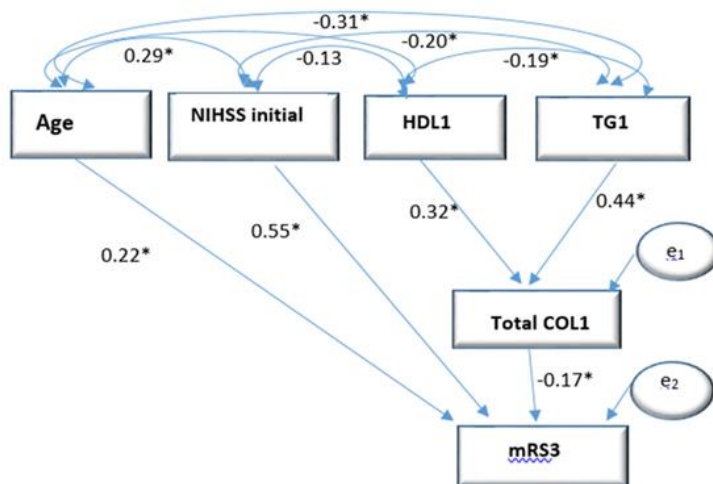


Figura 14. Diagrama de cale dintre profilul lipidic și prognosticul dizabilității pe termen lung, evaluat cu mRS la 3 luni pentru pacienții sub tratament cu statine instituit după internare.

Modelul descrie coeficienții standardizați de cale (β) și varianța reziduală pentru variabilele dependente (e). HDL1=HDL-colesterol ziua 1 de la internare; TG1= trigliceride ziua 1 de la internare; COL1= colesterol

ziua 1 de la internare; mRS3=scala Rankin modificată, evaluată la 3 luni de la externare.* coeficient de semnificație ($p<0,05$). (*in press Archives of Medical Science* 2018).

4.5. Discuții

Studiul și-a propus analiza extinsă a profilului lipidic în cazul pacienților cu AVC ischemice, atât în comparație cu un lot de control, dar și în relație cu deficitul funcțional evaluat cu mRS la externare și la 3 luni.

Datorită faptului că valorile serice crescute ale lipidelor sunt implicate în patologia cardio-cerebro-vasculară, terapia hipolipemiantă este recomandată atât în prevenția primară cât și secundară a AVC [31,144]. Totuși, în ceea ce privește concentrația lipidelor în faza acută a ischemiei cerebrale, datele din literatură sunt contradictorii și surprinzătoare. În 2013 a fost descris de către Jain și colab. "paradoxul trigliceridelor" din ischemia cerebrală după un studiu pe un număr reprezentativ de pacienți cu AVC ischemic. Astfel concentrația scăzută a trigliceridelor la debutul ischemiei cerebrale a fost asociată cu forme mai severe și un grad mai mare de dizabilitate la externare, dar după ajustarea pentru vârstă, sex și NIHSS și-a pierdut semnificația predictivă pentru disfuncția motorie [34]. Un alt studiu prezintă o asociere non-liniară, în forma literei J între trigliceride și gradul de dizabilitate, precizând că atât hipo- cât și hiper-trigliceridemia sunt factori favorizanți pentru un prognostic nefavorabil cu deteriorare neurologică [145]. Un studiu caz-control a arătat că nivelul trigliceridelor și HDL-colesterolului sunt semnificativ mai scăzute la pacienții ischemici comparativ cu lotul control, totuși pacienții cu concentrații mari ale trigliceridelor prezentând un grad mai mare de severitate [133].

În studiul de față, trigliceridele serice au fost semnificativ mai reduse la pacienții ischemici comparativ cu lotul martor ($p=0,038$), valori reduse fiind înregistrate la pacienții cu mRS ≥ 3 ($p=0,053$), indiferent de instituirea terapiei cu statine. Colesterolul total și HDL-colesterolul au fost de asemenea mai reduse la pacienți comparativ cu lotul martor ($p=0,0005$ pentru colesterol și $p=0,016$ pentru HDL-colesterol). Statusul nutrițional deficitar ar fi o explicație pentru formele mai severe/cu grad crescut de dizabilitate [146]. Asocierea dintre nivelul crescut al colesterolului total și evoluția favorabilă din punct de vedere al deficitului motor, poate avea mai multe raționamente: reducerea efectelor neurotoxice prin creșterea activității GGT și asimilarea aminoacizilor [147], efectul antioxidant prin neutralizarea radicalilor liberi [148], precum și creșterea toleranței la anoxie [149]. Rezultatele prezentului studiului sunt în concordanță cu date din literatură, concentrații crescute ale colesterolului regăsindu-se la pacienții cu evoluție favorabilă. Un studiu recent sugerează o rată redusă a mortalității în rândul pacienților cu AVC ischemic cu hiperlipemie, indiferent de prezența sau absența terapiei hipolipemiante [32].

Folosirea analizei de cale a permis testarea unui model ipotetic care implică relația de interdependență și asociere dintre profilul lipidic și mRS la 3 luni, respectiv predicția dizabilității pe termen lung. Pentru predicția la 3 luni, mRS la externare nu a fost inclus în analiza modelului de cale, datorită coliniarității cu mRS la 3 luni (coeficient de corelație de 0,92, $p < 0,05$); în plus modelul a fost aplicat doar pentru pacienții care prezentau terapie cu statine după internare, numărul celor fără terapie instituită fiind prea mic. În urma analizei de cale am constatat că valori serice crescute ale HDL-colesterolului și ale trigliceridelor se asociază semnificativ cu un mRS mai mic la externare după ajustare pentru sex, vârstă și NIHSS la internare. Astfel, cei mai importanți predictorii ai mRS la externare rămân (în ordinea semnificației): NIHSS la internare, HDL-colesterolul și trigliceridele.

Analiza prognosticului dizabilității la 3 luni a demonstrat o relație liniară negativă între mRS și colesterol, pacienții cu un grad mai mare de dizabilitate având valori mai reduse ale acestui parametru, precum și o asociere pozitivă între NIHSS la internare și vârstă, valori mai mari ale acestor variabile determinând un grad mai mare de dizabilitate.

Astfel, pentru mRS la trei luni, cei mai importanți predictorii sunt NIHSS la internare, urmat de vârstă și colesterol total.

În ceea ce privește profilul plasmatic și membranar eritrocitar al acizilor grași, acesta prezintă diferențe semnificative între pacienți și lotul martor, fără diferențe relevante între formele ușoare/severe de boală. Acidul adrenic plasmatic este semnificativ mai redus la pacienți comparativ cu lotul control ($p < 0,001$), faptul că în condiții de stres oxidativ servește ca substrat pentru F2-dihomo-IsoPs (izoprostan) [150], fiind o explicație rezonabilă. Face parte din grupul acizilor ω -6 PUFA, prezent în abundență în glandele adrenale dar și în țesutul cerebral; poate fi sintetizat din AA prin elongare și reconvertit în AA prin beta-oxidare. Are rol în modularea tonusului vascular în regiunile unde se găsește din abundență, participând la reglarea fluxului sanguin, așa cum arată un studiu experimental [151]. Un nivel redus al acidului adrenic la pacienții cu ischemie cerebrală comparativ cu lotul control poate însemna o reducere a gradului de relaxare a tonusului vascular în regiunile unde acesta se regăsește din abundență, inclusiv la nivel cerebral.

De asemenea acidul linoleic este semnificativ mai redus la pacienți comparativ cu lotul martor ($p < 0,001$); un studiu caz control a sugerat rolul protectiv al acidului linoleic prin reducerea TA, reducerea nivelului colesterolului și al indicelui de masă corporală [152].

ω -3 PUFA (EPA și DHA) considerați ca având rol protectiv asupra țesutului nervos, sunt în concentrație mai redusă în rândul pacienților comparativ cu lotul control, cu semnificație statistică pentru DHA ($p < 0,001$) și la pragul de semnificație pentru EPA ($p = 0,051$). Mai important decât concentrațiile individuale este poate

raportul dintre AA/DHA+EPA, semnificativ mai mare la pacienți față de lotul control atât în plasmă cât și în membrana eritocitară ($p < 0,001$), balanța fiind astfel înclinată spre efectele proinflamatoare distructive ale AA și mai puțin spre cele benefice ale ω -3 PUFA. AA reprezintă componenta principală a fosfolipidelor, cu rol important în reglarea funcționalității mebranare, dar și în furnizarea unor metaboliți cu rol preponderent pro-inflamator și protrombotic [137]. Astfel, sub acțiunea fosfolipazei A2 activate, se sintetizează și se eliberează mediatori precum prostaglandinele și tromboxanii pe căile mediate de COX, respectiv leucotriene și lipoxinele pe căile mediate de LOX [153,154]. Un raport crescut ω -6/ ω -3 PUFA se asociază cu creșterea citokinelor proinflamatoare, creșterea vâscozității sângelui și augmentarea agregabilității plachetare cu hipoperfuzie cerebrovasculară consecutivă [155]. Analiza relației dintre raportul ω -3 PUFA/ ω -6 PUFA și deteriorarea neurologică rapidă (END) după AVC ischemic, a relevat o asociere negativă semnificativă statistic între cele două variabile, sugerând rolul agravant al ω -6 PUFA în evoluția pacienților în faza acută a AVC [156].

Cu excepția acidului stearic, nici un alt acid gras studiat nu prezintă diferențe între grupurile de pacienți cu mRS < 3 și ≥ 3 . Acidul stearic este un acid gras saturat care se regăsește cu precădere în grăsimile de origine animală, a cărui concentrație plasmatică a fost semnificativ mai crescută la pacienții cu mRS ≥ 3 ($p = 0,021$). Nu sunt date recente în literatură care să investigheze mecanismul influenței acidului stearic asupra evoluției pacienților cu AVC ischemic. Un posibil mecanism ar putea fi activarea factorului XII [157], care pe lângă inițierea cascadei coagulării ar fi implicat și în activarea inflamației pe calea sistemului kaliceină-kinină [158,159]. Totuși, un studiu relativ recent care a evaluat asocierea dintre markerii inflamatori și profilul plasmatic al acizilor grași, a arătat faptul că acidul stearic în concentrație relativă (%) se corelează invers cu hsCRP și RANTES, sugerând un posibil efect neutru sau antiinflamator; în schimb la evaluarea în concentrație absolută ($\mu\text{g/ml}$), corelația devine pozitivă cu hsCRP și nesemnificativă pentru RANTES [160].

Deși studiul nostru și-a propus investigarea profilului acizilor grași la pacienții cu AVC ischemic în rândul populației din România, are câteva limitări. Astfel, nu a fost posibilă evaluarea în dinamică a parametrilor luați în studiu, existând posibilitatea ca unii dintre ei să fie influențați după trecerea fazei acute a bolii. Alte limitări au fost neevaluarea acizilor grași din lichidul cefalorahidian, precum și dimensiunea relativ redusă a eșantionului și preponderența formelor ușoare de ischemie.

4.6. Concluzii

Indexul Omega-3 este relativ scăzut în populația investigată, cu mult sub media recomandată; în plus, valoarea sa este semnificativ mai redusă la pacienții care au

suferit un episod ischemic acut, comparativ cu martorii. Nivelul DHA plasmatic și membranar a fost semnificativ mai redus la pacienți comparativ cu lotul martor. Nivelul plasmatic crescut al acidului stearic se asociază cu un grad crescut de dizabilitate la externare. Pacienții cu niveluri mai reduse ale colesterolului total la internare au prezentat un grad mai mare de dizabilitate la externare, în timp ce un grad mare de dizabilitate la trei luni se asociază cu valori mai reduse ale trigliceridelor, indiferent de prezența terapiei hipolipemiante. După ajustarea pentru vârstă și sex, cei mai importanți predictorii ai mRS la externare rămân NIHSS la internare, urmat de HDL-colesterol și trigliceridele serice, în timp ce pentru predicția la 3 luni, NIHSS la internare, vârsta și colesterolul total sunt cei mai relevanți predictorii.

5. Utilizarea tehnologiei Biochip Array în predicția gradului de dizabilitate după AVC ischemice (studiul 3)

5.1. Introducere

În patologia accidentelor vasculare ischemice inflamația, producerea ROS, activarea cascadei caspazelor precum și alterarea influxului de calciu duc în final la apoptoză și neurodegenerare. Multitudinea de mecanisme implicate atât în neurodegenerare cât și în neuroprotecție deschide calea pentru investigarea unui număr impresionant de biomarkeri periferici, cu importanță în evaluarea subtipului de AVC ischemic, a căilor patogenice, a severității și predicției gradului de dizabilitate, dar și în evaluarea predicției răspunsului la terapie sau la apariția complicațiilor [37].

Astfel, numeroase studii investighează relația proteinei C reactive - sau a formei ultra-senzitive [48,161], a NGAL [162] sau a receptorilor pentru TNF-alfa cu severitatea sau gradul de dizabilitate după AVC. D-Dimerii – markeri ai fibrinolizei secundare - sunt analizați în contextul tipului cardioembolic [72], în timp ce NSE ca potențial marker al gradului de neurodistrucție, singular sau în asocieri [163,164].

Până în prezent nici un biomarker periferic nu a fost validat pentru utilizarea de rutină în managementul precoce al pacientului cu AVC ischemic. În acest context, identificarea unui panel de markeri care ar permite investigarea simultană a unor parametri implicați în multiplele procese fiziopatologice din faza acută a ischemiei cerebrale, ar oferi informații valoroase clinicianului referitor la severitatea ischemiei, evoluția gradului de dizabilitate sau răspunsul la terapie.

5.2. Ipoteză/Obiective

Tehnologiile avansate de la momentul actual permit evaluarea unor biomarkeri în sistem biochip array, oferind astfel informații coroborate despre procesele multiple din faza acută a ischemiei cerebrale. Utilizarea unui panel de markeri multiplex permite cuantificarea simultană a unui număr mare de proteine dintr-un volum mic de probă, timpul necesar determinărilor dar și costurile fiind mai reduse, cu impact pozitiv asupra bugetului de sănătate.

Scopul studiului a fost evaluarea utilității unui panel de biomarkeri periferici în predicția severității și a gradului de dizabilitate la 3 luni de la externare a pacienților

cu AVC ischemic. Parametrii incluși în panel oferă relații despre statusul inflamator (CRP, NGAL, sTNFR-1), degradarea neuronală (NSE) și fibrinoliza secundară (D-Dimerii) din faza acută a AVC ischemic.

5.3. Material și metodă

În studiu au fost recrutați 124 de pacienți care s-au prezentat în intervalul de 72 ore de la debut cu simptomatologie de AVC ischemic. Dintre aceștia, doar 114 au îndeplinit toate criteriile de includere în studiu; lotul control a fost reprezentat de 40 de persoane potrivite ca vârstă și sex cu lotul de pacienți.

Evaluarea clinică

Pe baza evaluării cu scala NIHSS, pacienții au fost împărțiți în cei cu formă ușoară (NIHSS ≤ 7) și cu formă severă cu NIHSS >7 . Clasificarea etiopatogenică a acestora a fost făcută conform clasificării TOAST (Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment) în tipul AT, CE, și SVO; dintre pacienții recrutați nefiind nici unul de cauză neelucidată. După evaluarea deficitului funcțional cu mRS, pacienții au fost grupați în: evoluție favorabilă (mRS între 0-2) și evoluție nefavorabilă (mRS între 3-6).

Determinările de laborator și recoltarea probelor

Pentru determinările de laborator heparina sodică a fost folosită ca și anticoagulant, după centrifugare plasma fiind separată și păstrată la -80 grade C până la efectuarea măsurătorilor. Pentru determinarea multiplex a celor cinci parametri a fost folosită tehnologia Biochip array (BAT) cu trusa aferentă Randox Cerebral Array II (Randox Laboratories, UK), analizor Evidence Investigators (Randox, UK). Tehnica BAT presupune prezența unei faze solide, reprezentată de un biochip ceramic de 9x9 mm care prezintă pe suprafața sa multiple regiuni de testare (discrete test regions - DTRs), fiecare parametru având un DTR specific. În vederea reducerii variabilității inter-lot, precum și pentru optimizarea cuplării anticorpilor, suprafața de reacție a biochipului a fost silanizată. Acest proces presupune acoperirea suprafeței cu molecule silan-like (compus anorganic), devenind astfel inertă din punct de vedere chimic, facilitând o legare uniformă și controlată a anticorpilor monoclonali, printr-un proces de nano-dispersie complet automat la nivelul DTS. După aplicarea anticorpilor pe biochip acesta este inclus în unitatea de testare, fiecare unitate de testare având 9 biochipuri permițând evaluarea a 9 pacienți simultan, pentru un număr determinat de parametri. Detecția finală se bazează pe o reacție de chemiluminiscență, lumina emisă la nivelul DTR fiind captată de o cameră CCD (charge-coupled device) care o transformă în semnal electric proporțional cu intensitatea luminoasă. Rezultatele sunt interpretate pe curba de calibrare generată pentru fiecare analit în parte.

Intervalele de măsurare și limitele de detecție pentru parametrii investigați au fost: 0-200 ng/ml respectiv 0,26 ng/ml pentru NSE; 0-2000 ng/ml respectiv 17,80 ng/ml pentru NGAL; 0-12 mg/L respectiv 0,67 mg/L pentru CRP; 0-50 ng/ml respectiv 0,24 ng/ml pentru sTNFR-1 și 0-2000 ng/ml respectiv 2,10 ng/ml pentru D-Dimeri. Deoarece intervalul de măsurare pentru CRP a fost relativ redus, adițional am măsurat și hsCRP prin metoda imunoturbidimetrică (hsCRP vario, Architect 4000 Abbott Laboratories) cu intervalul de măsurare 0,1-160 mg/L, limita de detecție de 0,1 mg/L și coeficienții de variație intra- și inter- run <4%.

Analiza statistică

Datele au fost prelucrate cu mediul avansat de programare statistică și grafică R (v.3.4.0 Vienna, Austria). Testul Shapiro-Wilk a fost utilizat pentru evaluarea normalității distribuției variabilelor continue (NGAL, CRP, NSE, D-Dimeri și sTNFR-10). Compararea grupurilor a fost realizată cu ajutorul testelor Student-t (rezultatele fiind exprimate ca medie \pm DS) și Mann-Whitney (rezultatele fiind exprimate ca mediană \pm IQR). Asocierea a două variabile calitative a fost obținută din analiza tabelelor de contingență și a testelor Chi-pătrat (χ^2) sau testul exact al lui Fisher, în timp ce evaluarea impactului markerilor periferici asupra evoluției nefavorabile a fost testată utilizând regresia logistică binomială. Mărimea efectului a fost calculată cu ajutorul raportului șanselor OR (odds ratio), în formă neajustată și ajustată, cu intervalul de încredere de 95% asociat. Toți parametrii au fost analizați atât individual cât și în relație cu factorii de risc cunoscuți pentru evoluția nefavorabilă (evaluată cu mRS la 3 luni de la externare). Au fost create modele de regresie logistică separate pentru fiecare analit/parametru de laborator, aceștia fiind transformați în variabile calitative ordinale (folosind tertile). Necesitatea utilizării tertilelor a fost impusă și de obiectivul studiului - acela de a sublinia asocierea pozitivă dintre valorile crescute ale parametrilor și gradul de dizabilitate al pacienților cu AVC.

Modelul 1: parametrii biochipului + variabilele demografice (vârsta și sexul)

Modelul 2: Modelul 1 + NIHSS la internare

Modelul 3: Modelul 2 + variabilele clinice cunoscute (clasificare TOAST, DZ, dislipidemia, boli cardiovasculare, AVC în antecedente, terapiile asociate, stenoza carotidiană, tensiunea arterială sistolică și diastolică, LDL-colesterolul, glicemia, numărul de limfocite). Au fost considerați factori de risc semnificativi aceia care au avut o frecvență de minim 5 cazuri/eveniment și un nivel de semnificație la regresia univariată $p \leq 0,25$. Condiția ca un parametru să fie predictor independent semnificativ a fost ca intervalul de încredere de 95% pentru OR să nu îl includă pe 1.

Deoarece parametrii determinați prin metoda BAT și evaluarea mRS la 3 luni au fost disponibile doar la 56 dintre pacienți, s-a folosit metoda înlocuirii valorilor lipsă prin mediană, pentru a utiliza toate datele clinice disponibile.

Datorită eșantionului relativ mic, a fost studiat efectul combinat al celor cinci biomarkeri în relație cu deficitul funcțional nefavorabil, fără a face ajustarea pentru covariabilele utilizate în modelele descrise anterior, respectiv vârsta, sexul, severitatea la internare, dislipidemia, fibrilația atrială și antecedentele de AVC ischemic.

Curbele ROC (AUC) pentru fiecare model studiat au fost utilizate pentru a evalua capacitatea de discriminare între evoluția favorabilă și nefavorabilă din punct de vedere al deficitului funcțional la 3 luni de la externare; pragul de semnificație statistic fiind stabilit la 0,05.

5.4. Rezultate

Comparația distribuțiilor parametrilor de studiu la pacienți și lotul control

Din totalul pacienților eligibili, doar 89 au fost incluși în evaluarea finală a modelelor de predicție la 3 luni a gradului de deficit funcțional (doar pentru aceștia evaluarea la trei luni fiind disponibilă). În urma aplicării metodei de imputare statistică, care a presupus înlocuirea valorilor lipsă cu media (CRP, NGAL și NSE), respectiv mediana (sTNFR-1 și D-Dimeri) observată pentru fiecare grup, nu am constatat nici o diferență statistic semnificativă în ceea ce privește vârsta, sexul, NIHSS la internare și clasificarea TOAST, între pacienții cu și fără rezultate disponibile, așa cum reiese din Tabelul 15.

Tabelul 15. Analiza influenței lipsei rezultatelor pentru toți pacienții luați în studiu asupra caracteristicilor demografice și clinice.

	Pacienți cu date complete (n=56)	Pacienți cu date lipsă (n=33)	p
Vârsta (ani)	72,73±9,68	70,58±10,41	0,326
Sexul (femei,%)	28(50,00)	20(60,60)	0,332
NIHSS la internare	3,00(1,00-9,50)	4,00(3,00-5,00)	0,672
Clasificare TOAST			
AT n (%)	33(58,90)	18(54,50)	0,809
CE n (%)	21(37,50)	13(39,40)	
SVO n (%)	2(3,60)	2(6,10)	

* p obținut după aplicarea testului t-student, Mann-Whitney sau Chi2 (χ^2).

Analiza comparativă a biomarkerilor între lotul de pacienți și lotul martor este detaliată în Tabelul 16, analiza fiind făcută doar pe grupul de pacienți cu măsurători eligibile, fără a folosi metoda imputării statistice.

Tabelul 16. Analiza comparativă a biomarkerilor cuantificați prin BAT între lotul de pacienți și grupul control.

Parametru	Pacienți AVC (n=56)	Lot control (n=20)	p
CRP (mg/l)	6,03±3,93	3,37 ±3,02	0,004
D-Dimeri (ng/ml)	205,39 (140,63-336,36)	205,79 (121,83-348,68)	0,706
NGAL (ng/ml)	743,41±323,28	761,23 ±393,9	0,842
NSE (ng/ml)	15,91±8,81	15,01±11,17	0,715
sTNFR-1 (ng/ml)	1,01 (0,77-1,47)	0,91 (0,77-1,27)	0,520

NGAL=neutrophil gelatinase-associated lipocalin; NSE=enolaza neuron specifică; sTNFR-1=receptorul solubil 1 al TNF-alfa; datele au fost exprimate ca mediană (percentila 25%-percentila 75%), respectiv ca medie ± DS; p obținut după aplicarea testului Mann-Whitney.

5.4.2. Relația dintre biomarkeri și severitatea ischemiei

Analiza biomarkerilor în relație cu severitatea ischemiei este detaliată în Tabelul 17. Cu excepția NSE, restul parametrilor prezintă valori mai mari la pacienții cu ischemie severă comparativ cu cei cu formă ușoară evaluată cu NIHSS la internare. La externare scorul NIHSS a fost semnificativ mai mare la cei cu evoluție nefavorabilă ($p<0,001$), fără a exista o asocieră semnificativă între clasificarea TOAST și evoluția clinică nefavorabilă ($p=0,288$).

Tabelul 17. Relația parametrilor de laborator cu severitatea ischemiei evaluată cu NIHSS la internare

Parametrii	NIHSS ≤ 7	NIHSS > 7	p
D-Dimeri (ng/ml)	185,06 (171,30-245,06)	238,26 (202,50-521,43)	<0,001
NGAL (ng/ml)	729,66 (600,41-781,04)	774,31 (588,79-921,76)	0,362
NSE (ng/ml)	17,24 (12,31-17,24)	10,24 (8,69-14,55)	0,003
sTNFR-1 (ng/ml)	1,12 (0,85-1,19)	1,22 (0,91-1,76)	0,109
CRP (mg/L)	5,97 (3,50-7,39)	9,55 (5,09-11,32)	0,015
hsCRP (mg/L)	4,5 (2,25-11,57)	9,15 (4,95-12,63)	0,098

Valorile sunt exprimate ca mediană (percentila 25%-percentila 75%); p obținut după aplicarea testului Mann-Whitney.

5.4.2. Relația dintre biomarkerii analizați și mRS la 3 luni

Parametrii demografici, clinici și de laborator pentru grupul de pacienți studiați sunt detaliați în Tabelul 18; se observă că vârsta pacienților cu evoluție spre deficit funcțional nefavorabil a fost semnificativ mai avansată în comparație cu cei fără deficit funcțional semnificativ ($p<0,001$), în timp ce distribuția pe sexe a fost asemănătoare între grupurile analizate ($p=0,145$).

Tabelul 18. Analiza comparativă a parametrilor demografici, clinici și de laborator între pacienții cu mRS < 3 și mRS ≥ 3 evaluați la 3 luni de la externare.

	Pacienți AVC (n=89)	mRS < 3 (n=67)	mRS ≥ 3 (n=22)	p*
Vârsta (ani) ^a	71,9±10	69,5±9,6	79,4±6,8	<0,001
Sexul (femei, %)	48(53,9)	33(49,3)	15(68,2)	0,145
NIHSS internare ^b	4(1-6)	3(1-4)	9,5(5-14)	<0,001
Clasificare TOAST				
AT n(%)	51(57,3)	40(59,7)	11(50,0)	0,288
CE n(%)	34(38,2)	23(34,3)	11(50,0)	
SVO n(%)	4(4,5)	4(6,0)	0(0,0)	
HTA (%)	87(97,8)	65(97,0)	22(100,0)	1,000
DZ (%)	19(21,3)	16(23,9)	3(13,6)	0,382
FA(%)	34(38,2)	23(34,3)	11(50,0)	0,214
Dislipidemie (%)	42(47,2)	35(52,2)	7(31,8)	0,096
IRC(%)	4(4,5)	3(4,5)	1(4,5)	1,000
BPOC (%)	20(22,5)	18(26,9)	2(9,1)	0,139
Fumători (%)	24(27,6)	22(33,3)	2(9,5)	0,048
Antecedent AVC (%)	27(30,3)	18(26,9)	9(40,9)	0,285
Tromboze(%)	13(14,6)	12(17,9)	1(4,5)	0,173
Stenoza carotidă(%)	34(47,2)	30(49,2)	4(36,4)	0,522
CIC(%)	81(91,0)	61(91,0)	20(90,9)	0,522
Aspirina (%)	15(23,1)	10(22,7)	5(23,8)	0,923
Antiagregante plachetare (%)	8(12,5)	6(13,6)	2(10,0)	1,000
Statine (%)	64(98,5)	45(100,0)	19(95,0)	0,308
Inhibitori ECA(%)	38(79,2)	23(74,2)	17(100,0)	0,459
Beta blocante (%)	21(48,8)	15(53,6)	6(40,0)	0,526
Blocante canale Ca (%)	6(15,4)	2(8,0)	4(28,6)	0,163
TA s (mmHg)	159,9±26,6	161,7±26,6	154,8±26,5	0,298
TA d (mmHg)	90,5±14,5	90,6±14,8	89,9±13,7	0,657
Gluczoa(mg/dl)	104,5 (92,9-118,4)	105,4 (95,0-118,5)	100,9 (89,0-112,9)	0,147
LDL-col(mg/dl)	112,1±43,9	118,1±45,4	93,9±33,5	0,024
Limfocite x 103/mm3	1,8±0,6	1,9±0,7	1,5±0,5	0,007

a=media±DS; b=mediana (IQR); AT=aterotrombotic; CE=cardioembolic; SVO=patologia vaselor mici; HTA=hipertensiune arterială; DZ=diabet zaharat; FA=fibrilație atrială; IRC=insuficiență renală cronică; BPOC= bronhopneumopatie cronică obstructivă; AVC=accident vascular cerebral; CIC=cardiopatie ischemică cronică; ACE=enzima de conversie a angiotensinei; TAs=tensiunea arterială sistolică; TAd=tensiunea arterială diastolică; LDL-colesterol. Rezultate publicate în Acta Pharmacologica Sinica 2018; 39 (7): 1228-1236 [165].

În urma analizei comparative a parametrilor luați în studiu (Tabelul 19), s-a observat că pacienții cu mRS favorabil la 3 luni de la externare prezintă valori semnificativ mai mici pentru D-Dimeri ($p<0,001$), sTNFR-1($p<0,001$) și hsCRP ($p=0,047$), în timp ce pentru NGAL și CRP nu a fost atins pragul de semnificație statistic, în schimb concentrația NSE a fost semnificativ mai mare în grupul cu evoluție favorabilă ($p=0,004$).

Tabelul 19. Analiza comparativă a parametrilor analizați cu panelul biochip array și a hsCRP la pacienții cu evoluție favorabilă și nefavorabilă a dizabilității, evaluată cu mRS la 3 luni.

Parametrii laborator	Pacienți AVC (n=89)	mRS <3 (n=67)	mRS ≥ 3 (n=22)	p
D-Dimeri (ng/ml)	185,1 (185,06-245,06)	185,1 (166,33-203,61)	245,1 (230,09-331,20)	<0,001
NGAL(ng/ml)	742,4±255,91	729,7±256,33	781,7±256,60	0,417
NSE (ng/ml)	15,9±8,81	17,2±7,28	12,3±4,89	0,004
sTNFR1(ng/ml)	1,1(0,90-1,31)	1,1(0,83-1,12)	1,5(1,15-1,52)	<0,001
CRP (mg/L)	6,3±3,23	6,0±3,22	7,4±3,09	0,073
hsCRP (mg/L)	5,0 (3,00-12,00)	5,0 (2,00-10,00)	9,0 (4,00-14,00)	0,047

Datele sunt exprimate ca mediană și IQR sau medie±DS; p obținut în urma analizei cu Student t-test, Mann-Whitney sau Chi2 (χ^2).

Regresia logistică univariată a evidențiat faptul că CRP, D-Dimerii, NGAL și sTNFR-1 sunt predictori semnificativi pentru mRS nefavorabil la 3 luni, așa cum reiese din Tabelul 20, respectiv din curbele ROC aferente descrise în Figura 15, unde a fost testată evoluția capacității predictive nefavorabile după adăugarea fiecărui biomarker analizat la modelul clinic bazal. În urma analizei multivariate unii parametri și-au pierdut capacitatea predictivă (Tabelul 21).

Tabelul 20. Analiza univariată și multivariată a asocierii dintre parametrii evaluați în ziua 1 de la debutul bolii și mRS evaluat la 3 luni de la externare.

Model	OR(95% CI)			P
	T1	T2	T3	
CRP				
	≤2,86	2,86-9,48	≥9,48	
Model 1		0,33(0,06-1,85)	4,31(1,30-14,27)	0,002
Model 2		0,44(0,06-3,45)	4,42(1,06-20,42)	0,023
Model 3		0,62(0,07-5,30)	4,48(0,95-21,11)	0,046
D-dimerii				
	≤170,84	170,84-246,93	≥246,93	
Model 1		1,21(0,20-7,23)	11,43(2,26-57,80)	<0,001
Model 2		1,06(0,12-9,46)	10,40(1,38-78,16)	0,007
Model 3		1,12(0,11-11,22)	10,85(1,28-91,84)	0,015
NSE				
	≤10,01	10,01-16,83	≥16,83	
Model 1		0,57(0,20-1,66)	0,43(0,10-1,89)	0,438
Model 2		2,53(0,52-2,31)	0,98(0,11-8,94)	0,448
Model 3		2,27(0,44-11,83)	0,60(0,05-6,55)	0,418
NGAL				
	≤566,43	566,43-853,86	≥853,86	
Model 1		0,11 (0,02-0,95)	2,75(0,90-8,37)	0,006
Model2		0,20 (0,02-2,28)	3,20(0,70-14,58)	0,050
Model3		0,21 (0,02-2,62)	3,10(0,65-14,68)	0,071
sTNFR-1				
	≤0,82	0,82-1,21	≥1,21	
Model 1		0,45 (0,08-2,65)	7,14(1,99-25,59)	<0,001
Model2		0,47 (0,06-3,95)	7,43(1,12-49,18)	0,012
Model3		0,50 (0,06-4,57)	7,16(1,03-49,76)	0,024

T1=tertila 1; T2=tertila 2; T3=tertila 3; Model 1: modelul clinic bazal ajustat pentru vârstă și sex; Model 2: ajustat pentru variabilele din Modelul 1 + NIHSS la internare; Model 3: ajustat pentru variabilele din

Modelul 2+ dislipidemia, FA și AVC în antecedent. Rezultate publicate în *Acta Pharmacologica Sinica* 2018; 39 (7): 1228-1236 [165].

Se observă că CRP este un predictor semnificativ după ajustarea pentru vârstă, sex și severitatea ischemiei evaluată cu NIHSS (OR=4,42; 95% CI:1,06-20,42; $p=0,023$), dar după ajustarea pentru variabilele clinice (dislipidemie, fibrilație atrială, AVC în antecedente), rămâne doar cu o tendință spre semnificație statistică (OR=4,43; 95% CI:0,95-21,11; $p=0,046$).

D-Dimerii rămân predictori semnificativi atât după ajustarea pentru vârstă, sex și NIHSS la internare (modelul 2) dar și după ajustarea pentru variabilele clinice din modelul 3 (OR=10,85; 95% CI:1,28-91,84, $p=0,015$). sTNFR-1 este un predictor semnificativ pentru un grad crescut de dizabilitate atât după ajustarea pentru vârstă, sex și NIHSS la internare, dar și după ajustarea pentru variabilele clinice luate în calcul, respectiv dislipidemia, FA și AVC în antecedente (OR=10,85; 95% CI:1,28-91,84, $p=0,024$).

NGAL individual prezintă o tendință spre semnificația statistică (OR=2,75; 95% CI:0,90-8,37), $p=0,006$, dar după ajustarea pentru variabilele demografice și clinice își pierde capacitatea de predicție (OR=3,20; 95% CI: 0,70-14,58). În urma analizei ROC, a fost testat efectul adăugării fiecărui biomarker individual la modelului clinic bazal asupra predicției gradului de dizabilitate (Figura 15).

După adăugarea CRP la modelul bazal s-a observat o îmbunătățire nesemnificativă a predicției ($p=0,153$ la testul DeLong): AUC=0,902; 95% CI: 0,837-0,966 pentru modelul bazal+CRP față de AUC=0,856; 95% CI: 0,771-0,940 pentru modelul fără CRP.

După adăugarea D-Dimerilor, predicția s-a îmbunătățit cu tendință spre semnificație statistică AUC=0,913; 95% CI: 0,856-0,970, ($p=0,088$ la testul DeLong).

Adăugarea sTNFR-1 a îmbunătățit capacitatea predictivă a modelului clinic bazal, cu tendință spre semnificație statistică: AUC=0,913; 95% CI: 0,844-0,970, $p=0,079$ (după aplicarea testului DeLong), în timp ce adăugarea NGAL nu a adus îmbunătățiri semnificative statistic modelului clinic bazal.

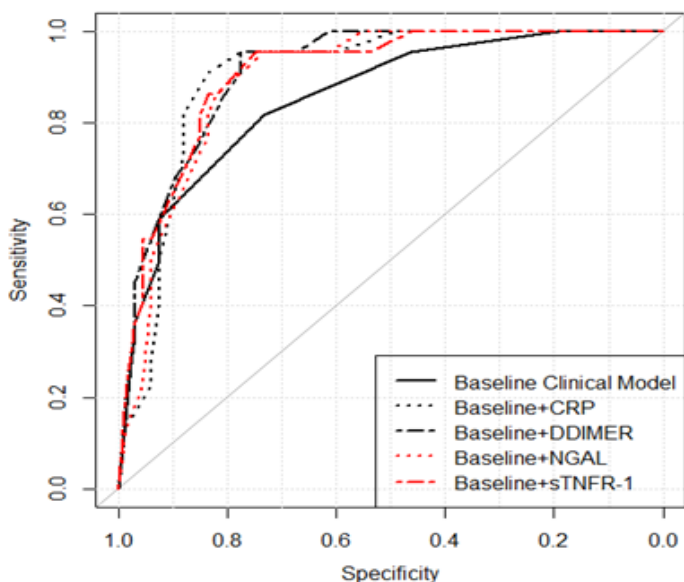


Figura. 15. Curbele ROC pentru fiecare parametru analizat în comparație cu modelul clinic bazal pentru predicția mRS nefavorabilă la 3 luni după AVC ischemic. Rezultate publicate în Acta Pharmacologica Sinica 2018; 39 (7): 1228-1236 [165]

După includerea în analiza multivariată a parametrilor găsiți cu semnificație la analiza univariată, doar D-Dimerii au rămas predictorii semnificativi independenți, valori mai mari de 246,93 ng/ml fiind predictive pentru mRs nefavorabil (Tabelul 21).

Tabelul 21. Modelul de regresie logistică multiplă pentru predicția mRS nefavorabilă.

Analit	OR (95% CI)	p
CRP (mg/L)		0,767
CRP T1 (< 2,86)	Referința	Referința
CRP T2 (2,86 - 9,48)	0,74 (0,06-9,39)	0,813
CRP T3 (> 9,48)	1,55 (0,33-7,39)	0,582
D-dimeri (ng/mL)		0,045
D-dimeri T1 (< 170,84)	Referința	Referința
D-dimeri T2 (170,84 - 246,93)	3,39 (0,35-32,81)	0,292
D-dimeri T3 (> 246,93)	8,36 (1,47-47,62)	0,017
NGAL (ng/mL)		0,333
NGAL T1(< 566,43)	Referința	Referința
NGAL T2 (566,43 - 853,86)	0,09 (0,01-2,17)	0,139
NGAL T3 (> 853,86)	0,79 (0,15-4,18)	0,784
sTNFR-1 (ng/mL)		0,260
sTNFR-1 T1 (< 0,82)	Referința	Referința
sTNFR-1 T2 (0,82 - 1,21)	2,60 (0,18-37,58)	0,483
sTNFR-1 T3 (> 1,21)	4,92 (0,73-32,99)	0,101

T1- tertila inferioară; T2=tertila mijlocie; T3=tertila superioară. Rezultate publicate în Acta Pharmacologica Sinica 2018; 39 (7): 1228-1236 [165]

Modelele de predicție cu biomarkeri multipli au o capacitate superioară celor individuale așa cum reiese din Tabelul 22 și respectiv figura 16.

Tabelul 22. Capacitatea de predicție a modelelor cu biomarkeri multipli pentru mRS nefavorabil la 3 luni după AVC ischemic.

Modele	AUC (95% CI)	p*
CRP	0,753 (0,646-0,860)	---
+ D-Dimeri	0,828 (0,726-0,930)	0,098
+ NGAL	0,803 (0,694-0,912)	0,326
+ sTNFR-1	0,833 (0,750-0,916)	0,039
+ D-dimeri + NGAL + sTNFR-1	0,876 (0,805-0,946)	0,011
D-Dimeri	0,764 (0,651-0,877)	---
+ NGAL	0,850 (0,770-0,929)	0,062
+ sTNFR-1	0,853 (0,774-0,932)	0,062
+ CRP + NGAL + sTNFR-1	0,876 (0,805-0,946)	0,019
NGAL	0,760 (0,662-0,858)	---
+ sTNFR-1	0,808 (0,711-0,905)	0,298
+ CRP + D-Dimeri + sTNFR-1	0,876 (0,805-0,946)	0,007
sTNFR-1	0,780 (0,675-0,886)	---
+ CRP + NGAL + sTNFR-1	0,876 (0,805-0,946)	0,031

*nivelul de semnificație obținut după aplicarea testului DeLong pentru compararea AUC. Rezultate publicate în Acta Pharmacologica Sinica 2018; 39 (7): 1228-1236 [165].

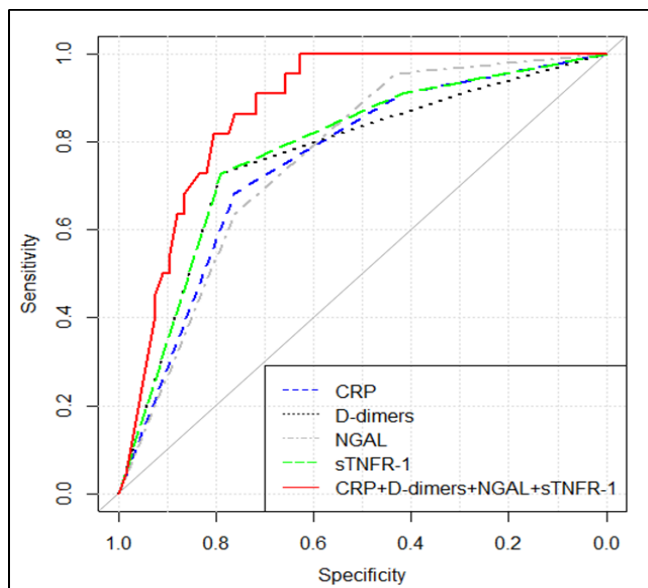


Figura 16 Curbele ROC pentru modelele de biomarkeri individuali și multipli. utilizarea modelului multiplu conferă o predicție mai bună a deficitului funcțional la 3 luni de la externare. Rezultate publicate în Acta Pharmacologica Sinica 2018 [165]

Utilizarea concomitentă a CRP, D-Dimerilor, NGAL și sTNFR-1 oferă o mai mare sensibilitate și specificitate decât folosirea individuală a acestora.

5.5. Discuții

Tehnologia actuală permite multiplexarea unui număr mare de analiți pe suprafața unui biochip silanizat, marcat cu anticorpi specifici, permițând astfel investigarea unei patologii prin abordarea simultană a mai multor căi fiziopatologice. La finalul unei reacții imunoenzimatice, analizorul cuantifică cu ajutorul unei camere CCD concentrația parametrilor de interes. Astfel, în panelul ales pentru studiul de față, sunt analizați simultan markeri inflamatori și de activare leucocitară (CRP, sTNFR-1 și NGAL), de fibrinoliză secundară (D-Dimerii) și de distrucție neuronală (NSE).

Nivele crescute ale CRP au fost predictive pentru evoluția nefavorabilă la 3 luni, după ajustarea pentru vârstă, sex și severitate, dar capacitatea predictivă s-a pierdut, rămânând doar o tendință spre semnificație statistică, după introducerea în modelul analitic al dislipidemie, FA și AVC în antecedente.

CRP și în special forma hsCRP este în corelație directă cu prognosticul pe termen lung [166], evaluarea în dinamică oferind date suplimentare referitoare la evoluția procesului inflamator sau apariția infecțiilor. Diferențele între rezultatele CRP și hsCRP se datorează cel mai probabil liniarității limitate, cu reducerea intervalului de cuantificare (<12 mg/L) pentru biochip-ul Randox utilizat.

NGAL este un marker de activare leucocitară, un reactant de fază acută, eliberat din granulele neutrofilelor, ca răspuns la agresiune. Analiza imunohistochimică cu dublu imunomarcaj, a relevat faptul că la nivel cerebral NGAL este exprimat cu preponderență de către neutrofilele periferice infiltrate (unde sindromul de reperfuzie agravează procesul inflamator) și de astrocitele (GFAP+) din emisfera ipsilaterală, dar nu și de către microglia (Iba1+) sau celulele neuronale (NeuN+) [167]. Legarea covalentă a NGAL de MMP-9 previne degradarea, și menține crescută activitatea gelatinolitică a MMP-9 [168], fiind astfel indirect implicat în distrucția BHE; pacienții cu evoluție spre complicații hemoragice prezentând nivele crescute ale complexului MMP-9/NGAL [51]. Rezultatele studiului cu BAT arată că nivelul plasmatic al NGAL este mai mare la pacienții cu evoluție nefavorabilă comparativ cu cei cu evoluție favorabilă [51], similar cu rezultatele din literatură; în plus, este un predictor cu tendință de semnificație statistică după ajustarea pentru variabilele demografice și severitatea la debut, lotul relativ redus influențând probabil rezultatele statistice.

D-Dimerii, markeri ai fibrinolizei secundare, se corelează independent cu severitatea și cu volumul ischemiei [169], fiind un predictor independent al evoluției

nefavorabile [72]. Discriminează cu sensibilitate și specificitate crescută subtipurile de AVC conform clasificării TOAST, un cutoff de 1090 ng/ml fiind reprezentativ pentru tipul CE [64]. Un studiu efectuat pe voluntari sănătoși, a arătat faptul că administrarea CRP determină, pe lângă răspunsul inflamator și o amplificare a răspunsului procoagulant, cu creșterea concentrației de protrombină, a D-Dimerilor și implicit a PAI-1 [170]. Producții de degradare ai fibrinei stimulează producția de IL-6 independent de acțiunea inductibilă a prostaglandinelor [171]. Se poate presupune astfel că implicarea D-Dimerilor în evoluția nefavorabilă ar putea fi legată de acțiunea proinflamatoare, adițional celei procoagulante, studii în acest sens fiind necesare. În studiul de față, o concentrație a D-Dimerilor > 246,93 ng/ml pare a fi un predictor independent semnificativ statistic al evoluției nefavorabile, după ajustarea pentru variabilele clinice și demografice; în ceea ce privește diferențierea subtipurilor de AVC conform TOAST, D-Dimerii nu s-au făcut remarcați, probabil datorită dimensiunii relativ reduse a eșantionului [165].

TNFR-1 este receptorul pentru TNF-alfa, o citokină pleiotropă cu secreție bifazică și cu efecte duale neuroprotective și neurotoxice după ischemia cerebrală, în funcție de regiunea de producere și de tipul receptorilor implicați în semnalizarea celulară [172]. Local este produs cu precădere de macrofage și microglia activată, exacerbează excitotoxicitatea și stresul oxidativ, crescând astfel susceptibilitatea neuronală la apoptoză [172]. Un studiu recent a arătat asocierea între nivelul plasmatic crescut al TNFR-1 și evoluția progresivă spre deces a pacienților cu AVC minor, independent de factorii de risc demografici și clinici [173]. Totodată, prin intermediul TNFR-1 se presupune că factorul de necroză tumorală este implicat în angiogeneză și remodelare tisulară [174]. Datele din literatură referitoare la relația dintre sTNFR-1 și evoluția dizabilității pe termen lung sunt puține; în urma analizei pacienților incluși în studiu, am găsit că sTNFR-1 este un predictor independent al evoluției nefavorabile, după ajustarea pentru datele demografice și clinice [165].

Cu toate că NSE poate fi considerat un marker surogat pentru distrucția neuronală, poate crește totuși și în alte patologii, respectiv în tumori neuroendocrine sau chiar leziuni hepatice și renale severe sau fracturi, ceea ce limitează mult semnificația sa în evaluarea pacienților cu ischemie cerebrală [58]. Nivelul periferic al NSE se corelează cu volumul ischemiei și cu deficitul funcțional evaluat la 1 lună [163], respectiv cu severitatea ischemiei la debut [164]. Valorile se mențin crescute până la 5 luni după ischemia cerebrală; pacienții cu AVC ischemic și cu degradare neurologică sau cei cu diabet zaharat sau cu cardiopatie ischemică concomitentă, având cele mai mari concentrații [175]. Motivul pentru care nu am găsit diferențe între pacienți și martori, a fost probabil momentul timpuriu al recoltării sângelui, posibil nerelevant pentru acest parametru, fiind necesară o perioadă pentru traversarea BHE până în periferie.

Exceptând NSE, prin adăugarea parametrilor de laborator la modelul clinic bazal, a fost îmbunătățită capacitatea de predicție pentru evoluția nefavorabilă la trei luni. Adăugarea D-Dimerilor și a sTNFR-1 la modelul clinic bazal crește capacitatea de discriminare a pacienților cu o evoluție nefavorabilă pe termen lung, cu tendință spre semnificație statistică.

Alături de NSE, și lanțurile grele ale neurofilamentele fosforilate (NfH) pot fi considerate un marker surogat al distrucției neuronale. Evaluate prin tehnica ELISA, valorile măsurate în ziua 5 au fost semnificativ mai mari față de ziua 1, respectiv față de lotul control ($p=0,01$), dar analiza multivariată nu a relevat o influență a acestuia asupra predicției evoluției la 3 luni, după ajustarea pentru vârstă, sex și severitatea la debut [176].

Deși s-a încercat selectarea riguroasă a pacienților și martorilor, totuși studiul prezintă câteva limitări. În primul rând, datorită costurilor mari, nu s-a făcut o măsurare în dinamică a parametrilor. În al doilea rând analiza a fost făcută folosind metoda imputării statistice, rezultate nefiind disponibile pentru întregul lot de pacienți, fiind necesară interpretarea cu precauție a rezultatelor. În plus am putut constata limitările tehnice ale chipului, în sensul că unii parametri (CRP), în cazurile severe, au depășit intervalul de măsurare, o diluție a probelor presupunând poate situarea altor parametri din panel la limita inferioară a intervalului de măsurare.

5.6. Concluzii

Tehnologia Biochip Array permite evaluarea simultană a mai multor parametri implicați în diverse căi fiziopatologice, oferind astfel o imagine mai comprehensivă asupra magnitudinii leziunii ischemice, prin prisma biomarkerilor periferici. În faza acută a ischemiei, concentrațiile CRP, sTNFR-1 și ale D-Dimerilor sunt mai crescute la pacienții cu evoluție nefavorabilă; sTNFR-1 și D-Dimerii fiind predictori independenți pentru deficitul funcțional evaluat la 3 luni.

6. Analiza capacității de predicție a severității și evoluției post ischemice a unui panel de chemokine și factori neurotrofici (studiul 4)

6.1. Introducere

Studiul și-a propus evaluarea în dinamică a unui panel de markeri inflamatori și neurotrofici, cu posibilă relevanță asupra modificărilor care au loc în faza acută a ischemiei cerebrale, cu proiecție asupra evoluției gradului de disfuncție motorie pe termen mediu (3 luni).

Astfel, sunt analizate sVCAM-1 și sICAM-1, molecule de adeziune celulară asociate ca markeri ai disfuncției endoteliale, aparținând superfamiliei imunoglobulinelor, exprimate în concentrații reduse în condiții normale, dar supraexprimate sub acțiunea citokinelor proinflamatoare. VCAM-1 determină aderarea celulelor la nivelul endoteliului vascular în timp ce ICAM-1 facilitează migrarea transendotelială a acestora. Sunt puține studii recente referitoare la evoluția acestor markeri în raport cu severitatea și cu evoluția ischemiei cerebrale. În timp ce Richard și colab. au constatat că sVCAM este un predictor independent pentru evoluția nefavorabilă la 3 luni, doar dacă este măsurat după un interval de 2-3 săptămâni de la debut, valorile fiind mai mari la cei cu evoluție nefavorabilă [38], Manolescu și colab. nu au găsit diferențe între valorile măsurate la lotul control comparativ cu pacienții la internare, respectiv externare [177]. O dinamică mai lentă a acestor parametrii poate explica valorile similare obținute la martori și pacienți la debutul bolii. Un studiu mai vechi însă, prezintă o creștere maximă în ziua a 5-a pentru sVCAM și un maxim la 24 ore pentru sICAM [178].

RANTES /CCL5 (Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted) este o chemokină proinflamatoare produsă de o serie de celule (limfocite, trombocite, dar și celule endoteliale și gliale), sub acțiunea IL-1 α și IL-1 β ; implicată în migrarea leucocitelor la nivelul zonei lezate cu amplificarea leziunii cerebrale din cursul inflamației [179,180]. În concentrație relativ redusă în condiții fiziologice, crește semnificativ în condiții de inflamație. La nivel cerebral, nivelul CCL5 crește atât datorită permeabilizării BHE și pătrunderii consecutive a acestei chemokine din periferie, dar și ca urmare a producției locale, de la nivelul astrocitelor și microgliei [181]. Studii experimentale au rezultate contradictorii însă, în timp ce unul dovedește implicarea RANTES în distrucția BHE și progresia inflamației [180], un alt studiu a dovedit că administrarea RANTES imediat după MCAO determină reducerea extravazării la nivelul BHE având efect neuroprotectiv [79]. Experimental s-a

constatat o corelație foarte bună între concentrația RANTES și producția de factori neurotrofici (BDNF fiind unul dintre aceștia) în condiții de ischemie cerebrală, având un efect protectiv asupra neuronilor prin acțiune autocrină/paracrină [78].

MPO este o enzimă lizozomală leucocitară produsă în condiții de stres oxidativ; a fost găsită în concentrații serice mai mari la pacienții cu AVC acut comparativ cu lotul control, fiind un predictor al severității și mortalității [44]. Totodată nivele crescute ale MPO se asociază cu un risc mai mare de recurență după ischemia cerebrală [182].

Platelet-derived growth factor (PDGF) este o glicoproteină dimerică asamblată în izoformele PDGF-AA, - AB/BB și PDGF-BB, exprimată cu precădere de trombocite, fiind un factor de creștere și migrare a celulelor mezenchimale. Recent au fost identificate noi forme ale acestei proteine, care conțin lanțuri PDGF-C (cu similitudine structurală cu VEGF-A) și -D [183]. Receptorii pentru izoformele B- PDGFRB exprimați de pericite dar și de către progenitorii neurali proveniți din nișele perivascularare, contribuie la regenerarea și diferențierea neuronală [183]. Semnalele induse de PDGF acționează pe multiple căi, cu implicații în neurogeneză, sinaptogeneză, dar și supraviețuire neuronală [183]. Valori plasmatiche crescute ale PDGF AB/BB se asociază cu un risc mai redus de recurență la pacienții cu AVC ischemic [86].

6.2. Ipoteză/Obiective

Studiul și-a propus evaluarea în dinamică unui panel de 10 markeri periferici cu rol în procesele inflamatorii și ale stresului oxidativ (MPO, RANTES), apoptoză (Cathepsina), disfuncție endotelială (sICAM, sVCAM), neurotrofici (BDNF, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, NCAM) dar și a PAI-1 și MMP-9, la pacienții cu AVC ischemice, comparativ cu un lot martor. Totodată a fost analizată relația acestor markeri cu severitatea bolii la debut și la externare, dar și cu gradul de disfuncție motorie post-ischemică.

6.3. Material și metodă

Pentru acest studiu, din cei 124 pacienți recrutați au fost analizați 114 pacienți eligibili, măsurătorile făcându-se în ziua 1 și 5 de la debutul bolii. Pentru analiza acestor parametri a fost folosită plasmă EDTA (pentru panelul multiplex) și plasmă heparinată (pentru dozarea MMP-9). Analiza MMP-9 a fost făcută folosind tehnica ELISA, cu trusa Human MMP-9 (BioVendor-Laboratori medicina a.s; analizor DSX Dynex Technologies, USA) limita de detecție de 0,151 ng/ml și coeficient de variație intra- și inter- assay de 2,1%, respectiv 5%. Panelul de 10 chemokine a fost analizat

prin tehnica multiplex, tehnologia xMAP, pe analizorul Flexmap 3D (Luminex Corp, USA) cu trusa HNDG3MAG-36K (EMD, Millipore, USA). Trusa a avut următoarele limite de detecție: 0,47 pg/ml pentru BDNF; 23,91 pg/ml pentru Cathepsina D; 16,13 pg/ml pentru sICAM; 12,24 pg/ml pentru sVCAM; 550 pg/ml pentru MPO; 0,51 pg/ml pentru PDGF-AA; 6,87 pg/ml pentru PDGF AB/BB; 1,72 pg/ml pentru RANTES; 13,48 pg/ml pentru NCAM și 0,92 pg/ml pentru PAI-1. Coeficientul de variație global a fost < 6% pentru determinările intra- assay și < 13% pentru măsurătorile inter-assay.

Evaluarea clinică

Severitatea ischemiei a fost dihotomizată în ușoară/moderată (NIHSS ≤ 7) și severă (NIHSS > 7). Clasificarea etiopatogenică a fost făcută conform clasificării TOAST (Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment) în tipul AT, CE, și SVO, iar deficitul funcțional, evaluat cu mRS, a permis gruparea pacienților în cele două grupe de evoluție: favorabilă (mRS între 0-2) și nefavorabilă (mRS între 3-6).

Analiza statistică

Analiza statistică s-a realizat cu mediul avansat de programare statistică și grafică R (v.3.4.0, Vienna, Austria). Evaluarea diferențelor dintre pacienții ischemici și martori în privința distribuției valorilor parametrilor de laborator a fost realizată cu ajutorul testului neparametric de tip Mann-Whitney (rezultatele fiind exprimate ca mediană și interval intercvartilic) în timp ce evaluarea diferențelor în timp a distribuției fiecărui parametru, a fost realizată prin testul neparametric al lui Wilcoxon.

Evaluarea impactului markerilor periferici asupra evoluției nefavorabile (măsurate prin mRS la externare, respectiv la 3 luni) și a dependenței funcționale în activitatea cotidiană (măsurată prin indexul Barthel), a fost testată utilizând regresia logistică binomială univariată și multivariată. Mărimea efectului a fost determinată cu ajutorul raportului șanselor (OR), în forma neajustată și ajustată, cu intervalul de încredere de 95% asociat.

Toți parametrii au fost analizați atât individual cât și în relație cu factorii de risc cunoscuți pentru evoluția nefavorabilă (mRS la 3 luni de la externare) și dependența funcțională. Din cauza multicoliniarității parametrilor de studiu, nu a fost posibilă testarea simultană a efectelor tuturor parametrilor asupra dependenței funcționale, respectiv evoluției nefavorabile la 3 luni, în cadrul aceluiași model.

Utilitatea clinică a importanței markerilor în clasificarea (predicția) pacienților cu dependență funcțională, respectiv evoluție nefavorabilă a fost determinată prin calculul ariei de sub curba ROC, și a intervalului de încredere de 95% asociat. Curbele ROC asociate modelului clinic bazal (modelul cu factori de risc cunoscuți precum vârstă, gen, clasificare TOAST, AVC în antecedente, NIHSS inițial) și modelului clinic

îmbunătățit cu câte un parametru de laborator din panelul de 10 markeri, au fost comparate cu ajutorul testului lui DeLong, un rezultat semnificativ obținându-se pentru $p < 0,05$.

6.4 Rezultate

6.4.1. Comparații ale distribuțiilor parametrilor la pacienți și lotul control

În urma analizei comparative a parametrilor între lotul de pacienți (ziua 1) și lotul control, s-a observat că o serie de analizi prezintă diferențe semnificative (Tabel 23). În timp ce valorile parametrilor RANTES și NCAM au fost semnificativ mai mici la lotul de pacienți comparativ cu lotul control ($p=0,004$ pentru RANTES și $p=0,019$ pentru NCAM), sICAM, MPO și MMP-9 au fost semnificativ crescute în rândul pacienților ($p=0,024$ pentru sICAM; $p=0,025$ pentru MPO și $p < 0,001$ pentru MMP-9).

Tabelul 23. Analiza comparativă a parametrilor analizați între lotul control și pacienții cu AVC (ziua 1)

Parametru	Lot control (n=40)	Lot pacienți (n=114)	p
PDGF-AA	0,76 [0,24; 1,70]	1,08[0,71; 2,14]	0,097
PDGF-AB/BB	10,29 [4,16; 23,01]	9,83 [5,11;20,26]	0,730
PAI-1	145,78 [84,91; 187,36]	150,08 [102,96; 185,90]	0,548
BDNF	5,59 [2,57; 8,38]	4,1 [2,73; 9,24]	0,943
RANTES	38,28 [16,99; 53,21]	17,01 [10,08; 31,28]	0,004
sICAM	118,07 [55,88; 160,18]	136,65 [110,26; 167,23]	0,024
sVCAM	1416,52 [1261,35; 1788,73]	1537,89 [1280,62; 1856,16]	0,312
NCAM	416,72 [346,95; 477,54]	370,00 [317,79; 430,80]	0,019
MPO	418,72 [311,81; 535,89]	539,93 [286,80; 1065,61]	0,025
Cathepsina D	242,58 [180,85; 416,64]	252,28 [210,79; 361,58]	0,689
MMP-9	170,00 [121,00; 212,50]	1008,20 [480,90; 1492,80]	<0,001

Datele au fost prezentate sub forma mediană [cvartila de ordin 1; cvartila de ordin 3]; nivelul de semnificație estimat $p < 0,05$ a fost obținut cu ajutorul testului neparametric Mann-Whitney; MMP-9 exprimat în ng/ml, parametrii din panelul multiplex exprimați în pg/ml.

6.4.2. Relația dintre markerii de studiu și subtipurile de AVC conform clasificării TOAST

Au existat diferențe semnificative ale valorilor MPO ($p=0,028$) și sVCAM ($p=0,012$) la pacienții cu diferite subtipuri TOAST, valori mai mari ale MPO fiind observate la pacienții cu tipul AT și CE, comparativ cu patologia vaselor mici (mediana [IQR]: 539,9 pg/ml [223,7; 1052,5]; 580,8 pg/ml [403,9; 1066,1] versus 256,7 pg/ml [172,5; 323,8]), în timp ce valori mai mari ale sVCAM au fost observate la pacienții cu tipul CE și patologia vaselor mici comparativ cu tipul AT (mediana [IQR]: 1732,1

pg/ml [1374,6; 2095,7]; 1534,9 pg/ml [1294,6; 1944,3] versus 1425,1 pg/ml [1238,4; 1711,1]).

Pentru restul parametrilor analizați, BDNF ($p=0,500$), cathepsina D ($p=0,766$), sICAM ($p=0,798$), RANTES ($p=0,751$), NCAM ($p=0,093$), PDGF-AB/BB ($p=0,568$) și PAI-1 ($p=0,154$), nu am găsit asocieri semnificative statistic cu subtipurile de AVC, conform clasificării TOAST.

6.4.3. Evoluția în dinamică a valorilor parametrilor de studiu la pacienții cu AVC

În ceea ce privește evoluția în dinamică a parametrilor multiplex în rândul pacienților, valorile parametrilor RANTES, sICAM și sVCAM s-au redus semnificativ în ziua 5 comparativ cu ziua 1, în cazul celorlalți parametri variația fiind fără semnificație (Tabelul 24).

Tabelul 24. Analiza longitudinală a parametrilor multiplex la pacienții ischemici (ziua 1 vs ziua 5 de la debut)

Parametru	Ziua 1	Ziua 5	p
PDGF-AA	1,04 [0,62; 2,21]	1,10 [0,41; 3,13]	0,288
PDGF-AB/BB	8,60 [4,71; 20,58]	11,77 [4,76; 24,15]	0,162
PAI-1	151,23 [105,30 ; 185,96]	152,32 [102,35 ; 222,39]	0,154
BDNF	4,56 [2,47; 9,31]	4,83 [2,44; 14,92]	0,173
RANTES	16,43 [9,56; 35,99]	14,38 [8,90; 19,57]	0,016
sICAM	136,65 [108,69 ; 165,86]	109,15 [66,12 ; 172,97]	0,013
sVCAM	1578,38 [1294,69; 1886,04]	1470,26 [1220,17; 1686,31]	0,001
NCAM	370,51 [317,63 ; 422,07]	352,30 [328,47 ; 432,20]	0,898
MPO	564,65 [299,85 ; 1160,86]	780,08 [437,81 ; 1160,70]	0,352
Cathepsina D	270,80 [212,08 ; 270,80]	239,09 [199,05; 357,04]	0,551

Datele au fost prezentate sub forma mediană [cvartila de ordin 1; cvartila de ordin 3]; nivelul de semnificație estimat p a fost obținut cu ajutorul testului neparametric Wilcoxon; analiza statistică a fost realizată pe cazurile cu măsurători complete la toți parametrii multiplex ($n=90$). MMP-9 exprimat în ng/ml, parametrii multiplex exprimați în pg/ml

6.4.4. Asocierea parametrilor de studiu cu severitatea ischemiei

În urma analizei bivariate a asocierii dintre parametrii de laborator și severitatea ischemiei la debut, doar sVCAM s-a remarcat cu valori plasmatice semnificativ mai mari la pacienții cu NIHSS >7 ($n=29$), comparativ cu NIHSS ≤ 7 ($n=85$), $p=0,018$. Analiza asocierii între concentrația plasmatică a proteinelor analizate și NIHSS evaluat la externare, a relevat faptul că PDGF-AA și AB/BB dar și BDNF și RANTES au fost semnificativ mai mici la pacienții cu NIHSS > 7 comparativ cu cei cu scor ≤ 7 la externare (Tabelul 25).

Tabelul 25. Asocierea dintre parametrii de laborator (ziua 1) și severitatea ischemiei evaluată cu NIHSS la externare

	NIHSS externare ≤ 7 (n1=101)	NIHSS externare > 7 (n2=13)	p
PDGF-AA	1,10 [0,81; 2,21]	0,71 [0,53; 0,98]	0,013
PDGF-AB/BB	10,30 [5,46;20,89]	4,17[2,64; 6,99]	0,008
PAI-1	155,78 [103,79;190,96]	113,61 [97,46; 155,81]	0,083
BDNF	5,30 [3,32;10,06]	2,68 [1,73; 4,03]	0,014
RANTES	18,58[10,98;35,99]	11,05 [5,13; 16,01]	0,012
sICAM	136,19 [101,41; 172,58]	137,00 [110,45; 166,39]	0,841
sVCAM	1544,81 [1280,62; 1834,96]	1419,17 [1308,56; 2145,75]	0,890
NCAM	370,00 [317,79;426,36]	378,21 [325,48; 521,67]	0,524
MPO	540,00 [286,80;10065.61]	508.89 [286.80; 789.21]	0,758
Cathepsina D	264,97 [210,79; 364,08]	235,55 [223,43; 271,86]	0,665
MMP-9	1028,10 [514,50.1507,50]	705,10 [359,30; 1166,00]	0,204

Datele au fost prezentate sub forma mediană [cvartila de ordin 1; cvartila de ordin 3]; nivelul de semnificație estimat p a fost obținut cu ajutorul testului neparametric al lui Mann-Whitney. MMP-9 exprimat în ng/ml, parametrii multiplex exprimați în pg/ml.

Regresia logistică univariată a evidențiat faptul că doar NCAM (ziua 1) are capacitate de predicție a severității ischemiei, măsurată prin NIHSS la 5 zile de la debut (Tabelul 26), NCAM fiind un predictor semnificativ multivariat în raport cu variabilele clinice și demografice: vârstă (peste 70 ani), sex, antecedente de ischemie cerebrală, clasificare TOAST, leucoaraioză și NIHSS la internare. Mai mult, la o creștere cu 100 unități a acestui parametru, crește riscul de AVC moderat sau sever de 7,35 ori.

Tabelul 26. Analiza univariată și multivariată a capacității predictive a NIHSS >7 evaluat în ziua a 5-a pentru parametrii analizați.

Parametru	Raportul șanselor (OR) neajustat		Raportul șanselor (OR) ajustat ^a	
	Valoare estimată [95% IC]	p	Valoare estimată (95% IC)	p
PDGF-AA ^(b)	0,48[0,14; 0,91]	0,065	0,58[0,13; 1,65]	0,393
PDGF-AB/BB ^(c)	0,52[0,26; 1,07]	0,074	0,50[0,15; 1,67]	0,260
PAI-1 ^(d)	0,37[0,13; 1,07]	0,067	0,06[0,003; 1,35]	0,076
BDNF ^(c)	0,19[0,03; 1,04]	0,055	0,18[0,01; 2,38]	0,194
RANTES ^(a)	0,81[0,59; 1,12]	0,202	0,85[0,58; 1,25]	0,418
sICAM ^(d)	0,93[0,47; 1,86]	0,842	3,78[0,73; 19,54]	0,112
sVCAM ^(d)	1,08[0,99; 1,18]	0,100	1,29[0,97; 1,72]	0,077
NCAM ^(d)	1,90[1,02; 3,55]	0,044	7,35[1,06; 50,78]	0,043
MPO ^(e)	0,88[0,45; 1,73]	0,713	0,51 [0,13; 2,03]	0,341
Cathepsina D ^(d)	1,07 [0,78; 1,47]	0,677	1,62 [0,74; 3,56]	0,294
MMP-9 ^(d)	0,96[0,89; 1,04]	0,291	0,95 [0,84; 1,07]	0,653

95% IC=interval de încredere [limita inferioară ; limita superioară]; nivel de semnificație estimat, obținut din regresia logistică univariată și multivariată; ^(a) ajustare după vârstă>70 ani, sex, antecedente de AVC, clasificare TOAST, leucoaraoza și NIHSS la internare; ^(b) la o creștere cu 1 unitate a parametrului (markerului); ^(c) la o creștere cu 10 unități a parametrului de studiu; ^(d) la o creștere cu 100 unități; ^(e) la o creștere cu 1000 unități. MMP-9 exprimat în ng/ml, parametrii multiplex exprimați în pg/ml.

6.4.5. Asocierea parametrilor de studiu cu mRS la 3 luni de la externare

Cu excepția sVCAM, care a prezentat o asociere cu tendință spre semnificație statistică cu mRS la externare, având valori mai mari la pacienții cu mRS ≥ 3 ($p=0,055$), nici un alt parametru nu a fost semnificativ în acest sens.

Evaluarea mRS la 3 luni însă, a arătat faptul că nivelurile plasmatice ale neurotrofinelor precum PDGF-AA, PDGF-AB/BB și BDNF se regăsesc în concentrații semnificativ mai mari în cazul pacienților cu evoluție favorabilă și grad redus de disfuncție motorie. Totodată se poate observa că nivelul PDGF-AB/BB este de aproximativ 10 ori mai mare comparativ cu PDGF-AA. RANTES a fost semnificativ mai mare la pacienții cu evoluție favorabilă ($p=0,013$) în timp ce NCAM este mai mare la cei cu evoluție nefavorabilă, la limita de semnificație statistică ($p=0,056$) (Tabelul 27).

Tabelul 27 Analiza asocierii dintre parametrii de laborator și gradul de dizabilitate post-AVC evaluat cu mRS la 3 luni

	mRS < 3 (n1=67)	mRS ≥ 3 (n2=22)	p
PDGF-AA	1,08 [0,81; 2,32]	0,79 [0,61; 1,35]	0,037
PDGF-AB/BB	10,02 [6,37;21,09]	6,99[3,13; 14,02]	0,036
PAI-1	105,23 [105,30;184,66]	113,61 [89,62; 171,02]	0,093
BDNF	5,23 [3,46;11,13]	4,03 [1,87; 7,38]	0,056
RANTES	19,39[12,41;36,04]	11,29 [7,08; 20,45]	0,013
sICAM	137,00 [115,09; 169,32]	128,14 [95,28; 147,61]	0,191
sVCAM	1516,55 [1259,41; 1729,71]	1644,05 [1373,75; 2125,42]	0,113
NCAM	362,48 [317,59;418,60]	394,95 [341,99; 477,38]	0,056
MPO	539,93 [260,01; 1021,13]	577,68[382,66; 1004,55]	0,320
Cathepsina D	249,49 [208,93; 342,12]	235,55 [198,72; 362,83]	0,941
MMP-9	1068,60 [510,35 ;1551,05]	895,40 [468,27; 1451,40]	0,708

Datele au fost prezentate sub forma mediană [cvartila de ordin 1; cvartila de ordin 3]; nivelul de semnificație estimat p a fost obținut cu ajutorul testului neparametric Mann-Whitney. MMP-9 exprimat în ng/ml, parametrii multiplex exprimați în pg/ml

Analiza univariată a regresiei logistice a relevat că sVCAM (la o creștere cu 100 unități: OR=1,11 [95% IC: 1,01; 1,22], $p=0,029$) și NCAM (la o creștere cu 100 unități: OR= 1,92[95% CI: 1,08; 3,40], $p=0,025$), au fost predictorii semnificativi pentru mRS nefavorabil la 3 luni, dar după ajustarea în raport cu variabilele clinice și demografice,

își pierd semnificația statistică. Curba ROC pentru sVCAM și NCAM a indicat că aceștia nu au fost biomarkeri utili din punct de vedere clinic pentru diferențierea mRS la 3 luni (sVCAM: AUROC=0,62; 95% IC:[0,48;0,76], un nivel sVCAM > 1635,7 pg/ml indicând o Se=55%, Sp=70%, VPP=38%, VPN=82%; NCAM: AUROC=0,63; 95%IC: [0,49;0,78], o valoare a NCAM > 458,5 pg/ml indicând o Se=36%, Sp=91%, VPP=57%, VPN=81.3%).

Așa cum reiese din Tabelul 28, PDGF-AB/BB, BDNF și PAI-1 au fost predictori semnificativi independenți ai evoluției nefavorabile la 3 luni, după ajustarea în raport cu variabilele demografice și clinice; nivele plasmatice reduse ale acestor parametri asociindu-se cu evoluția nefavorabilă pe termen mediu (3 luni).

Tabelul 28. Analiza univariată și multivariată a prognosticului dizabilității, evaluată cu mRS la 3 luni

Parametru	Raportul șanselor (OR) neajustat		Raportul șanselor (OR) ajustat ^(a)	
	Valoare estimată [95% IC]	p	Valoare estimată [95% IC]	p
PDGF-AA ^(b)	0,57[0,29; 0,94]	0,059	0,44[0,17; 1,03]	0,059
PDGF-AB/BB ^(c)	0,60[0,35; 1,04]	0,069	0,42[0,19; 0,93]	0,032
PAI-1 ^(d)	0,44[0,17; 1,10]	0,079	0,14[0,03; 0,75]	0,021
BDNF ^(c)	0,36[0,12; 1,08]	0,069	0,21[0,05; 0,87]	0,031
RANTES ^(a)	0,77[0,57; 1,04]	0,093	0,75[0,52; 1,09]	0,126
sICAM ^(d)	0,61[0,28; 1,35]	0,221	0,71[0,32; 1,56]	0,390
sVCAM ^(d)	1,11[1,01; 1,22]	0,029	1,05[0,92; 1,21]	0,475
NCAM ^(d)	1,92[1,08; 3,40]	0,025	2,19[0,89; 5,39]	0,086
MPO ^(e)	1,12[0,70; 1,79]	0,644	1,01 [0,50; 2,04]	0,975
Cathepsina D ^(d)	1,15[0,87; 1,52]	0,325	1,06 [0,73; 1,54]	0,629
MMP-9 ^(d)	1,01[0,96; 1,07]	0,593	1,02 [0,96; 1,09]	0,470

95% IC=interval de încredere [limita inferioară ; limita superioară]; nivel de semnificație estimat obținut din regresia logistică univariată sau multivariată; ^(a) ajustare după vârstă >70 ani, sex, AVC în antecedente, clasificare TOAST, leucoaraioza, scor inițial NIHSS; ^(b) la o creștere cu 1 unitate a parametrului (markerului); ^(c) la o creștere cu 10 unități a parametrului de studiu; ^(d) la o creștere cu 100 unități ; ^(e) la o creștere cu 1000 unități. MMP-9 exprimat în ng/ml, parametrii multiplex exprimați în pg/ml

Deși neurotrofinele de tipul PDGF-AA/AB și BDNF, dar și PAI-1 au fost predictori multivariați semnificativi ai mRs nefavorabil la 3 luni, nu am găsit o diferență semnificativă statistic între curbele ROC asociate modelului clinic de bază și modelului obținut prin îmbunătățirea modelului clinic cu câte un biomarker dintre cei studiați (Tabel 29), abilitatea discriminatorie a modelelor analizate fiind similară (Figura 17).

Pentru a fi semnificativi, markerii considerați predictori ai evoluției nefavorabile trebuie să aibă valoare prognostică relevantă clinic, estimările ariei de

sub curbă ROC demonstrând o foarte bună abilitate discriminatorie a modelelor îmbunătățite cu fiecare din acești markeri (AUC între 0,89 si 0,93).

Tabelul 29. Evaluarea capacității discriminatorii a modelelor testate în clasificarea pacienților cu evoluție favorabilă vs nefavorabilă, evaluată cu mRS la 3 luni

Modele testate	AUC (95% CI)	p-value*
Model clinic#	0,903 [0,828;0,977]	---
+PDGF-AA	0,917 [0,856;0,979]	0,465
+PDGF-AB/BB	0,923 [0,865;0,981]	0,275
+PAI-1	0,929 [0,870;0,988]	0,351
+BDNF	0,926 [0,871;0,981]	0,218
+RANTES	0,908 [0,840;0,977]	0,729
+sVCAM	0,898 [0,820;0,976]	0,418
+NCAM	0,914 [0,844;0,985]	0,573

Modelul cu predictorii clinici cunoscuți ai mRS la 3 luni: vârsta, sex, AVC antecedente, leucoaraioza, NIHSS inițial și tipul AVC ischemic; AUC=aria de sub curba ROC; 95%CI=95% interval de încredere pentru AUC; *nivel de semnificație estimat obținut din testul lui DeLong pentru comparația curbelor ROC asociate modelului clinic (modelul de bază) și modelul obținut prin adăugarea câte unui biomarker.

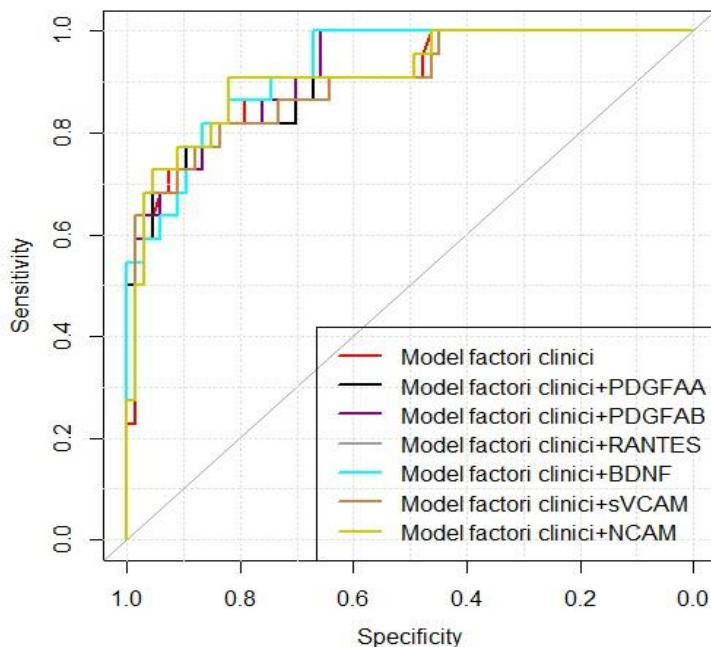


Figura 17. Curbele ROC asociate modelului de bază și modelul obținut prin adăugarea biomarkerilor considerați predictorii semnificativi în analiza de regresie.

6.4.6. Relația dintre parametrii de studiu și dependența funcțională (indexul Barthel ziua 5)

Rezultatele analizei bivariate (Tabelul 30) au arătat că nivelurile PDGF-AA, PDGF-AB/BB, BDNF și RANTES se regăsesc în concentrații semnificativ mai mici în cazul pacienților cu dependență funcțională în activitățile zilnice (scor Barthel ≤ 80).

Tabelul 30. Analiza asocierii dintre parametrii de laborator și gradul de dependență funcțională măsurat prin indexul Barthel în ziua a 5-a de la internare

	Barthel (ziua 5) > 80 (n1=46)	Barthel (ziua 5) \leq 80 (n2=68)	p
PDGF-AA	1,13 [0,82; 2,50]	0,90 [0,59; 1,50]	0,010
PDGF-AB/BB	10,66 [6,80; 27,32]	7,70 [3,14; 16,73]	0,013
PAI-1	153,51 [103,38; 182,52]	131,05 [97,46; 190,96]	0,677
BDNF	5,36 [3,50; 12,30]	4,09 [1,92; 7,79]	0,012
RANTES	19,41 [12,41; 42,33]	12,84 [8,10; 22,58]	0,010
sICAM	137,72 [118,74; 169,89]	135,39 [102,68; 165,34]	0,291
sVCAM	1517,43 [1249,57; 1730,93]	1669,76 [1318,71; 2086,03]	0,142
NCAM	361,14 [315,33; 412,78]	396,32 [329,68; 451,07]	0,134
MPO	505,73 [291,38; 938,11]	581,23 [262,11; 1234,99]	0,365
Cathepsina D	258,49 [215,58; 342,12]	250,79 [205,34; 368,61]	0,994
MMP9	1064,45 [520,60; 1519,55]	894,60 [459,03; 1327,00]	0,403

Datele au fost prezentate sub forma mediană [cvartila de ordin 1; cvartila de ordin 3]; nivelul de semnificație estimat p a fost obținut cu ajutorul testului neparametric al lui Mann-Whitney.

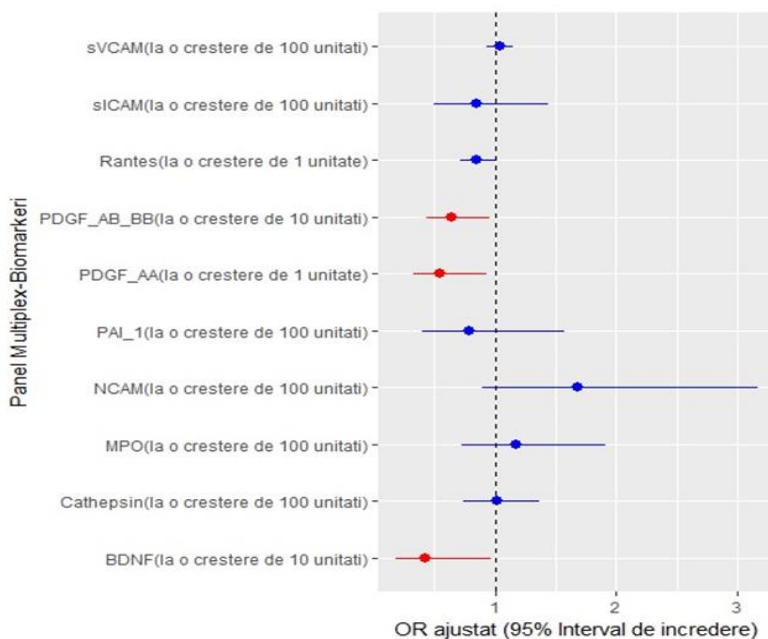
Parametrii PDGF-AA, PDGF-AB/BB și BDNF au fost predictori univariați și multivariați pentru dependența funcțională, creșteri cu 1 unitate pentru PDGF-AA respectiv cu 10 unități pentru PDGF-AB/BB și BDNF având efect protector ($OR < 1$) (Tabel 31, Figura 18).

În figura 18, efectul individual al markerilor a fost redat prin reprezentarea raportului șanselor (OR) ajustat după factorii demografici (vârsta, gen) și clinici (AVC în antecedente, NIHSS inițial, leucoaraoza, clasificare TOAST); parametrii marcați cu roșu, respectiv PDGF-AA, PDGF-AB/BB și BDNF au fost predictori semnificativi ai dependenței funcționale.

Tabelul 31. Evaluarea parametrilor de studiu ca predictorii univariați și multivariați ai dependenței funcționale (index Barthel ziua a 5-a)

Parametru	Raportul șanselor (OR) neajustat		Raportul șanselor (OR) ajustat(a)	
	Valoare estimată [95% IC]	p	Valoare estimată [95% IC]	p
PDGF-AA ^(b)	0,56[0,39; 0,89]	0,012	0,55[0,32; 0,93]	0,027
PDGF-AB/BB ^(c)	0,70[0,51; 0,97]	0,034	0,64[0,43; 0,96]	0,030
PAI-1 ^(d)	0,87[0,50; 1,52]	0,620	0,79[0,40; 1,57]	0,503
BDNF ^(c)	0,50[0,26; 0,97]	0,039	0,42[0,18; 0,97]	0,042
RANTES ^(a)	0,86[0,74; 1,01]	0,058	0,85[0,71; 1,02]	0,072
sICAM ^(d)	0,81[0,50; 1,32]	0,402	0,84[0,49; 1,44]	0,532
sVCAM ^(d)	1,08[0,99; 1,16]	0,069	1,04[0,93; 1,15]	0,030
NCAM ^(d)	1,51[0,95; 2,39]	0,080	1,68[0,90; 3,17]	0,106
MPO ^(e)	1,17[0,78; 1,76]	0,456	1,17 [0,72; 1,91]	0,532
Cathepsina D ^(d)	1,11[0,88; 1,42]	0,379	1,01 [0,74; 1,37]	0,969
MMP-9 ^(d)	0,99[0,96; 1,04]	0,851	0,99 [0,95; 1,04]	0,838

95% IC=interval de încredere [limita inferioară ; limita superioară]; nivel de semnificație estimat obținut din regresia logistică univariată sau multivariată; (a) ajustare după vârstă >70 ani, gen, AVC antecedente, clasificare TOAST, leucoaraoză, scor inițial NIHSS; (b) la o creștere cu 1 unitate a parametrului (biomarkerului); (c) la o creștere cu 10 unități a parametrului de studiu; (d) la o creștere cu 100 unități ; (e) la o creștere cu 1000 unități.

**Figura 18.** Influența markerilor din panelul multiplex asupra dependenței funcționale a pacienților cu AVC ischemic (parametrii marcați cu roșu au fost predictorii ai dependenței funcționale)

Deși nu am găsit o diferență semnificativă în privința capacității discriminatorii a modelelor îmbunătățite cu predictorii semnificativi ai dependenței funcționale, markerii cu efect semnificativ în predicția dependenței funcționale au avut o valoare prognostică relevantă din punct de vedere clinic, aria de sub curba ROC în raport cu fiecare din biomarkerii semnificativi fiind mai mare decât valoarea prag de 0,80 (Tabelul 32 și figura 19).

Tabelul 32. Evaluarea capacității discriminatorii a modelului obținut prin adăugarea la modelul clinic de bază a biomarkerilor semnificativi în analiza de regresie

Modele testate	AUC (95% IC)	p-value*
Model clinic#	0,843 [0,766;0,920]	---
+PDGF-AA	0,864 [0,798;0,929]	0,290
+PDGF-AB/BB	0,863 [0,797;0,929]	0,285
+BDNF	0,861 [0,795;0,928]	0,288
+RANTES	0,853 [0,782;0,924]	0,459

Modelul cu predictorii clinici cunoscuți ai mRS la 3 luni: vârsta, sex, AVC antecedente, leucoaraioza, NIHSS inițial și tipul AVC ischemic; AUC=aria de sub curba ROC; 95%IC IC=95% interval de încredere pentru AUC;

*nivel de semnificație estimat obținut din testul lui DeLong pentru comparația curbelor ROC asociate modelului clinic (modelul de bază) și modelul obținut prin adăugarea biomarkerilor cu efect semnificativ

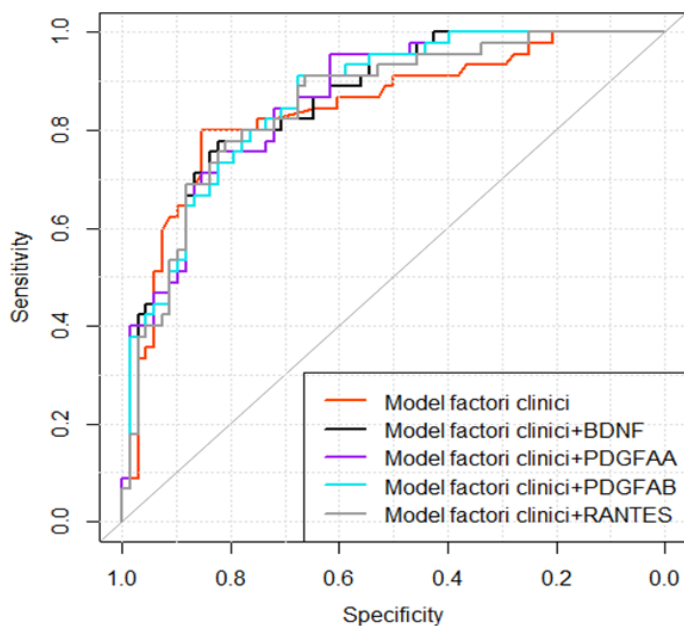


Figura 19. Curbele ROC asociate modelului de bază și modelul obținut prin adăugarea biomarkerilor considerați predictorii semnificativi pentru dependența funcțională în analiza de regresie.

6.5 Discuții

Studiul de față și-a propus evaluarea în dinamică, prin tehnologia multiplex xMAP, a unui panel de chemokine și factori trofici în rândul pacienților cu AVC ischemic. A fost făcută atât analiza longitudinală a pacienților, în ziua 1 și respectiv 5 de la debutul bolii, dar și comparația cu un lot de control, dat fiind faptul că o parte dintre aceste chemokine sunt puțin studiate, neexistând un interval de referință în acest sens. Chiar dacă nu include citokine pro- și antiinflamatoare, de altfel mult studiate în această patologie, panelul cuprinde parametri cu potențiale implicații în diversele procese fiziopatologice din ischemia cerebrală, atât distructive - precum disfuncția endotelială (sVCAM, sICAM), apoptoza (cathepsina D) și inflamația (RANTES, MPO), cât și benefice prin factorii neurotrofici (BDNF, PDGF).

În primul rând trebuie menționat faptul că au existat diferențe semnificative statistic între lotul control și pacienți, la parametrii implicați cu preponderență în procesele inflamatorii acute, precum sICAM, MPO. Tay și colab. prezintă rezultate asemănătoare pentru MPO, cu valori mai mari la pacienți în ziua 1 comparativ cu lotul control, dar care în ziua 5 revin la normal; totodată, niveluri serice crescute ale MPO asociindu-se cu o mortalitate mai mare în rândul pacienților ischemici [44]. În studiul SPARCL (Stroke Prevention by Aggressive Reduction in Cholesterol Levels Trial), MPO apare ca un predictor independent pentru evoluția pacienților cu AVC ischemic, în timp ce markerii de disfuncție endotelială și de recrutare leucocitară (sVCAM și sICAM) nu au prezentat corelații în acest sens [182]. În plus, MPO adăugat la modelul bazal validat de autori pentru estimarea riscului de recurență a AVC, îmbunătățește capacitatea de predicție [182]. Rezultatele studiului de față relevă o creștere în dinamică a concentrației MPO, cu valori mai mari la pacienți comparativ cu martorii, fără a se corela cu severitatea la debutul bolii (estimată cu NIHSS), sau cu dizabilitatea motorie (evaluată cu mRS la internare sau la 3 luni). Nici sVCAM sau sICAM nu se evidențiază ca predictori ai severității sau gradului de dizabilitate evaluat cu mRS la 3 luni, rezultatele fiind în concordanță cu datele recente din literatură [182], deși valorile la internare sunt mai mari la pacienții ischemici comparativ cu martorii, sugerând implicarea acestor chemokine în faza acută a bolii.

PAI-1 aparține familiei inhibitorilor de serin-proteaze, fiind principalul inhibitor endogen al activatorului plasminogenului, cu cele două forme: t-PA (activatorul plasminogenului tisular) și u-PA (activatorul plasminogenului de tip urokinază), cu rol important în reglarea fibrinolizei [184]. Studiile au arătat că deficitul de PAI-1 se asociază cu fibrinoliză accelerată și hemoragie, în timp ce nivele crescute ale PAI-1 se asociază cu tromboze vasculare [185]. PAI-1 este secretat de către trombocite dar și de celule hepatice, splenice, celule musculare netede sau celule

endoteliale; pe lângă rolul pro-coagulant având și o componentă pro-inflamatoare - prin stimularea migrării celulelor inflamatoare la locul leziunii - și profibrotică; în plus, nivele reduse ale PAI-1 se asociază cu o activare vasculară endotelială la nivel cerebral [184]. În unele studii, PAI-1 secretat de către astrocite are un efect neuroprotectiv, pe de-o parte prin modularea expresiei genelor Bcl-2/Bax, iar pe de altă, parte prin reducerea excitotoxicității NMDA induse, volumul infarctului cerebral fiind mai mare în cazul șoarecilor PAI-1 deficienți comparativ cu tipul sălbatic [186]. Ca multe alte citokine și chemokine, se pare că și PAI-1 poate avea rol dual, protectiv sau distructiv, probabil în funcție de tipul leziunii sau de tipul țesutului implicat. Eliberarea PAI-1 de la nivelul pericitelor, celulelor endoteliale ale BHE și astrocitelor are efect neuroprotectiv, prin reducerea leziunii BHE și protejarea unității neuro-vasculare, independent de efectul inhibitor asupra t-PA [187]. În studiul de față, nivelele plasmatice ale PAI-1 sunt mai mari la pacienți comparativ cu martorii (în concordanță cu statusul inflamator acut), dar și la cei mRS nefavorabil la 3 luni, cu tendință spre semnificație statistică. După ajustarea pentru variabilele clinice considerate, PAI-1 apare ca un predictor independent semnificativ pentru evoluția nefavorabilă, nivele reduse fiind asociate cu deficit funcțional sever, rezultatul fiind în concordanță cu efectele neuroprotective complementare ale acestei proteine.

RANTES este o chemokină proinflamatoare produsă de o serie de celule precum limfocitele T, celulele endoteliale, trombocitele, dar și de celulele musculare din endoteliul vascular sau celule gliale. Are rol în recrutarea și infiltrarea celulelor inflamatoare la locul leziunii, expresia proteinei fiind crescută în condiții de ischemie, la nivel cerebral [188]. Se pare că implicarea RANTES în disfuncția endotelială, este mai mult indirectă, prin creșterea interacțiunii dintre trombocite și leucocite și nu neapărat prin aderarea endotelială directă a acestora [180]. În plus, RANTES este implicată și în creșterea permeabilității BHE, experimental fiind dovedit că disfuncția BHE este semnificativ redusă la animalele RANTES-/- supuse ischemiei/reperfuziei cerebrale [180]. Un studiu recent a relevat și un mecanism de inducere a disfuncției endoteliale de către RANTES, prin modularea inflamației perivascularare indusă de IFN gama [189]. În studiul de față, nivelul plasmatic al RANTES la pacienți în prima zi de la internare este semnificativ mai mic comparativ cu lotul control, continuând să scadă în dinamică în ziua 5 de la internare, divergent cu rezultatele raportate de Tokami și colab. unde valorile plasmatice ale RANTES au fost mai mari la pacienți comparativ cu lotul martor [78]. Am găsit corelații semnificative ale RANTES cu factorii neurotrofici, respectiv BDNF ($r=0,846$, $p\leq 0,001$), în concordanță cu datele din literatură [78], dar și cu PDGF-AA ($r=0,825$, $p\leq 0,001$) și PDGF-AB/BB ($r=0,842$, $p\leq 0,001$). Asocierea pozitivă a RANTES cu componentele neurotrofice sugerează, pe lângă efectele proinflamatoare din faza acută a ischemiei, și rolul neuroprotectiv al acestei chemokine, cu inducerea sintezei factorilor neurotrofici la nivel cerebral [78]. Experimental s-a observat că RANTES este exprimat cu precădere la nivelul neuronilor din penumbra, la 24 ore după MCAO, sugerând acțiunea

autocrină/paracrină a acestei chemokine cu activarea căilor de supraviețuire neuronală Akt și Erk1/2 și inhibarea concomitentă a căii care reduce activarea caspazei-3, limitând astfel apoptoza neuronală [78]. În sprijinul efectului dual al RANTES vine și rezultatul studiului lui Liu și colab. care a constatat experimental reducerea lezării BHE după administrarea exogenă a RANTES la șobolani supuși MCAO [79]. Interacțiunea cu diverși receptori determină fie efectul inflamator și de distrucție a BHE (CCR1), fie efectul neuroprotectiv (CCR3, CCR5). Datorită faptului că există variate tipuri de celule producătoare de RANTES în condiții de ischemie, devine evident faptul că nivelul măsurat în periferie, cu mare probabilitate, nu reflectă expresia chemokinei la nivel cerebral. Rezultatele studiului nostru înclină balanța spre efectul neuroprotectiv al RANTES, nivele semnificativ mai mici fiind întâlnite la pacienții cu NIHSS > 7 la externare și cu index Barthel ≤80 evaluat în ziua 5 de la internare. Totodată pacienții cu mRS ≥ 3 evaluat la 3 luni și cu grad mare de dizabilitate au nivele semnificativ mai reduse ale RANTES la debutul bolii comparativ cu pacienții cu evoluție favorabilă.

NCAM (CD56) aparține superfamiliei imunoglobulinelor, fiind exprimat la nivelul neuronilor și celulelor gliale, cu rol în migrarea neuronală, facilitând interacțiunea intercelulară cu rol important în plasticitatea sinaptică și procesele cognitive [190]. Nivelul plasmatic al NCAM a fost mai redus la pacienți comparativ cu lotul martor, fără a suferi modificări semnificative în dinamică. În literatură sunt raportate puține rezultate referitoare la nivelele NCAM în diverse patologii versus lot control. Atât în schizofrenie [82] cât și în scleroză multiplă [191] concentrația NCAM este mai mică la pacienți comparativ cu lotul control. Deși în studiul nostru nu am găsit o relație între BI, mRS la externare și NCAM, surprinzător este faptul că nivelul plasmatic al NCAM la debut, este mai mare (la limita de semnificație statistică) la pacienții care au avut o evoluție nefavorabilă pe termen lung. Un studiu experimental a demonstrat faptul că nivelul izoformei NCAM-180 (180 kDa) a scăzut semnificativ în ziua 1 după MCAO, în timp ce metabolitul său de 65 kDa, format ca urmare a clivării sub acțiunea proteolitică a MMP-9, a crescut [83]. Componenta solubilă a NCAM provine din clivarea componentei extracelulare a NCAM-ului transmembranar sub acțiunea proteolitică a variatelor MMP-lor, determinând creșterea nivelului produșilor de proteoliză [192]. O posibilă explicație pentru creșterea NCAM la pacienții cu evoluție nefavorabilă ar putea fi o acțiune mai agresivă a MMP-lor asupra domeniilor extracelulare ale NCAM, cu creșterea produșilor de proteoliză, respectiv sNCAM recunoscuți în reacția imună. Totodată, NCAM pare a fi un predictor uni- și multivariat al severității evaluată cu NIHSS în ziua 5 de la internare. Deși apare ca un predictor al mRS nefavorabil la 3 luni în modelul neajustat, după ajustarea pentru covariatele luate în calcul, NCAM își pierde capacitatea de predicție.

Factorul de creștere derivat plachetar (PDGF) cu cele 4 izoforme, precum și receptorii aferenți PDGFRA (α) și PDGFRB (β) au rol important la nivel cerebral, atât

din punct de vedere al supraviețuirii neuronale în condiții patologice, dar și din punctul de vedere al plasticității sinaptice și neuroregenerării [183]. În funcție de mecanismele patogene implicate, sau de locul leziunii, PDGF conferă efecte neuroprotective acționând pe multiple căi: creșterea activității enzimelor antioxidante și reducerea stresului oxidativ, activarea căii fosfatidylinositol 3-kinaza PI3-K/Akt și reducerea consecutivă a excitotoxicității; experimental fiind dovedit că post-ischemic, moartea neuronală selectivă este precedată de o reducere dramatică a PDGF-B care deține roluri antiapoptotice [183]. În studiul de față, PDGF-AA și PDGF-AB/BB se asociază pozitiv cu o evoluție favorabilă și cu un grad redus al dependenței funcționale; în literatură nu am găsit studii care să analizeze implicarea acestor mediatori în evoluția pacientului ischemic. Narasimhalu și colab. au constatat că un nivel plasmatic crescut al PDGF-AB/BB se asociază cu un risc scăzut de recurență a AVC ischemice [86]. Corelația foarte bună dintre BDNF și PDGF-AA și -AB/BB pe care am constatat-o, se poate explica prin prisma faptului că există o acțiune sinergică a acestor factori trofici, experimental constatându-se că modularea progenitorilor de către BDNF se face prin intermediul PDGFRB [183].

BDNF aparține familiei neurotrofinelor, cu rol în dezvoltarea, diferențierea și protecția neuronală, valorile plasmatice reducându-se odată cu înaintarea în vârstă [193], nivele reduse ale BDNF asociindu-se cu degradarea cognitivă și funcțională chiar și în absența unui episod ischemic major [194]. Efectele protective ale BDNF după ischemia cerebrală pot fi induse prin multiple mecanisme, cele mai importante fiind accentuarea neurogenezei și angiogenezei, dar și creșterea plasticității sinaptice [195]. Deși BDNF poate servi ca un agent neuroprotectiv endogen, nivelul plasmatic relativ redus face ca traversarea BHE să fie insuficientă pentru recuperarea post-ischemică [195], astfel că identificarea unor molecule care să crească nivelul BDNF-ului plasmatic [196], sau chiar administrarea unor molecule chimerice acestui peptid constituie ținte terapeutice [195]. Deși un studiu a relevat faptul că valorile periferice ale BDNF ar fi mai mari la pacienții cu dureri neuropatice cronice post-ischemice [197], totuși nivelele se asociază pozitiv cu evoluția favorabilă post-ischemică [198]. Rezultatele obținute în prezentul studiu subliniază rolul neuroprotectiv al BDNF, atât prin prisma corelației foarte bune cu restul factorilor implicați în neuroprotecție și regenerare, precum PDGF-AA, -AB/BB, dar și prin asocierea pozitivă cu o evoluție favorabilă și cu un grad mai redus de dependență funcțională.

6.6 Concluzii

Valorile plasmatice ale MPO, sICAM și MMP-9 măsurate la debutul bolii, sunt semnificativ mai mari la pacienți comparativ cu lotul control, în ziua a 5-a revenind la valori apropiate lotului control. Neurotrofinele precum BDNF, PDGF-AA, PDGF-AB/BB au valori semnificativ mai reduse la debut în cazul formelor severe (NIHSS>7), fiind

totodată predictorii independenți pentru dependența funcțională a pacienților cu AVC ischemice, putând fi astfel utili ca markeri de prognostic post-AVC. RANTES și neurotrofinele BDNF, PGDF-AA și PDGF-AB/BB se asociază pozitiv cu un grad redus de dependență funcțională.

7. Discuții generale

Declanșarea cascadei ischemice consecutiv reducerii fluxului de oxigen și glucoză, reprezintă placa turnantă pentru declanșarea proceselor care implică atât componentele celulare cât și pe cele umorale ale sistemului imun, precum microglia și leucocitele, moleculele de adeziune, dar și citokinele, chemokinele și factorii neurotrofici. Este bine cunoscut faptul că multe componente imune celulare sau umorale au rol dual, în faza acută având rol distructiv în timp ce în faza post-acăută/tardivă a ischemiei cerebrale au un efect de remodelare tisulară.

Prognosticul accidentului vascular cerebral ischemic prezintă o foarte mare variabilitate interindividuală, pe de-o parte datorită factorilor nemodificabili (vârsta, sex) și a celor modificabili (comorbidități, edemul cerebral sau complicațiile), dar și prin prisma opțiunilor terapeutice (eligibilitatea pentru terapia de recanalizare, transformarea hemoragică post-recanalizare).

Predicția deteriorării neurologice precoce sau a evoluției severității ischemiei, precum și evaluarea înainte de terapia de recanalizare în vederea identificării pacienților care pot dezvolta complicații post-recanalizare, poate aduce îmbunătățiri substanțiale managementului îngrijirii bolnavului cu AVC ischemic. Până la momentul de față nu există un biomarker validat, specific leziunilor cerebrale ischemice, astfel că identificarea unor markeri periferici (care necesită intervenție minimală asupra bolnavului) poate oferi posibilitatea optimizării terapiei, reducerii riscului de apariție a complicațiilor și îmbunătățirea evoluției pacientului.

Toate modificările post-ischemice se reflectă la un moment dat în periferie, nivelul plasmatic al biomarkerilor nefiind întotdeauna în relație directă cu amplitudinea leziunii. Acest fapt se datorează fie lipsei de specificitate, fie efectului BHE cu creșterea tardivă în periferie, sau a neutralizării de către proteaze, astfel că de multe ori utilitatea clinică este limitată.

Pe lângă markerii de risc, de diagnostic sau de severitate, și cei de predicție a dizabilității pe termen scut și lung au importanță în managementul pacientului, cunoscut fiind faptul că această boală determină un grad mare de invaliditate, cu impact financiar atât pentru familie cât și pentru sistemul de sănătate.

Datorită faptului că stresul inflamator și oxidativ din ischemia cerebrală implică o pleiadă de procese patologice, identificarea unui singur biomarker periferic care să reflecte gravitatea leziunii nu este suficient. Astfel, un panel de biomarkeri care să evalueze atât inflamația dar și gradul de distrucție neuronală și a BHE, pe lângă markerii de hemostază sau ai stresului oxidativ, ar fi de preferat. Totodată,

identificarea unor markeri surogat pentru sistemul nervos ar putea fi de utilitate și în evaluarea răspunsului terapeutic la diverse medicamente.

După excluderea clară a comorbidităților și a factorilor confuzivi și identificarea clară a unor markeri cu potențial în evaluarea pacientului cu ischemie cerebrală, trecerea de la faza de cercetare la faza de validare presupune analiza riguroasă, în studii bine concepute, pe un număr mare de pacienți.

Astfel un potențial biomarker periferic care să reflecte gradul de afectare cerebrală după AVC ar putea fi inclus într-un scor de evaluare, alături de datele clinice și imagistice, pentru o mai bună evaluare și monitorizare a pacientului.

În prima parte (studiul 1) a tezei am analizat din punct de vedere morfologic și IHC modificările care apar la nivel cerebral și splenic după inducerea ischemiei cu fir intraluminal la șobolanii rasa Wistar, cu și fără precondiționare cu acizi grași polinesaturați Omega 3. Am avut în vedere faptul că în rândul populației în general (lot martor și pacienți) am găsit un index Omega 3 mult mai mic față de recomandări (studiul 2). Totodată DHA plasmatic și membranar a fost semnificativ mai redus în cazul pacienților comparativ cu lotul martor, în timp ce raportul AA/DHA+EPA a fost mai mare la pacienți, înclinând balanța spre efectele proinflamatoare ale AA. În plus, am găsit asocieri pozitive ale colesterolului seric cu evoluția favorabilă evaluată cu mRS la 3 luni.

Am constatat experimental că în condiții de ischemie cerebrală, pe lângă bine cunoscutele efecte benefice ale Omega 3, de reducere a profilului unor citokine proinflamatoare, este modulată activitatea TIMP-1, MCP-1 și a factorului XIII, cel din urmă mai puțin studiat în context inflamator.

În continuare am analizat mai mulți markeri periferici, cu diferite implicații în procesele complexe fiziopatologice din ischemia cerebrală, cu ajutorul tehnicilor multiplex de tip Biochip Array și xMAP. În urma analizei statistice, o parte dintre acești markeri și-au dovedit asocierea cu severitatea bolii la debut (D-Dimerii, hsCRP), sau la externare (PDGF-AA, PDGF-AB/BB, BDNF, RANTES), în timp ce alții au fost identificați ca predictori independenți pentru un mRS nefavorabil la 3 luni (D-Dimerii, sTNFR-1, PDGF-AA/AB, BDNF, RANTES, PAI-1), sau pentru un index Barthel nefavorabil în ziua 5 de la internare (PDGF-AB/BB, BDNF, RANTES).

Deși recrutarea pacienților a fost riguroasă, totuși studiul are câteva limitări care trebuie amintite. În primul rând, numărul pacienților raportat la incidența acestei patologii a fost relativ redus datorită limitărilor financiare, analiza unor markeri fiind făcută în dinamică. În al doilea rând, pentru pacienții recrutați valoare mediană a NIHSS a fost de 4 (min.0-max.22), cu o proporție relativ redusă a cazurilor severe, care cu mare probabilitate s-a reflectat în rezultatele statistice.

8. Concluzii generale

Scopul studiilor cuprinse în această teză a fost de a analiza evoluția gradului de dizabilitate al pacienților cu AVC ischemice, prin prisma biomarkerilor periferici implicați în diverse etape patologice ale ischemiei cerebrale (inflamație, tromboză, distrucție tisulară, dar și neuroregenerare și modelare post-lezională). Totodată a fost analizată capacitatea de predicție a acestor markeri asupra riscului de evoluție nefavorabilă pe termen scurt și lung pentru pacienții cu ischemie cerebrală.

Concluzionând rezultatele, la final se poate spune că:

- Indexul Omega-3 este relativ scăzut în populația investigată, cu mult sub media recomandată, cu o valoare semnificativ mai redusă la pacienții care au suferit un episod ischemic cerebral acut. Totodată raportul $\omega 6/\omega 3$ este mai mare la pacienți comparativ cu lotul martor. Concentrația plasmatică crescută a acidului stearic se asociază cu mRS nefavorabil la externare.

- Nivelul mai redus al colesterolului total la internare se asociază cu un grad mai mare de dizabilitate la externare; iar pentru predicția la 3 luni, NIHSS la internare, vârsta și colesterolul total au fost cei mai relevanți predictori.

- Suplimentarea cu Omega-3 reduce expresia celulelor inflamatoare în penumbra, expresia MMP-9 în core și în penumbra, precum și nivelul citokinelor proinflamatoare TNF-alfa și MCP-1. La nivel splenic, Omega 3 determină o accentuare a hematopoiezei extramedulare și hiperplazie mieloidă. Omega-3 reduce expresia FXIII citosolic cu rol în activarea pe cale alternativă a macrofagelor, acesta fiind un mecanism antiinflamator mai puțin analizat.

- D-Dimerii și sTNFR-1 sunt predictori independenți pentru deficitul funcțional evaluat cu mRS la 3 luni. Adăugarea CRP, D-Dimerilor, NGAL și sTNFR-1 la modelul clinic bazal, oferă o mai mare sensibilitate și specificitate în predicția deficitului funcțional.

- Neurotrofinele de tipul PDGF-AA/AB și BDNF, dar și PAI-1 au fost identificate ca predictori independenți semnificativi, asociindu-se negativ cu mRS nefavorabil la 3 luni, fără a aduce însă îmbunătățiri semnificative modelului clinic de estimare a deficitului funcțional.

- RANTES și PDGF-AA/AB, PDGF-AA și BDNF se asociază pozitiv cu un grad redus de dependență funcțională.

Analiza potențialilor biomarkeri pe un eșantion reprezentativ, urmată de validarea în vederea utilizării în practica curentă reprezintă o mare provocare pentru

studiile viitoare, dată fiind heterogenitatea acestei patologii, dar și implicarea acestor biomarkeri în comorbidități asociate. Din acest motiv analiza unui panel de markeri care să abordeze mai multe aspecte fiziopatologice ale aceluiași proces, este poate calea de urmat, mai ales că la momentul de față tehnologia avansată permite evaluarea simultană a unui număr impresionant de analiți din volume mici de probă în timp relativ scurt.

9. Originalitatea tezei

Prin folosirea noilor tehnologii, respectiv biochip array și xMAP, care permit analiza simultană a unui număr mare de biomarkeri, prezenta teză și-a propus să identifice un panel de markeri periferici care să ofere informații referitoare la procesele patofiziologice declanșate în ischemia cerebrală (inflamația, stresul oxidativ, tulburările de hemostază, disfuncția endotelială, neurodistrucția sau neuroregenerarea). Analiza acestor biomarkeri periferici, ușor abordabili la pacientul ischemic, oferă indicii valoroase cu privire la intensitatea proceselor inflamatorii și distructive care sunt în interrelație, oferind astfel o imagine de ansamblu a procesului patologic.

În general, parametrii analizați sunt studiați în context experimental (model de MCAO) sau culturi neuronale, cu inducerea ischemiei. Astfel, dintre neurotrofinele analizate în prezenta lucrare, PDGF-A și AB/BB sunt mai puțin studiate în contextul evoluției și gradului de dependență al pacientului cu AVC ischemic.

Identificarea unor biomarkeri de interes și ulterior validarea acestora pentru utilizarea de rutină va aduce beneficii în managementul pacientului ischemic, prin predicția apariției complicațiilor, evaluarea eficacității terapiei sau predicția evoluției pacientului și a gradului de dependență pe termen lung.

Lucrarea de față evidențiază nivelul redus al DHA la pacienții cu AVC ischemice, comparativ cu lotul martor. Deși numeroase studii experimentale au demonstrat beneficiile pre- sau post-condiționării cu acizi grași polinesaturați Omega 3 în ischemia cerebrală, prin multitudinea de efecte antiinflamatoare și de promovare a neurogenezei și angionogenezei, rezultatele studiilor observaționale sunt contradictorii, fapt pentru care aceste suplimente nu sunt incluse în managementul pacientului cu patologie cerebro-vasculară.

După datele de care dispunem, este singurul studiu din România care are o abordare complexă a pacienților cu AVC ischemice din punctul de vedere al biomarkerilor periferici (care ținesc mai multe procese fiziopatologice) și al relației cu gradul de dependență și dizabilitate.

REFERINȚE

1. Sacco RL, Kasner SE, Broderick JP, Caplan LR, Connors JJ, Culebras A, et al. An Updated Definition of Stroke for the 21st Century: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2013;44(7):2064–89.
2. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2016 Update. *Circulation*. 2016;133(4):e38–360.
3. Feigin VL, Norrving B, Mensah GA. Global Burden of Stroke. *Circ Res*. 2017;120(3):439–48.
4. OECD/European Observatory on Health Systems and Policies. Romania: Profilul Sănătății în 2017. OECD Publishing; 2017. http://www.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration-health/romania-profilul-sanatatii-in-2017_9789264285392-ro
5. Emberson J, Lees KR, Lyden P, Blackwell L, Albers G, Bluhmki E, et al. Effect of treatment delay, age, and stroke severity on the effects of intravenous thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke: A meta-analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet*. 2014;384(9958):1929–35.
6. Balami JS, Sutherland BA, Buchan AM. Complications associated with recombinant tissue plasminogen activator therapy for acute Ischaemic stroke. *CNS Neurol Disord - Drug Targets*. 2013;12(2):155–69.
7. Waele S D, Idrissi S H. The Link between Early Biomarker Analysis and the Neurological Outcome in Stroke Patients. *Cardiovasc Pharmacol Open Access*. 2017;06(05):1–8.
8. Stanca DM, Marginean IC, Soritau O, Muresanu DF. Plasmatic markers for early diagnostic and treatment decisions in ischemic stroke. *J Med Life*. 2015;8(Spec Issue):21–5.
9. Toni D, Sacco RL, Brainin M, Mohr JP. Classification of Ischemic Stroke. In: *Stroke*. Elsevier. 2011:293–306.
10. Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 1993;24(1):35–41.
11. Radu AR, Terecoasă EO, Băjenaru OA, Tiu C. Etiologic classification of ischemic stroke: Where do we stand? *Clinical Neurology and Neurosurgery*. Elsevier. 2017; 159: 93–106.
12. Ay H. Classification of Ischemic Stroke. In: *Stroke: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*. Elsevier. 2016: 295–307.
13. Cole JW, Stack CA. Large Artery Occlusive Disease. In: *Ischemic Stroke - Updates*. InTech. 2016; Available from: <http://www.intechopen.com/books/ischemic-stroke-updates/large-artery-occlusive-disease>.
14. Adams HP, Biller J. Classification of Subtypes of Ischemic Stroke. *Stroke*. 2015;46(5):e114 LP-e117.

15. Zazulia AR, Markham J, Powers WJ. Cerebral Blood Flow and Metabolism in Human Cerebrovascular Disease. In: *Stroke*. Elsevier Inc. 2011:44–67.
16. Vidale S, Consoli A, Arnaboldi M, Consoli D. Postischemic Inflammation in Acute Stroke. *J Clin Neurol*. 2017;13(1):1–9.
17. Neuhaus AA, Couch Y, Hadley G, Buchan AM. Neuroprotection in stroke: The importance of collaboration and reproducibility. *Brain*. Oxford University Press; 2017; 140:2079–92.
18. Majid A. Neuroprotection in Stroke: Past, Present, and Future. *ISRN Neurol*. 2014;2014:1–17.
19. Deb P, Sharma S, Hassan KM. Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. *Pathophysiology*. 2010;17:197–218.
20. Dugue R, Nath M, Dugue A, Barone FC. Roles of Pro- and Anti-inflammatory Cytokines in Traumatic Brain Injury and Acute Ischemic Stroke. *Mechanisms of Neuroinflammation*. InTech; 2017. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70099>
21. George PM, Steinberg GK. Novel Stroke Therapeutics: Unraveling Stroke Pathophysiology and Its Impact on Clinical Treatments. *Neuron*. 2015; 87: 297–309.
22. Atkinson AJ, Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ, Hoth DF, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2001; 69:89–95.
23. Simats A, García-Berrocso T, Montaner J. Neuroinflammatory biomarkers: From stroke diagnosis and prognosis to therapy. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2016;1862(3):411–24.
24. Bustamante A, Sobrino T, Giralto D, García-Berrocso T, Llombart V, Ugarrita I, et al. Prognostic value of blood interleukin-6 in the prediction of functional outcome after stroke: A systematic review and meta-analysis. *J Neuroimmunol*. 2014;274(1–2):215–24.
25. Bustamante A, Simats A, Vilar-Bergua A, García-Berrocso T, Montaner J. Blood/Brain Biomarkers of Inflammation After Stroke and Their Association With Outcome: From C-Reactive Protein to Damage-Associated Molecular Patterns. *Neurotherapeutics*. 2016;13(4):671–84.
26. Vella A, Rizza RA, John Service F. Hypoglycemia and Pancreatic Islet Cell Disorders. In: *Goldman's Cecil Medicine: Twenty Fourth Edition*. Elsevier; 2011: 1499–505.
27. Zietemann V, Wollenweber FA, Bayer-Karpinska A, Biessels GJ, Dichgans M. Peripheral glucose levels and cognitive outcome after ischemic stroke—Results from the Munich Stroke Cohort. *Eur Stroke J*. 2016;1(1):51–60.
28. Kim YS, Kim C, Jung KH, Kwon HM, Heo SH, Kim BJ, et al. Range of glucose as a glycemic variability and 3-month outcome in diabetic patients with acute ischemic stroke. Wang X, editor. *PLoS One*. 2017;12(9):e0183894.
29. Xue W-Y, Xu Y-C, Wu Y-W, Yang M. Observation of elevated fasting blood glucose and functional outcome after ischemic stroke in patients with and without diabetes. *Oncotarget*. 2017;8(40):67980–9.

30. Ock S, Jo S, Lee JB, Jin Y, Jeong T, Yoon J, et al. Comprehensive interpretation of hyperglycemia and hyperosmolality on the clinical outcomes among ischemic stroke patients. *Am J Emerg Med*. 2016;34(12):2343–50.
31. Amarenco P, Bogousslavsky J, Callahan A, Goldstein LB, Hennerici M, Rudolph AE, et al. High-Dose Atorvastatin after Stroke or Transient Ischemic Attack. *N Engl J Med*. 2006;355(6):549–59.
32. Yeramaneeni S, Kleindorfer DO, Sucharew H, Alwell K, Moomaw CJ, Flaherty ML, et al. Hyperlipidemia is associated with lower risk of poststroke mortality independent of statin use: A population-based study. *Int J Stroke*. 2017; 12(2):152–60.
33. Cuadrado-Godia E, Jiménez-Conde J, Ois A, Rodríguez-Campello A, García-Ramallo E, Roquer J. Sex differences in the prognostic value of the lipid profile after the first ischemic stroke. *J Neurol*. 2009;256(6):989–95.
34. Jain M, Jain A, Yerragondur N, Brown RD, Rabinstein A, Jahromi BS, et al. The Triglyceride Paradox in Stroke Survivors: A Prospective Study. *Neurosci J*. 2013;2013:1–7.
35. Superko HR, Superko AR, Lundberg GP, Margolis B, Garrett BC, Nasir K, et al. Omega-3 Fatty Acid Blood Levels Clinical Significance Update. *Curr Cardiovasc Risk Rep*. 2014;8(11):407.
36. Song TJ, Cho HJ, Chang Y, Choi K, Jung AR, Youn M, et al. Low Plasma Proportion of Omega 3-Polyunsaturated Fatty Acids Predicts Poor Outcome in Acute Non-Cardiogenic Ischemic Stroke Patients. *J Stroke*. 2015;17(2):168–76.
37. Maestrini I, Ducroquet A, Moulin S, Leys D, Cordonnier C, Bordet R. Blood biomarkers in the early stage of cerebral ischemia. *Rev Neurol (Paris)*. 2016;172(3):198–219.
38. Richard S, Lagerstedt L, Burkhard PR, Debouverie M, Turck N, Sanchez JC. E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 as biomarkers of 3-month outcome in cerebrovascular diseases. *J Inflamm (United Kingdom)*. 2015;12(1):61.
39. Bonaventura A, Liberale L, Vecchié A, Casula M, Carbone F, Dallegrì F, et al. Update on inflammatory biomarkers and treatments in ischemic stroke. *Int J Mol Sci*. 2016;17(12):1–53.
40. Velasquez MT. Management of Hypertension in Chronic Kidney Disease. In: *Chronic Renal Disease*. Elsevier; 2014: 634–645.
41. Ho E, Karimi Galougahi K, Liu C-C, Bhindi R, Figtree GA. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biol*. 2013;1(1):483–91.
42. Manzanero S, Santro T, Arumugam T V. Neuronal oxidative stress in acute ischemic stroke: Sources and contribution to cell injury. *Neurochem Int*. 2013;62(5):712–8.
43. Fabbrini E, Serafini M, Colic Baric I, Hazen SL, Klein S. Effect of Plasma Uric Acid on Antioxidant Capacity, Oxidative Stress, and Insulin Sensitivity in Obese Subjects. *Diabetes*. 2014;63(3):976–81.
44. Tay A, Tamam Y, Yokus B, Ustundag M, Orak M. Serum myeloperoxidase levels in predicting the severity of stroke and mortality in acute ischemic stroke patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(11):1983–8.

45. Forghani R, Kim HJ, Wojtkiewicz GR, Bure L, Wu Y, Hayase M, et al. Myeloperoxidase Propagates Damage and is a Potential Therapeutic Target for Subacute Stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2015;35(3):485–93.
46. Kim H, Wei Y, Lee JY, Wu Y, Zheng Y, Moskowitz MA, et al. Myeloperoxidase Inhibition Increases Neurogenesis after Ischemic Stroke. *J Pharmacol Exp Ther.* 2016;359(2):262–72.
47. Sapojnikova N, Asatian N, Kartvelishvili T, Kalandadze I, Tsiskaridze A. Plasma Antioxidant Activity as a Marker for a Favourable Outcome in Acute Ischemic Stroke. In: *InTech. INTECH.* 2012:142–68.
48. Matsuo R, Ago T, Hata J, Wakisaka Y, Kuroda J, Kuwashiro T, et al. Plasma C-Reactive Protein and Clinical Outcomes after Acute Ischemic Stroke: A Prospective Observational Study. *PLoS One.* 2016;11(6):e0156790.
49. Yu H, Huang Y, Chen XY, Nie WB, Wang YJ, Jiao Y, et al. High-sensitivity C-reactive protein in stroke patients – The importance in consideration of influence of multiple factors in the predictability for disease severity and death. *Journal of Clinical Neuroscience.* 2017; 36:12–9.
50. Jha MK, Lee S, Park DH, Kook H, Park KG, Lee IK, et al. Diverse functional roles of lipocalin-2 in the central nervous system. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 2015; 49:135–56.
51. Wen Hai Chou YCW. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin and Matrix Metalloproteinase-9 as Potential Biomarkers for Stroke: A Pilot Study. *J Neurol Neurophysiol.* 2015;06(02):6–11.
52. Doll DN, Barr TL, Simpkins JW. Cytokines: Their Role in Stroke and Potential Use as Biomarkers and Therapeutic Targets. *aging Dis.* 2014;5(5):294–306.
53. Shaafi S, Sharifipour E, Rahmanifar R, Hejazi S, Andalib S, Nikanfar M, et al. Interleukin-6, a reliable prognostic factor for ischemic stroke. *Iran J Neurol.* 2014; 13(2):70–6.
54. Feng Q, Wang Y, Yang Y. Neuroprotective effect of interleukin-6 in a rat model of cerebral ischemia. *Exp Ther Med.* 2015;9(5):1695–701.
55. Gertz K, Kronenberg G, Kälin RE, Baldinger T, Werner C, Balkaya M, et al. Essential role of interleukin-6 in post-stroke angiogenesis. *Brain.* 2012;135(6):1964–80.
56. Garcia JM, Stillings SA, Leclerc JL, Phillips H, Edwards NJ, Robicsek SA, et al. Role of interleukin-10 in acute brain injuries. *Frontiers in Neurology. Frontiers Media SA.* 2017; 8:244.
57. Bonifačić D, Toplak A, Benjak I, Tokmadžić VS, Lekić A, Kučić N. Monocytes and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) as early predictors of disease outcome in patients with cerebral ischemic stroke. *Wien Klin Wochenschr.* 2016;128(1–2):20–7.
58. Kawata K, Liu CY, Merkel SF, Ramirez SH, Tierney RT, Langford D. Blood biomarkers for brain injury: What are we measuring? *Neurosci Biobehav Rev.* 2016;68:460–73.
59. Glushakova O, Glushakov A, Miller E, Valadka A, Hayes R. Biomarkers for acute diagnosis and management of stroke in neurointensive care units. *Brain Circ.* 2016;2(1):28-47.
60. Shaw G. Chapter 21 The Use and Potential of pNF-H as a General Blood Biomarker of Axonal. *Brain Neurotrauma Mol Neuropsychol Rehabil Asp.* 2015; cap 21:1–17.

61. Yan Y, Jensen K, Brown A. The polypeptide composition of moving and stationary neurofilaments in cultured sympathetic neurons. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2007; 64(4):299–309.
62. Rusu MC, Jianu AM, Pop F, Hostiuc S, Leonardi R, Curcă GC. Immunolocalization of 200kDa neurofilaments in human cardiac endothelial cells. *Acta Histochemica*. 2012; 114 (8): 842–845.
63. Pant HC. Dephosphorylation of neurofilament proteins enhances their susceptibility to degradation by calpain. *Biochem J*. 1988; 256(2):665–8.
64. Sherif M, Esmael A, Abd-El Salam O. Diagnostic and Prognostic Significance of Blood Biomarkers in Acute Ischemic Stroke. *Int Neuropsychiatr Dis J*. 2016; 6(1):1–11.
65. Rosell A, Cuadrado E, Ortega-Aznar A, Hernández-Guillamon M, Lo EH, Montaner J. MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke. *Stroke*. 2008;39(4):1121–6.
66. Rosell A, Lo EH. Multiphasic roles for matrix metalloproteinases after stroke. *Current Opinion in Pharmacology*. 2008; 8(1):82–9.
67. Rosell A, Ortega-Aznar A, Alvarez-Sabín J, Fernández-Cadenas I, Ribó M, Molina CA, et al. Increased brain expression of matrix metalloproteinase-9 after ischemic and hemorrhagic human stroke. *Stroke*. 2006;37(6):1399–406.
68. Dibajnia P, Morshead CM. Role of neural precursor cells in promoting repair following stroke. *Acta Pharmacol Sin*. 2013;34(1):78–90.
69. Vafadari B, Salamian A, Kaczmarek L. MMP-9 in translation: from molecule to brain physiology, pathology, and therapy. *J Neurochem*. 2016;139(S2):91–114.
70. Lakhan SE, Kirchgeßner A, Tepper D, Leonard A. Matrix metalloproteinases and blood-brain barrier disruption in acute ischemic stroke. *Front Neurol*. 2013;4:32. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fneur.2013.00032/abstract>
71. Abd-Elhamid Y, Tork M, Abdulghani M. Prognostic value of D-dimer measurement in patients with acute ischemic stroke. *Egypt J Neurol Psychiatry Neurosurg*. 2016;53(3):146–50.
72. Yang X, Gao S, Ding J, Chen Y, Zhou X, Wang J-E. Plasma D-Dimer Predicts Short-Term Poor Outcome after Acute Ischemic Stroke. Salluh JIF, editor. *PLoS One*. 2014;9(2):e89756.
73. Bao W, Qi X, Li Li H, Hou F, Zhang X, Wang R, et al. Correlation of D-dimer level with the inflammatory conditions: a retrospective study. *AME Medical Journal*. 2017;2:27.
74. Borges ÁH, O'Connor JL, Phillips AN, Baker J V, Vjecha MJ, Losso MH, et al. Factors associated with D-dimer levels in HIV-infected individuals. *PLoS One*. 2014;9(3):e90978.
75. Ifergane G, Ovanyan A, Toledano R, Goldbart A, Abu-Salame I, Tal A, et al. Obstructive Sleep Apnea in Acute Stroke: A Role for Systemic Inflammation. *Stroke*. 2016;47(5):1207–12.
76. Ribo M, Montaner J, Molina CA, Arenillas JF, Santamarina E, Quintana M, et al. Admission fibrinolytic profile is associated with symptomatic hemorrhagic transformation in stroke patients treated with tissue plasminogen activator. *Stroke*. 2004;35(9):2123–7.

77. Park S-Y, Kim J, Kim O-J, Kim J-K, Song J, Shin D-A, et al. Predictive value of circulating interleukin-6 and heart-type fatty acid binding protein for three months clinical outcome in acute cerebral infarction: multiple blood markers profiling study. *Crit Care*. 2013;17(2):R45.
78. Tokami H, Ago T, Sugimori H, Kuroda J, Awano H, Suzuki K, et al. RANTES has a potential to play a neuroprotective role in an autocrine/paracrine manner after ischemic stroke. *Brain Res*. 2013;1517:122–32.
79. Liu Y-C, Tang S-C, Liou H-C, Tu H-J, Kang K-H, Liou H-H, et al. Pathological Role of Two Chemokines RANTES and MIF in Ischemic Stroke. *FASEB J*. 2017;31(659):19. https://www.fasebj.org/doi/abs/10.1096/fasebj.31.1_supplement.659.19
80. Pikula A, Beiser AS, Chen TC, Preis SR, Vorgias D, DeCarli C, et al. Serum brain-derived neurotrophic factor and vascular endothelial growth factor levels are associated with risk of stroke and vascular brain injury: Framingham Study. *Stroke*. 2013;44(10):2768–75.
81. Lasek-Bal A, Jędrzejowska-Szypułka H, Różycka J, Bal W, Holecki M, Duława J, et al. Low Concentration of BDNF in the Acute Phase of Ischemic Stroke as a Factor in Poor Prognosis in Terms of Functional Status of Patients. *Med Sci Monit*. 2015; 21:3900–5.
82. An HM, Zhou LP, Yu Y, Fan H, Fan FM, Tan S, et al. Serum NCAM levels and cognitive deficits in first episode schizophrenia patients versus health controls. *Schizophr Res*. 2018;192:457–8.
83. Shichi K, Fujita-Hamabe W, Harada S, Mizoguchi H, Yamada K, Nabeshima T, et al. Involvement of matrix metalloproteinase-mediated proteolysis of neural cell adhesion molecule in the development of cerebral ischemic neuronal damage. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011;338(2):701–10.
84. Krupinski J, Issa R, Bujny T, Slevin M, Kumar P, Kumar S, et al. A putative role for platelet-derived growth factor in angiogenesis and neuroprotection after ischemic stroke in humans. *Stroke*. 1997;28(3):564–73.
85. Boor P, Ostendorf T, Floege J. PDGF and the progression of renal disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*. Oxford University Press; 2014;29(suppl 1): i45–54.
86. Narasimhalu K, Ma L, De Silva DA, Wong M-C, Chang H-M, Chen C. Elevated Platelet-Derived Growth Factor AB/BB is Associated with a Lower Risk of Recurrent Vascular Events in Stroke Patients. *Int J Stroke*. 2015;10(1):85–9.
87. Kwah LK, Diong J. National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS). *J Physiother*. 2014;60(1): 61.
88. Yamori Y, Horie R, Handa H, Sato M, Fukase M. Pathogenetic similarity of strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and humans. *Stroke*. 2011;7(1):46–53.
89. Fluri F, Schuhmann MK, Kleinschnitz C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:3445–54.
90. Lambertsen KL, Biber K, Finsen B. Inflammatory cytokines in experimental and human stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012;32(9):1677–98.
91. Jin R, Yang G, Li G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leukoc Biol*. 2010;87(5):779–89.

92. Desestret V, Riou A, Chauveau F, Cho TH, Devillard E, Marinescu M, et al. In Vitro and In Vivo Models of Cerebral Ischemia Show Discrepancy in Therapeutic Effects of M2 Macrophages. *PLoS One*. 2013;8(6):e67063.
93. Olmos G, Lladó J. Tumor necrosis factor alpha: A link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators of Inflammation*. Hindawi. 2014; 2014:861231.
94. Lambertsen KL, Clausen BH, Babcock AA, Gregersen R, Fenger C, Nielsen HH, et al. Microglia Protect Neurons against Ischemia by Synthesis of Tumor Necrosis Factor. *J Neurosci*. 2009;29(5):1319–30.
95. Probert L. TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience*. 2015; 302: 2–22.
96. Chen Y, Hallenbeck JM, Ruetzler C, Bol D, Thomas K, Berman NEJ, et al. Overexpression of Monocyte Chemoattractant Protein 1 in the Brain Exacerbates Ischemic Brain Injury and is Associated with Recruitment of Inflammatory Cells. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23(6):748–55.
97. Zhang R, He G, Wang Y, Zhou K, Ma E. Omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit the increase in cytokines and chemotactic factors induced in vitro by lymph fluid from an intestinal ischemia-reperfusion injury model. *Nutrition*. 2015;31(3):508–514.
98. Zhang J-H. Role of the Sympathetic Nervous System and Spleen in Experimental Stroke-Induced Immunodepression. *Med Sci Monit*. 2014;20:2489–96.
99. Chauhan A, Al Mamun A, Spiegel G, Harris N, Zhu L, McCullough LD. Splenectomy protects aged mice from injury after experimental stroke. *Neurobiol Aging*. 2018;61:102–11.
100. Bu J, Dou Y, Tian X, Wang Z, Chen G. The Role of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Stroke Oxidative Medicine and Cellular Longevity. *Hindawi*. 2016;2016: 1–8. <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/6906712/>
101. Hong S, Lu Y. Omega-3 fatty acid-derived resolvins and protectins in inflammation resolution and leukocyte functions: Targeting novel lipid mediator pathways in mitigation of acute kidney injury. *Front Immunol*. 2013;4(13). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00013>.
102. Zendedel A, Habib P, Dang J, Lammerding L, Hoffmann S, Beyer C, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids ameliorate neuroinflammation and mitigate ischemic stroke damage through interactions with astrocytes and microglia. *J Neuroimmunol*. 2015;278:200–11.
103. Turner RJ, Sharp FR. Implications of MMP9 for Blood Brain Barrier Disruption and Hemorrhagic Transformation Following Ischemic Stroke. *Front Cell Neurosci*. 2016;10:56.
104. Fujimoto M, Takagi Y, Aoki T, Hayase M, Marumo T, Gomi M, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases protect blood-brain barrier disruption in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008;28(10):1674–85.
105. Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T OG. 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.
106. Williams JJ, Mayurasakorn K, Vannucci SJ, Mastropietro C, Bazan NG, Ten VS, et al. N-3 fatty acid rich triglyceride emulsions are neuroprotective after cerebral hypoxic-ischemic

- injury in neonatal mice. PLoS One. 2013;8(2):e56233. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0056233>
107. Berressem D, Koch K, Franke N, Klein J, Eckert GP. Intravenous Treatment with a Long-Chain Omega-3 Lipid Emulsion Provides Neuroprotection in a Murine Model of Ischemic Stroke - A Pilot Study. PLoS One. 2016;11(11):e0167329.
 108. Lee JH, Wei ZZ, Cao W, Won S, Gu X, Winter M, et al. Regulation of therapeutic hypothermia on inflammatory cytokines, microglia polarization, migration and functional recovery after ischemic stroke in mice. Neurobiol Dis. 2016;96:248–60.
 109. Güzel A, Rölz R, Nikkhah G, Kahlert UD, Maciacyk J. A microsurgical procedure for middle cerebral artery occlusion by intraluminal monofilament insertion technique in the rat: a special emphasis on the methodology. Exp {&} Transl Stroke Med. 2014;6(1). <https://doi.org/10.1186/2040-7378-6-6>
 110. Orădan A, Huțanu A, Horváth E, Chiriac L, Dobreanu M. Improved rat stroke model by intraluminal middle cerebral artery occlusion: a special emphasis on surgical technique. Heal Probl Civiliz. 2017;11(3):200–10.
 111. Woodruff TM, Thundiyil J, Tang S-C, Sobey CG, Taylor SM, Arumugam T V. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. Mol Neurodegener. 2011;6(1):11.
 112. Horváth E, Hutanu A, Chiriac L, Dobreanu M, Orădan A, Nagy E-E. Ischemic damage and early inflammatory infiltration are different in the core and penumbra lesions of rat brain after transient focal cerebral ischemia. J Neuroimmunol. 2018 Aug. <https://doi.org/10.1016/J.JNEUROIM.2018.08.002>
 113. Randell A, Chokshi K, Kane B, Chang H, Naiel S, Dickhout JG, et al. Alterations to the middle cerebral artery of the hypertensive-arthritis rat model potentiates intracerebral hemorrhage. PeerJ. 2016;4(Cv):e2608. <https://peerj.com/articles/2608>
 114. Riquena da SILVA A, José KRIGUER-JÚNIOR R, Carvalho SERIGIOLLE L, Minuncio Pereira GOMES H, Athiê Boy RODRIGUES D, Luiz Squilacci LEME P, et al. ABCD Arq Bras Cir Dig INCREASE IN SPLEEN VOLUME OF RATS ON EXPERIMENTAL MODEL OF PRE-HEPATIC PORTAL HYPERTENSION. ABCD Arq Bras Cir Dig. 2013;26(3):206–12.
 115. Huțanu A, Horvath E, Orădan A, Voidăzan S, Chiriac L, Lucia Muntean D, et al. FISH-OIL PRECONDITIONING MODULATES PLASMA MCP-1 AND TIMP-1 LEVELS AFTER EXPERIMENTAL INDUCED TRANSIENT CEREBRAL ISCHEMIA. Farmacia. 2018;66(4):602-608.
 116. Li K, Ding D, Zhang M. Neuroprotection of Osthole against Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury through an Anti-apoptotic Pathway in Rats. Biol Pharm Bull. 2016;39(3):336–42.
 117. Gronberg N V, Johansen FF, Kristiansen U, Hasseldam H. Leukocyte infiltration in experimental stroke. J Neuroinflammation. 2013;10:115.
 118. Valcárcel-Ares MN, Riveiro-Naveira RR, Vaamonde-García C, Loureiro J, Hermida-Carballo L, Blanco FJ, et al. Mitochondrial dysfunction promotes and aggravates the inflammatory response in normal human synoviocytes. Rheumatology. 2014;53(7):1332–43.
 119. Massaro M, Habib A, Lubrano L, Del Turco S, Lazzerini G, Bourcier T, et al. The omega-3 fatty acid docosahexaenoate attenuates endothelial cyclooxygenase-2 induction through

- both NADP(H) oxidase and PKC epsilon inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(41):15184–9.
120. Esnault S, Kelly EA, Sorkness RL, Evans MD, Busse WW, Jarjour NN. Airway factor XIII associates with type 2 inflammation and airway obstruction in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(3):767–773.e6.
121. Schroeder V, Ortner E, Mono ML, Galimanis A, Meier N, Findling O, et al. Coagulation factor XIII activation peptide and subunit levels in patients with acute ischaemic stroke: A pilot study. *Thromb Res*. 2010;126(2):e122–7.
122. Lalancette-Hébert M, Julien C, Cordeau P, Bohacek I, Weng YC, Calon F, et al. Accumulation of dietary docosahexaenoic acid in the brain attenuates acute immune response and development of postischemic neuronal damage. *Stroke*. 2011;42:2903–9.
123. Croasdell A, Duffney PF, Kim N, Lacy SH, Sime PJ, Phipps RP. PPAR γ and the Innate Immune System Mediate the Resolution of Inflammation. *PPAR Research*. Hindawi; 2015; 2015:1–20.
124. Hirono J, Sanaki H, Kitada K, Sada H, Suzuki A, Lie LK, et al. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases and matrix metalloproteinases in the ischemic brain of photothrombosis model mice. *Neuroreport*. 2018;29(3):174–80.
125. Russell KL, Berman NEJ, Levant B. Low brain DHA content worsens sensorimotor outcomes after TBI and decreases TBI-induced Timp1 expression in juvenile rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids*. 2013;89(2–3):97–105.
126. Chen J, Zhang X, Zhang C, Wang W, Chen R, Jiao H, et al. Anti-Inflammation of Natural Components from Medicinal Plants at Low Concentrations in Brain via Inhibiting Neutrophil Infiltration after Stroke. *Mediators of Inflammation*. Hindawi. 2016; 2016:1–12.
127. Xia S, Li X, Cheng L, Han M, Zhang M, Shao Q, et al. Fish Oil–Rich Diet Promotes Hematopoiesis and Alters Hematopoietic Niche. *Endocrinology*. 2015;156(8):2821–30.
128. Markaki I, Nilsson U, Kostulas K, Sjöstrand C. High Cholesterol Levels Are Associated with Improved Long-term Survival after Acute Ischemic Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2014;23(1):e47–53.
129. Vauthey C, de Freitas GR, van Melle G, Devuyst G, Bogousslavsky J. Better outcome after stroke with higher serum cholesterol levels. *Neurology*. 2000; 54(10):1944–1949.
130. Olsen TS, Christensen RHB, Kammergaard LP, Andersen KK. Higher Total Serum Cholesterol Levels Are Associated With Less Severe Strokes and Lower All-Cause Mortality. *Stroke*. 2007;38(10):2646 LP-2651.
131. Dziedzic T, Slowik A, Gryz EA, Szczudlik A. Lower Serum Triglyceride Level Is Associated With Increased Stroke Severity. *Stroke*. 2004;35(6):e151–2.
132. Pikija S, Milević D, Trkulja V, Kidemet-Piskač S, Pavliček I, Sokol N. Higher Serum Triglyceride Level in Patients with Acute Ischemic Stroke Is Associated with Lower Infarct Volume on CT Brain Scans. *Eur Neurol*. 2006;55(2):89–92.
133. Simundic AM, Nikolac N, Topic E, Basic-Kes V, Demarin V. Are serum lipids measured on stroke admission prognostic? *Clin Chem Lab Med*. 2008;46(8):1163–7.

134. Serhan CN, Chiang N, Dalii J. The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution. *Semin Immuno*. 2015;27(3):200–15.
135. Deng B, Wang C-W, Arnardottir HH, Li Y, Cheng C-YC, Dalii J, et al. Maresin biosynthesis and identification of maresin 2, a new anti-inflammatory and pro-resolving mediator from human macrophages. *PLoS One*. 2014;9(7):e102362.
136. Bannenberg G, Serhan CN. Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1801(12):1260–73.
137. Liu JJ, Green P, John Mann J, Rapoport SI, Sublette ME. Pathways of polyunsaturated fatty acid utilization: implications for brain function in neuropsychiatric health and disease. *Brain Res*. 2015;1597:220–46.
138. Belayev L, Khoutorova L, Atkins KD, Bazan NG. Robust docosahexaenoic acid-mediated neuroprotection in a rat model of transient, focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2009;40(9):3121–6.
139. Weylandt KH, Chiu CY, Gomolka B, Waechter SF, Wiedenmann B. Omega-3 fatty acids and their lipid mediators: Towards an understanding of resolvin and protectin formation. Omega-3 fatty acids and their resolvin/protectin mediators [Internet]. Vol. 97, Prostaglandins and Other Lipid Mediators. 2012;(97):73–82.
140. Hong S-H, Khoutorova L, Bazan NG, Belayev L. Docosahexaenoic acid improves behavior and attenuates blood-brain barrier injury induced by focal cerebral ischemia in rats. *Exp Transl Stroke Med*. 2015;7(1):3.
141. Vessby B, Gustafsson I-B, Tengblad S, Boberg M, Andersson A. Desaturation and Elongation of Fatty Acids and Insulin Action. *Ann NY Acad Sci*. 2006;967(1):183–95.
142. Harris WS. The omega-3 index as a risk factor for coronary heart disease. In: *American Journal of Clinical Nutrition*. American Society for Nutrition; 2008;87(6): 1997S–2002S.
143. Tero-Vescan A, Vancea S, Huțanu A, Borka-Balás R, Dobreanu M. Concordance and controversy in determining the omega-3 index in plasma and red blood cells membrane. *Farmacia*. 2015;63(4):504–9.
144. Lee M, Saver JL, Wu YL, Tang SC, Lee J Der, Rao NM, et al. Utilization of statins beyond the initial period after stroke and 1-year risk of recurrent stroke. *J Am Heart Assoc*. 2017;6(8):e005658.
145. Choi KH, Park MS, Kim JT, Chang J, Nam TS, Choi SM, et al. Serum triglyceride level is an important predictor of early prognosis in patients with acute ischemic stroke. *J Neurol Sci*. 2012;319(1–2):111–6.
146. FOOD Trial Collaboration. Poor Nutritional Status on Admission Predicts Poor Outcomes After Stroke: Observational Data From the FOOD Trial. *Stroke*. 2003;34(6):1450–6.
147. Eryurek FG, Surmen E, Oner P, Altug T, Oz H. Gamma-glutamyl transpeptidase and acetylcholinesterase activities in brain capillaries of cholesterol-fed rabbits. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1990;69(2):245–8.
148. Girod WG, Jones SP, Sieber N, Aw TY, Lefer DJ. Effects of Hypercholesterolemia on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in LDL Receptor-Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19(11):2776–81.

149. Xi L, Ghosh S, Wang X, Das A, Anderson FP, Kukreja RC. Hypercholesterolemia Enhances Tolerance to Lethal Systemic Hypoxia in Middle-Aged Mice: Possible Role of VEGF Downregulation in Brain. *Mol Cell Biochem.* 2006;291(1):205–11.
150. De Felice C, Signorini C, Durand T, Oger C, Guy A, Bultel-Poncé V, et al. F 2 -dihomo-isoprostanes as potential early biomarkers of lipid oxidative damage in Rett syndrome. *J Lipid Res.* 2011;52(12):2287–97.
151. Kopf PG, Zhang DX, Gauthier KM, Nithipatikom K, Yi X-Y, Falck JR, et al. Adrenic acid metabolites as endogenous endothelium-derived and zona glomerulosa-derived hyperpolarizing factors. *Hypertension.* 2010;55(2):547–54.
152. Iso H, Sato S, Umemura U, Kudo M, Koike K, Kitamura A, et al. Linoleic Acid, Other Fatty Acids, and the Risk of Stroke. *Stroke.* 2002;33(8):2086–93.
153. Martini AC, Forner S, Bento AF, Rae GA. Neuroprotective effects of lipoxin A4 in central nervous system pathologies. *Biomed Res Int.* 2014;2014:316204.
154. Palumbo S. Pathogenesis and Progression of Multiple Sclerosis: The Role of Arachidonic Acid–Mediated Neuroinflammation. In: *Multiple Sclerosis: Perspectives in Treatment and Pathogenesis.* Codon Publications. 2017:112–23. Doi:<http://dx.doi.org/10.15586/codon.multiplesclerosis.2017.ch7>
155. McNamara RK, Asch RH, Lindquist DM, Krikorian R. Role of polyunsaturated fatty acids in human brain structure and function across the lifespan: An update on neuroimaging findings. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* 2017.<https://doi.org/10.1016/j.plefa.2017.05.001>
156. Suda S, Katsumata T, Okubo S, Kanamaru T, Suzuki K, Watanabe Y, et al. Low serum n-3 polyunsaturated fatty acid/n-6 polyunsaturated fatty acid ratio predicts neurological deterioration in Japanese patients with acute ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2013;36(5–6):388–93.
157. Didisheim P, Mibashan R. Activation of Hageman Factor (Factor XII) by long-chain saturated fatty acids. *Thromb Diath Haemorrh.* 1963;33:346–353.
158. Göb E, Reyman S, Langhauser F, Schuhmann MK, Kraft P, Thielmann I, et al. Blocking of plasma kallikrein ameliorates stroke by reducing thromboinflammation. *Ann Neurol.* 2015;77(5):784–803.
159. De Meyer SF, Denorme F, Langhauser F, Geuss E, Fluri F, Kleinschnitz C. Thromboinflammation in stroke brain damage. *Stroke.* 2016;47(4):1165–72.
160. Perreault M, Roke K, Badawi A, Nielsen DE, Abdelmagid SA, El-Sohemy A, et al. Plasma Levels of 14:0, 16:0, 16:1n-7, and 20:3n-6 are Positively Associated, but 18:0 and 18:2n-6 are Inversely Associated with Markers of Inflammation in Young Healthy Adults. *Lipids.* 2014;49(3):255–63.
161. Li J, Zhao X, Meng X, Lin J, Liu L, Wang C, et al. High-Sensitive C-Reactive Protein Predicts Recurrent Stroke and Poor Functional Outcome: Subanalysis of the Clopidogrel in High-Risk Patients with Acute Nondisabling Cerebrovascular Events Trial. *Stroke.* 2016;47(8):2025–30.

162. Pekar T, Stojakovic T, Haas J, Simmet NE, Scharnagl H, Gatttringer T, et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin and functional outcome in ischemic stroke. *J Neurol Sci.* 2013;333:e171.
163. Rizvi I, Islam N, Ullah E, Beg M, Akhtar N, Zaheer S. Correlation between serum neuron specific enolase and functional neurological outcome in patients of acute ischemic stroke. *Ann Indian Acad Neurol.* 2013;16(4):504.
164. Singh HV, Pandey A, Shrivastava AK, Raizada A, Singh SK, Singh N. Prognostic value of neuron specific enolase and IL-10 in ischemic stroke and its correlation with degree of neurological deficit. *Clin Chim Acta.* 2013;419:136–8.
165. Huțanu A, Iancu M, Bălașa R, Maier S, Dobreanu M. Predicting functional outcome of ischemic stroke patients in Romania based on plasma CRP, sTNFR-1, D-Dimers, NGAL and NSE measured using a biochip array. *Acta Pharmacol Sin. (Special Featur Circ Biomarkers Cardiovasc Dis).* 2018;39(7):1228–36.
166. VanGilder RL, Davidov DM, Stinehart KR, Huber JD, Turner RC, Wilson KS, et al. C-reactive protein and long-term ischemic stroke prognosis. *J Clin Neurosci.* 2014;21(4):547–53.
167. Wang G, Weng Y-C, Han X, Whaley JD, McCrae KR, Chou W-H. Lipocalin-2 released in response to cerebral ischaemia mediates reperfusion injury in mice. *J Cell Mol Med.* 2015;19(7):1637–45.
168. Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L, Moses MA. The High Molecular Weight Urinary Matrix Metalloproteinase (MMP) Activity Is a Complex of Gelatinase B/MMP-9 and Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin (NGAL). *J Biol Chem.* 2001;276(40):37258–65.
169. Zi W-J, Shuai J. Plasma D-Dimer Levels Are Associated with Stroke Subtypes and Infarction Volume in Patients with Acute Ischemic Stroke. *PLoS One.* 2014;9(1):e86465.
170. Bisoendial RJ, Kastelein JJP, Levels JHM, Zwaginga JJ, Van Den Bogaard B, Reitsma PH, et al. Activation of Inflammation and Coagulation After Infusion of C-Reactive Protein in Humans. *Circ Res.* 2005;96(7):714 LP-716.
171. Csala M, Léránt I, Bánhegyi G, Kardon T, Puskás F, Mucha I, et al. Prostaglandin-independent stimulation of interleukin-6 production by fibrinogen degradation product D in perfused murine liver. *Scand J Immunol.* 1998;48(3):269–71.
172. Ceulemans A-GA-G, Zgavc T, Kooijman R, Hachimi-Idrissi S, Sarre S, Michotte Y. The dual role of the neuroinflammatory response after ischemic stroke: modulatory effects of hypothermia. *J Neuroinflammation.* 2010;7(1):74.
173. Greisenegger S, Segal H, Burgess A, Poole D, Mehta Z RP. Biomarkers and mortality after TIA and minor ischemic stroke: population-based study. *Stroke.* 2016;46(3):659–66.
174. Huang H, Huang Q, Wang F, Milner R, Li L. Cerebral ischemia-induced angiogenesis is dependent on tumor necrosis factor receptor 1-mediated upregulation of $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha V\beta 3$ integrins. *J Neuroinflammation.* 2016;13(1):227.
175. Hrytsiuk T. Serum Level of Neuron-Specific Enolase in Patients with Past Ischemic Stroke. *Arch Clin Med.* 2016;22(1):1–7.

176. Huțanu A, Maier S, Bălașa R, Oprea OR, Barbu Ș, Voidăzan S, et al. Plasma phosphorylated neurofilament heavy chains as a potential marker for ischemic stroke patients. *Rev Rom Med Lab.* 2018;26(1): 59-64.
177. Manolescu BN, Berteau M, Dumitru L, Dinu H, Iliescu A, Fărcășanu IC, et al. Dynamics of inflammatory markers in post-acute stroke patients undergoing rehabilitation. *Inflammation.* 2011;34(6):551–8.
178. Bitsch A, Klene W, Murtada L, Prange H, Rieckmann P. A longitudinal prospective study of soluble adhesion molecules in acute stroke. *Stroke.* 1998;29(10):2129–35.
179. Brough D, Denes A. Interleukin-1 α and brain inflammation. *IUBMB Life.* 2015; 67(5):323–30.
180. Terao S, Yilmaz G, Stokes KY, Russell J, Ishikawa M, Kawase T, et al. Blood cell-derived RANTES mediates cerebral microvascular dysfunction, inflammation, and tissue injury after focal ischemiareperfusion. *Stroke.* 2008;39(9):2560–70.
181. Pittaluga A. CCL5-glutamate cross-talk in astrocyte-neuron communication in multiple sclerosis. *Frontiers in Immunology.* Frontiers. 2017;8:1079.
182. Ganz P, Amarenco P, Goldstein LB, Silleesen H, Bao W, Preston GM, et al. Association of osteopontin, neopterin, and myeloperoxidase with stroke risk in patients with prior stroke or transient ischemic attacks results of an analysis of 13 biomarkers from the stroke prevention by aggressive reduction in cholesterol levels trial. *Stroke.* 2017;48(12):3223–31.
183. Funa K, Sasahara M. The roles of PDGF in development and during neurogenesis in the normal and diseased nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2014;9(2):168–81.
184. Yasar Yildiz S, Kuru P, Toksoy Oner E, Agirbasli M. Functional stability of plasminogen activator inhibitor-1. *Scientific World Journal.* Hindawi; 2014; 2014: 858293.
185. Tjärnlund-Wolf A, Brogren H, Lo EH, Wang X. Plasminogen activator inhibitor-1 and thrombotic cerebrovascular diseases. *Stroke.* 2012;43(10):2833–9.
186. Balsara RD, Ploplis VA. Plasminogen activator inhibitor-1: the double-edged sword in apoptosis. *Thromb Haemost.* 2008;100(6):1029–36.
187. Dohgu S, Takata F, Matsumoto J, Oda M, Harada E, Watanabe T, et al. Autocrine and paracrine up-regulation of blood–brain barrier function by plasminogen activator inhibitor-1. *Microvasc Res.* 2011;81(1):103–7.
188. Kim JY, Kawabori M, Yenari MA. Innate inflammatory responses in stroke: mechanisms and potential therapeutic targets. *Curr Med Chem.* 2014;21(18):2076–97.
189. Mikolajczyk TP, Nosalski R, Szczepaniak P, Budzyn K, Osmenda G, Skiba D, et al. Role of chemokine RANTES in the regulation of perivascular inflammation, T-cell accumulation, and vascular dysfunction in hypertension. *FASEB J.* 2016;30(5):1987–99.
190. Weledji EP, Assob JC. The ubiquitous neural cell adhesion molecule (N-CAM). *Annals of Medicine and Surgery.* 2014;3:77–81.
191. Dubuisson N, Lycke J, Axelsson M, Giovanonni G, Gnanapavan S. CSF NCAM levels are modulated by highly-active DMTs. In: *European Journal of Neurology.* 2017: 596–596.

192. Hinkle CL, Diestel S, Lieberman J, Maness PF. Metalloprotease-induced ectodomain shedding of neural cell adhesion molecule (NCAM). *J Neurobiol.* 2006;66(12):1378–95.
193. Oh H, Lewis DA, Sibille E. The Role of BDNF in Age-Dependent Changes of Excitatory and Inhibitory Synaptic Markers in the Human Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology.* 2016;41(13):3080–91.
194. Navarro-Martínez R, Fernández-Garrido J, Buigues C, Torralba-Martínez E, Martínez-Martínez M, Verdejo Y, et al. Brain-derived neurotrophic factor correlates with functional and cognitive impairment in non-disabled older individuals. *Exp Gerontol.* 2015;72:129–37.
195. Berretta A, Tzeng YC, Clarkson A. Post-stroke recovery: The role of activity-dependent release of brain-derived neurotrophic factor. *Expert review of neurotherapeutics.* 2014;14: 1-10
196. Zhang J, Mu X, Breker DA, Li Y, Gao Z, Huang Y. Atorvastatin treatment is associated with increased BDNF level and improved functional recovery after atherothrombotic stroke. *Int J Neurosci.* 2017;127(1):92–7.
197. Siotto M, Aprile I, Simonelli I, Pazzaglia C, Ventriglia M, Santoro M, et al. An exploratory study of BDNF and oxidative stress marker alterations in subacute and chronic stroke patients affected by neuropathic pain. *J Neural Transm.* 2017;124(12):1557–66.
198. Chan A, Yan J, Csurhes P, Greer J, McCombe P. Circulating brain derived neurotrophic factor (BDNF) and frequency of BDNF positive T cells in peripheral blood in human ischemic stroke: Effect on outcome. *J Neuroimmunol.* 2015;286:42–7.

ANEXE