

IOSUD – UNIVERSITATEA „DUNĂREA DE JOS” DIN GALAȚI

Școala doctorală de Științe Biomedicale



REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

BIOMARKERI ÎN ACCIDENTUL VASCULAR CEREBRAL ISCHEMIC

Doctorand,

ZAHARIA ANDREI-LUCIAN

Conducător științific,

Prof. univ. dr. habil. TUTUNARU DANA

Seria M: Medicină Nr. 51

GALAȚI

2026

IOSUD – UNIVERSITATEA „DUNĂREA DE JOS” DIN GALAȚI

Școala doctorală de Științe Biomedicale



REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

BIOMARKERI ÎN ACCIDENTUL VASCULAR CEREBRAL ISCHEMIC

Doctorand

ZAHARIA ANDREI-LUCIAN

Președinte

Prof. univ. dr. habil. MATEI Mădălina-Nicoleta

Decan al Facultății de Medicină și Farmacie,
Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați

Conducător științific,

Prof. univ. dr. habil. TUTUNARU Dana
Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați

Referenți științifici

Prof. univ. dr. habil. VOINESCU Doina-Carina
Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați

Conf. univ. dr. STANCA Iulia-Diana
Universitatea de Medicină și Farmacie din Craiova

Conf. univ. dr. IGNAT Emilian Bogdan
Universitatea de Medicină și Farmacie „Grigore T.
Popa” din Iași

Seria M: Medicină Nr. 51

GALAȚI

2026

Seriile tezelor de doctorat susținute public în UDJG începând cu 1 octombrie 2013 sunt:

Domeniul fundamental ȘTIINȚE INGINEREȘTI

- Seria I 1: **Biotehnologii**
- Seria I 2: **Calculatoare și tehnologia informației**
- Seria I 3: **Inginerie electrică**
- Seria I 4: **Inginerie industrială**
- Seria I 5: **Ingineria materialelor**
- Seria I 6: **Inginerie mecanică**
- Seria I 7: **Ingineria produselor alimentare**
- Seria I 8: **Ingineria sistemelor**
- Seria I 9: **Inginerie și management în agricultură și dezvoltare rurală**

Domeniul fundamental ȘTIINȚE SOCIALE

- Seria E 1: **Economie**
- Seria E 2: **Management**
- Seria E 3: **Marketing**
- Seria SSEF: **Știința sportului și educației fizice**
- Seria SJ: **Drept**

Domeniul fundamental ȘTIINȚE UMANISTE

- Seria U 1: **Filologie- Engleză**
- Seria U 2: **Filologie- Română**
- Seria U 3: **Istorie**
- Seria U 4: **Filologie - Franceză**

Domeniul fundamental MATEMATICĂ ȘI ȘTIINȚE ALE NATURII

- Seria C: **Chimie**

Domeniul fundamental ȘTIINȚE BIOMEDICALE

- Seria M: **Medicină**
- Seria F: **Farmacie**

Cuprins

Introducere(Română)	4
Introduction(English)	7
PARTEA I–STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
Capitolul 1.Accidentul vascular cerebral – trecut	13
Capitolul 2.Accidentul vascular cerebral ischemic – prezent	18
Capitolul 3.Biomarkeri - generalități	28
Capitolul 4.Relatia biomarkeri – accident vascular cerebral ischemic acut	37
4.1 Trombomodulina	39
4.2 Caspaza-3	42
4.3 Adiponectina	45
4.4 Chemerina	48
4.5 Matrix metaloproteinaza tip-9	50
4.6 Receptorul solubil al produșilor finali de glicare avansată (sRAGE)	52
PARTEA II – PARTEA PERSONALĂ	
Capitolul 5. Motivația alegerii temei	59
Capitolul 6. Ipoteza de cercetare	63
Capitolul 7. Scop și obiective	64
Capitolul 8. Material și metodă	65
Capitolul 9. Rezultate	71
Capitolul 10. Discuții	143
Capitolul 11.Concluzii	153
Capitolul 12. Contribuții personale și perspective ale cercetării	155
Lista cu figuri	158
Lista cu tabele	161
Listă cu lucrări	162
Bibliografie	165
Anexe	196

Introducere

Creierul este cel mai complex și cel mai nobil organ din corp.

Bolile cerebrovasculare reprezintă o importantă problemă de sănătate publică la nivel mondial și una din primele 3 cauze de mortalitate, alături de bolile cardiovasculare și neoplazii. Cheltuielile sistemelor de sănătate pentru tratamentul acestor pacienți sunt foarte mari, datorită faptului că spitalizarea și recuperarea sunt de lungă durată, dar și incapacității de muncă care poate rezulta după un accident vascular cerebral. De asemenea, reprezintă principala cauza de dizabilitate fizică și mentală, la populația adultă, de epilepsie secundară, demență, depresie, afecțiuni care pot complica evoluția pe termen mediu, scurt și lung.

Accidentul vascular cerebral (AVC) ischemic apare atunci când fluxul sanguin către o parte a creierului este întrerupt sau redus sever, ceea ce duce la privarea de oxigen și substanțe nutritive a țesutului cerebral.

Cauzele principale ale accidentului vascular cerebral ischemic sunt multiple; cele mai importante includ tromboza, embolia și stenoza arterială severă. Ischemia cerebrală declanșează o cascadă complexă de evenimente patologice, inclusiv disfuncția celulară, inflamația și moartea neuronală. Efectele ischemiei cerebrale pot varia de la deficite neurologice minore până la dizabilitate severă și deces.

Conform statisticilor România ocupă primul loc atât din punct de vedere al incidenței și al mortalității, cât și al dizabilității pe termen scurt, mediu și lung. Literatura de specialitate trage un semnal de alarmă datorită apariției cazurilor de AVC la vârste din ce în ce mai tinere, uneori chiar și sub 30 de ani. Stilul de viață majoritar sedentar, alimentația nesănătoasă sau supraponderabilitatea/obezitatea cresc riscul de boli cerebrovasculare, dar accidentul vascular cerebral apare și la persoane foarte active din punct de vedere profesional sau la profesii la care apare așa-numitul fenomen de *burnout*.

În prezent, cu performanțele neuroimagisticii diagnostice moderne, diagnosticul de accident vascular cerebral este aproape întotdeauna simplu. Totuși, atunci când resursele sunt limitate, biomarkerii serici sau din LCR pot să aibă valoare diagnostică, precum troponina în infarctul miocardic acut. Mai mult decât atât, în condiții de prespital un biomarker seric cu dozare rapidă poate fi fiabil pentru un diagnostic precoce.

Studiul biomarkerilor în accidentul vascular cerebral ischemic este un domeniu de cercetare în continuă dezvoltare, cu potențial de a îmbunătăți considerabil managementul clinic al acestor pacienți.

Identificarea și validarea unor biomarkeri specifici și sensibili pot facilita implementarea unor strategii terapeutice personalizate și eficiente, reducând astfel impactul acestei afecțiuni devastatoare asupra indivizilor și societății. De asemenea, biomarkerii pot oferi informații valoroase pentru înțelegerea mecanismelor patogenice și dezvoltarea de noi terapii.

Identificarea rapidă și managementul corespunzător al AVC ischemic sunt esențiale pentru reducerea sechelelor și îmbunătățirea prognosticului pacienților pe termen scurt, mediu și lung.

Tratamentul prompt poate include tromboliza, trombectomia mecanică sau administrarea de medicamente antitrombotice. Succesul intervențiilor terapeutice depinde în mare măsură de timpul care decurge de la debutul simptomelor până la inițierea tratamentului, motiv pentru care diagnosticarea precoce și precisă a AVC ischemic este crucială.

Pe măsură ce populația globală îmbătrânește și incidența factorilor de risc crește, este de așteptat ca și prevalența AVC ischemic să crească semnificativ în următoarele decenii. În acest context, cercetările asupra biomarkerilor devin esențiale, nu doar pentru intervențiile terapeutice disponibile, dar și pentru dezvoltarea unor noi metode de prevenție și terapie.

Identificarea unor biomarkeri cu sensibilitate și specificitate ridicată poate modifica abordarea medicală a AVC-ului ischemic, permițând o intervenție mai rapidă și mai eficientă.

În alegerea temei de cercetare doctorală am fost motivat de noutățile din domeniul biomarkerilor ce pot determina stabilirea cât mai precoce a diagnosticului, intervenția terapeutică, precum și estimarea prognosticului. Cercetarea biomarkerilor este importantă pentru practica medicală din mai multe considerente.

1. Diagnosticarea rapidă a unui AVC ischemic este critică pentru a iniția tratamente care pot limita extinderea leziunii cerebrale și pot reduce dizabilitățile pe termen lung. Biomarkerii specifici ajută la confirmarea unui diagnostic de AVC ischemic și pot diferenția această condiție de alte patologii cu simptomatologie similară.

2. Biomarkerii oferă informații valoroase despre severitatea accidentului vascular cerebral, permițând medicilor să stratifice riscul pacienților și să personalizeze tratamentele. De exemplu, nivelurile crescute ale unor proteine inflamatorii sau ale markerilor de leziuni neuronale pot indica un AVC mai sever, necesitând intervenții terapeutice mai agresive.

3. În timpul și după administrarea tratamentului, biomarkerii se utilizează pentru a monitoriza eficacitatea intervențiilor. Scăderea nivelurilor serice ale unor biomarkeri specifici indică un răspuns favorabil la tratament, în timp ce nivelurile crescute pot sugera necesitatea ajustării terapiei.

4. Biomarkerii sunt utili pentru prognosticul recuperării pacienților și identificarea celor cu risc crescut de complicații, permițând intervenții precoce în prevenirea sechelelor pe termen lung și pentru îmbunătățirea calității vieții pacienților.

Conform Clasificării Internaționale a Bolilor, varianta 10 (ICD-10)[1] , utilizată în prezent în România, AVC ischemic este considerat o boală a sistemului circulator ce are codificarea I63 (I63.0-I63.9).

Prin urmare, această teză de doctorat își propune să investigheze și să aducă noi perspective în domeniul cercetării biomarkerilor în cadrul accidentului vascular cerebral ischemic, contribuind astfel la avansarea cunoștințelor și practicilor medicale în acest domeniu critic al neurologiei. Eventualele implicații clinice pot schimba semnificativ abordarea de rutină pentru a îmbunătăți major rezultatele tratamentului, reducerea mortalității și a severității complicațiilor AVC ischemic.

PARTEA I

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Istoria bolilor cerebrovasculare, în special a accidentului vascular cerebral (AVC), este cunoscută de secole întregi, dar contribuțiile cele mai importante au fost realizate în ultimii 50 de ani. Primele informații cu privire la sistemul nervos central (SNC) sunt din Egiptul Antic. Papirusul descoperit de Edwin Smith (Fig.1) datează aproximativ din anul 3500 î.H și conține noțiunea de “*creier*” alături de informații despre meninge și lichidul cefalorahidian (LCR).

Hipocrate a fost printre primii care au recunoscut semnele unui accident vascular cerebral în urmă cu aproximativ 2400 ani și a utilizat termenul de “*apoplexie*”, care se traduce, din limba greacă, prin “*lovit cu violență*”. Termenul a fost utilizat pentru a descrie un pacient care a dezvoltat brusc un deficit motor asociat cu alterarea stării generale. Hipocrate a afirmat că “*atacurile de amorțeală și parestezii recurente ar reprezenta semne de apoplexie iminentă*”, descriind astfel

tabloul clinic actual al unui accident ischemic tranzitor (AIT), ca moment premergător al unui AVC ischemic constituit.

Sfârșitul secolului al XIX-lea și debutul secolului al XX-lea au marcat adevăratul punct de plecare pentru înțelegerea vascularizației cerebrale și a legăturii acesteia cu leziunile cerebrovasculare. Charles Foix este considerat primul neurolog al erei moderne care a studiat caracteristicile clinice și modelele anatomice rezultate din afectarea arterelor cerebrale anterioare (ACA), medii (ACM) și posterioare (ACP), precum și teritoriul arterei coroidiene. Lucrările lui Foix au urmărit să realizeze corelația între topografia leziunii și semnele clinice rezultate. Prima lucrare importantă despre AVC a lui Foix se referă la sindromul arterei cerebrale posterioare (ACP). Componentele majore clinice precum hemianestezia, hemianopsia și alexia la pacienții cu ocluzie completă de ACP au fost descrise în această lucrare.

C.M. Fisher propune mecanismul anatomopatologic din arterele care stau la baza AVC lacunare, AVC hemoragice și ocluziei arterei carotide. Într-un studiu clinico-patologic cu privire la ocluzia ACI la nivel cervical a punctat importanța diagnosticului stenozelor carotidiene ca bază pentru un viitor AVC. Studiul a evidențiat faptul că ocluzia s-a dezvoltat preponderent în regiunea cervicală, pe fondul unei ateroscleroze preexistente, iar accidentele ischemice tranzitorii anterioare au atras atenția asupra unui AVC constituit în perioada imediat următoare. Cercetările ulterioare au concluzionat că etiologia trombembolică ar fi la baza majorității AVC ischemice, iar sursa trombului ar putea fi localizată la nivelul cordului sau proximal, la nivelul arterelor mari. Embolul poate să apară după un infarct acut de miocard, de la nivelul auriculului atrial, asociat fibrilației atriale (permanente sau paroxistice) sau dintr-un tromb desprins de la nivelul unei stenoze ale arterei carotide interne din segmentul cervical.

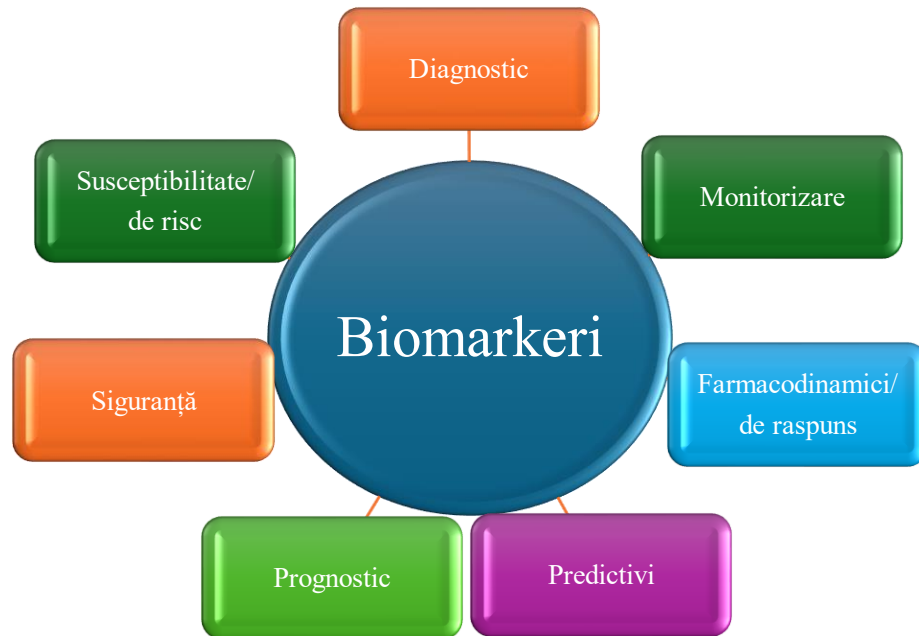
Accidentul vascular cerebral (AVC) ischemic reprezintă o afecțiune neurologică determinată de obstrucția fluxului de sânge către teritoriul cerebral deservit de vasul respectiv. Trombii care blochează vasele sanguine pot să determine ruperea vaselor, cu hemoragie cerebrală secundară. Din punct de vedere al mecanismului fiziopatologic, ischemia determină hipoxie la nivel celular, asociată cu scăderea ATP (adenozintrifosfat) și trecerea de la un metabolism aerob la cel de tip anaerob. Concomitent apare un influx intracelular de sodiu, apă și calciu care determină apariția edemului citotoxic. Alte evenimente importante sunt reprezentate de creșterea inflamației, citotoxicitate, tulburări în homeostazia neuronală, activarea cascadei complementului, acidoză locală, toate determinând în final alterarea barierei hemato-encefalice și moarte neuronală.

Noțiunea de „*marker biologic*” sau versiunea prescurtată „*biomarker*” reprezintă o categorie de indicatori care pot fi măsurați cu precizie, rezultatele fiind reproductibile. Biomarkerii sunt importanți pentru dezvoltarea unor noi terapii medicamentoase sau asistate de dispozitiv. Termenul de „*biomarker*” a fost pentru prima dată utilizat în anul 1973 de către Rho și colab., termeni asemănători fiind descriși anterior și de către Mundkur în 1949 sau Porter în 1957.

În 1998, Institutul Național de Sănătate din SUA a definit un biomarker drept „*o caracteristică măsurată și evaluată într-un mod obiectiv și fiind un indicator al proceselor fiziologice, patologice sau al răspunsului farmacologic la o intervenție din exterior*”. Organizația Mondială a Sănătății (OMS) în coordonare cu Națiunile Unite și Organizația Internațională a Muncii au definit biomarkerul ca fiind „*orice substanță, proces sau structură care poate fi măsurată în mod obiectiv și care influențează sau prezice un rezultat*”. Într-un raport comun cu privire la validarea biomarkerilor, OMS împreună cu Programul Internațional de Securitate Chimică au stabilit ca definiție „*orice proces care reflectă o interacțiune dintre organism și un potențial pericol extern (chimic, fizic sau biologic) sau intern care poate fi măsurat în mod obiectiv și reproductibil*”. Mai mult decât atât, Administrația medicamentelor și alimentelor (FDA) din SUA caracterizează biomarkerul ca fiind un indicator util în diagnosticul, prognosticul și monitorizarea procesului fiziologic sau patologic.

Exemplele de biomarkeri sunt foarte variate: temperatura, frecvența cardiacă, tensiunea arterială, imaginile radiologice (radiografice, tomografice, etc.), analizele din: sânge, lichid cefalorahidian (LCR), urină, alte fluide sau țesuturi; practic de la cele mai simple teste hemoleucogramă (HLG), coagulogramă, etc, la teste complexe de biologie moleculară.

Biomarkerii se clasifică- în funcție de diversele aplicații în practica medicală - în biomarkeri de diagnostic, biomarkeri de monitorizare, biomarkeri farmacodinamici/de răspuns, biomarkeri predictivi, biomarkeri de prognostic, biomarkeri de siguranță și biomarkeri de susceptibilitate/risc. Interesant este că, un singur biomarker poate să prezinte mai multe semnificații.



Tipuri de biomarkeri

În situația în care se produce un accident vascular cerebral ischemic acut, un biomarker trebuie să ofere informații cu privire la procesul fiziopatologic aflat în desfășurare. Biomarkerul potențial, reprezentat de o moleculă, poate fi eliberat ca urmare a ischemiei și necrozei secundare sau ca răspuns al organismului la ischemie, respectiv markeri inflamatori. Așadar, toate procesele ce apar secundar unui AVC ischemic trebuie luate în considerare pentru a detecta cei mai fiabili biomarkeri la un cost cât mai scăzut. Deși s-au făcut progrese importante în acest domeniu pentru validarea unor biomarkeri, încă nu există un biomarker sensibil, fiabil, ușor de recoltat și analizat, având un cost rezonabil pentru diagnostic.

Trombomodulina

Trombomodulina este importantă pentru funcționarea optimă a tuturor organelor, fiind exprimată de celulele endoteliale care căptușesc toate categoriile de vase (artere, vene, limfatice și capilare). Datorită acestei poziționări strategice, trombomodulina joacă un rol important în reglarea coagulării, imunității înnăscute, inflamației și mobilității celulare. Trombomodulina este sintetizată de o multitudine de celule: progenitoare hematopoietice, dendritice, keratinocite, epiteliale alveolare pulmonare, uroteliale, mezoteliale, musculare netede vasculare, neutrofile, monocite, macrofage, epiteliale corneene și unele celule tumorale.

Trombomodulina a fost sugerată ca fiind un potențial biomarker al leziunilor endoteliului vascular, fiind observate valori crescute în patologii cardiovasculare precum ateroscleroza, hipertensiunea arterială, accidentul vascular cerebral ischemic sau infarctul acut de miocard.

Caspaza-3

Caspazele sunt reprezentate de un complex de enzime (proteaze), inițial inactive (zimogeni), cu rol primordial în moartea programată (apoptoză), inflamație, diferențierea celulară, enzime prezente la mai multe regnuri, inclusiv la oameni. Funcționarea optimă a caspazelor este necesară pentru o multitudine de celule din organism precum neuroni, cardiomiocite sau hematii. Apoptoza este un proces crucial pentru eliminarea celulelor din organism care sunt deteriorate, dar și pentru a permite dezvoltarea diferențiată a altor celule normale. Tulburarea acestui mecanism poate să determine apariția unor afecțiuni precum neoplazii, afecțiuni neurodegenerative, autoimune, etc. Aceste enzime scindează capătul C-terminal al aspartatului, rareori al glutamatului și foarte rar al fosfoserinei.

Bolile neurologice acute sau cronice, printre care accidentul vascular cerebral ischemic, scleroza laterală amiotrofică, boala Parkinson sau boala Huntington sunt caracterizate printr-o distrugere importantă a neuronilor sau a celulelor de susținere. Caspaza-3 a mai fost cercetată și în alte afecțiuni generale precum neoplaziile, afecțiunile cardiovasculare, diabetul zaharat, bolile inflamatorii sau reumatologice. Necroza celulară extinsă este prezentă și la mai multe zile după evenimentul acut, caracterizată de fragmentarea cromatinei și lezarea ADN-ului, precum și de activarea caspazelor. Astfel, moartea neuronală este localizată în zona centrală a AVC, iar apoptoza în zona de penumbră ischemică. Experimental, au fost descrise 3 tipuri de leziuni la șoareci: ocluzia arterei cerebrale medii, ocluzia de arteră carotidă și un tip de leziune hipoxic-ischemică, în toate acestea fiind activată caspaza-3.

Adiponectina

Adiponectina (ADP) este un hormon secretat de adipocite, are o acțiune vastă la nivelul organismului, intervenind în metabolismul lipidic și glucidic; totodată are rol antifibrotic, vasodilatator, antiinflamator, antioxidant și determină apoptoză la nivelul celulelor tumorale. Are un rol de protecție împotriva diabetului zaharat și al aterosclerozei. ADP fiind în relație cu factorii de risc cardiovasculari precum HTA, diabetul zaharat sau dislipidemia, asocierea cu accidentul vascular cerebral este previzibilă. Unele studii au observat o corelație negativă între adiponectină și boala cardiovasculară, iar alte studii au concluzionat că nivelul seric nu ar influența apariția unui

viitor accident vascular cerebral. Hipoadiponectinemia a crescut mortalitatea la 5 ani după evenimentul acut și a crescut riscul de cardiomiopatie și HTA la pacienții cu diabet zaharat.

Chemerina

Chemerina este o proteină cu multiple funcții, având rol esențial în hipertensiunea arterială, ciroza hepatică, infarctul acut de miocard, diabetul zaharat și alte afecțiuni metabolice înrudite. Chemerina are multiple roluri potențiale în diverse patologii, printre care boli cardiovasculare, diabet zaharat, afecțiuni metabolice, inflamație, ateroscleroză, artită, psoriazis, neoplazii. Valorile chemerinei serice sunt mai mari într-o multitudine de afecțiuni cardiovasculare. Corelațiile chemerină-hipertensiune arterială, chemerină-ateroscleroză au fost observate atât la șoareci, cât și la oameni. Chemerina secretată la nivelul adipocitelor perivascularare determină creșterea contracției fibrelor musculare netede de la acest nivel prin intermediul unei substanțe numită chem1.

Matrix metaloproteinaza tip-9

Matrix metaloproteinazele (MMP-urile) au roluri polimorfe, printre care remodelarea tisulară și metabolizarea diferitelor proteine constitutive din matricea extracelulară. MMP-urile influențează proliferarea, migrarea și diferențierea celulară, dar ar putea avea un rol în apoptoză, angiogeneză, regenerarea tisulară și răspunsul imun înăscut sau dobândit.

Matrix metaloproteinazele au fost considerate biomarkeri cu multiple funcții: diagnostic, monitorizare sau predicție, datorită faptului că valorile serice sunt crescute în multiple patologii. MMP-urile sunt corelate cu bolile cardiovasculare datorită rolului în dezvoltarea și progresia aterosclerozei. Astfel, apare pierderea fibrelor de collagen, elastină și alte proteine cu rol contractil din peretele vascular, cu risc de apariție a accidentului vascular cerebral sau a infarctului acut de miocard. Dintre toate MMP-urile, matrix metaloproteinaza de tip 9 a fost cea mai studiată în cazul accidentului vascular cerebral ischemic. Disfuncția MMP-9 poate să determine ruperea unor părți sau a întregii plăci de ateroscleroză. Studiile au arătat o corelație pozitivă între severitatea accidentului vascular sau a transformării hemoragice a unui AVC ischemic cu nivelul de MMP-9. Totuși, sunt puține studii care au cercetat rolul MMP-9 în AVC ischemic.

Receptorul solubil al produșilor finali de glicare avansată (sRAGE)

Receptorul solubil al produșilor finali de glicare avansată (sRAGE) este considerat a fi în relație cu protecția împotriva infecțiilor, a evenimentelor cardiovasculare sau a patologiilor legate

de vârstă. Ultimii ani au adus un volum mare de informații cu privire la rolurile descrise sau la prognosticul diverselor afecțiuni medicale, dar concluziile nu au fost constante.

Funcția pe care o realizează sRAGE din punct de vedere fiziologic a constituit subiectul a numeroase dezbateri. Astfel, o teorie larg acceptată este aceea că sRAGE are un rol antiinflamator, prin legarea de anumiți liganzi cu rol în blocarea acestui proces. Confirmarea acestui rol a fost evidențiat prin studii experimentale pe animale de laborator cu antecedente personale patologice de diabet zaharat și/sau boala cardiovasculară, la care prin administrarea de sRAGE s-a îmbunătățit funcția vasculară renală, scăderea leziunilor ischemice miocardice și reducerea progresiei aterosclerozei. Alte studii au concluzionat că reduce nivelul markerilor stresului oxidativ în momentul în care este administrat la animalele cu disfuncție vasculară. Astfel, sRAGE are un eventual rol antioxidant.

PARTEA II

PARTEA PERSONALĂ

Motivația alegerii temei

Accidentul vascular cerebral (AVC) ischemic reprezintă una dintre cele mai frecvente și severe cauze de morbiditate și mortalitate la nivel global. Caracterizat printr-o obstrucție bruscă a fluxului sanguin către creier, AVC ischemic determină moartea celulelor nervoase și afectarea funcțiilor neurologice la nivel focal sau general.

Deși progresele în diagnostic și tratament au redus semnificativ mortalitatea asociată acestei patologii, există încă multe provocări în ceea ce privește diagnosticul precoce, prognosticul și managementul eficient al acestei afecțiuni severe.

Alegerea temei *Biomarkeri în accidentul vascular cerebral ischemic* este motivată de importanța critică a identificării și utilizării biomarkerilor pentru a îmbunătăți evoluția clinică a acestor pacienți. În contextul AVC-ului ischemic, biomarkerii pot oferi informații valoroase privind diagnosticarea rapidă, stratificarea riscului, monitorizarea progresiei bolii, eficiența tratamentului și aprecierea prognosticului pe termen scurt, mediu și lung.

Important în alegerea temei este impactul socio-economic semnificativ al AVC-ului ischemic. Costurile asociate tratamentului, reabilitării și pierderii productivității sunt extrem de importante, afectând nu doar pacienții cu familiile lor, ci și partea financiară a sistemelor naționale de sănătate. Îmbunătățirea diagnosticării și tratamentului prin utilizarea biomarkerilor poate reduce aceste costuri și poate ameliora calitatea vieții pacienților.

Diagnosticul precoce al AVC-ului ischemic este esențial pentru inițierea rapidă și eficientă a tratamentului, cu reducerea semnificativă a leziunilor cerebrale și îmbunătățirea prognosticului pacienților. În prezent, diagnosticarea se bazează pe imagistica cerebrală și pe evaluarea clinică, care pot întârzia uneori intervenția terapeutică. Biomarkerii specifici vor facilita identificarea rapidă a accidentului vascular cerebral ischemic prin teste simple de sânge, permițând astfel intervenția medicală mai promptă și mai eficientă.

Una dintre provocările majore în tratamentul AVC-ului ischemic este fereastra terapeutică extrem de restrânsă. Pentru ca revascularizarea farmacologică sau trombectomia mecanică să fie eficiente, acestea trebuie administrate în primele ore de la debutul simptomelor. Biomarkerii pot juca un rol crucial în accelerarea diagnosticării și în stratificarea pacienților care pot beneficia cel mai mult de aceste intervenții, reducând astfel timpul de la debutul simptomelor până la tratament și maximizând șansele de recuperare.

Medicina de precizie este un domeniu emergent care vizează personalizarea tratamentelor pe baza caracteristicilor individuale ale pacienților. Biomarkerii specifici vor ajuta la identificarea subgrupurilor de pacienți cu răspunsuri diferite la terapii și vor ghida astfel alegerea tratamentelor optime pentru fiecare pacient. Această abordare personalizată va îmbunătăți eficaciența tratamentelor, reducând riscul efectelor adverse.

Studiul biomarkerilor în AVC ischemic nu se limitează doar la diagnostic și prognostic, ci crează calea pentru noi descoperiri terapeutice. Înțelegerea mecanismelor moleculare și genetice care stau la baza AVC-ului ischemic va conduce la dezvoltarea de noi terapii care să vizeze aceste mecanisme specifice, oferind soluții pentru pacienții care nu răspund la tratamentele actuale.

Scop și obiective

Teza de doctorat își propune să aducă o contribuție personală printr-o actualizare judicioasă în managementul pacienților cu accident vascular cerebral ischemic prin explorarea rolului biomarkerilor în diverse etape ale acestei afecțiuni.

Scopuri

1. Elucidarea mecanismelor moleculare implicate în patogeneza AVC-ului ischemic.
2. Identificarea biomarkerilor pentru diagnosticarea precoce a AVC ischemic în absența imaginii radiologice constituite, respectiv un scor ASPECTS 10 puncte.
3. Identificarea interrelației dintre biomarkeri cu antecedentele heredocolaterale și personale patologice.
4. Stratificarea riscului de mortalitate al pacienților cu AVC ischemic pe termen scurt, mediu și lung.
5. Stabilirea unui “clasament” pe baza performanțelor biomarkerilor privind diagnosticul pozitiv al AVC ischemic acut.

Obiective

1. Investigarea modului în care inflamația, stresul oxidativ și apoptoza sunt reflectate prin modificări în expresia biomarkerilor.
2. Descoperirea biomarkerilor care pot fi detectați în stadii foarte timpurii ale AVC-ului ischemic, înainte ca simptomele clinice să devină evidente; corelarea nivelurilor serice al biomarkeri pentru diagnosticul pozitiv și diferențial al accidentului vascular cerebral ischemic
3. Corelarea valorilor biomarkerilor serici cu antecedentele personale patologice pentru o abordare personalizată a tratamentului AVC ischemic în stadiul acut.
4. Corelarea nivelurilor serice ale biomarkerilor cu severitate și riscul de deces pe termen scurt, mediu și lung.
5. Corelarea performanțelor biomarkerilor (sensibilitate, specificitate, etc.) cu diagnosticul pozitiv al AVC ischemic acut.

Material și metodă

Ținând cont că patologia cerebrovasculară este foarte complexă, iar integrarea biomarkerilor moleculari specifici ischemiei cerebrale în acest domeniu este relativ nouă în practica medicală, a fost nevoie de o fază de documentare importantă pentru a realiza un review cât mai cuprinzător al literaturii de specialitate cu privire la acest subiect.

Astfel, am stabilit ipotezele de lucru, metodologia cercetării și am încercat pe cât de mult posibil, evitarea unor capcane ce ar putea să influențeze în mod negativ rezultatele cercetării.

Pentru accesarea informațiilor din literatura de specialitate s-au utilizat bazele de date consacrate precum Web of Science, PubMed, MEDLINE, Elsevier, EBSCO, Google Scholar.

La momentul actual, practica medicală are la bază sintagma “*medicina bazată pe dovezi*”, care urmărește să aplice cele mai noi cunoștințe din domeniu, coroborate cu tehnologii avansate pentru a menține la un nivel cât mai înalt starea de sănătate sau pentru a ameliora complicațiile unei anumite patologii.

Scalele standardizate (NIHSS, MRC, GCS, ADL, IADL, Barthel) reprezintă instrumente extrem de importante în evaluarea obiectivă și sistematică a pacienților pentru a cuantifica deficitul neurologic, a evalua gravitatea AVC sau pentru a monitoriza evoluția pacienților în timp. Astfel, prin utilizarea acestora se obține o standardizare în modul în care sunt evaluați pacienții, asigurându-se că evaluările sunt reproductibile între diferiți clinicieni și în diferite momente; în același timp, scalele standardizate prezintă anumite limite în diverse situații.

Pentru cercetarea doctorală am realizat un studiu prospectiv, observațional, monocentric, care a inclus 70 de pacienți prezentați în serviciul de urgență cu semne și simptome sugestive clinice de accident vascular cerebral ischemic, semne și simptome ce au debutat cu maxim 24 ore anterior prezentării.

În grupul de control au fost înrolați 68 pacienți fără semne clinice sau imagistice de accident vascular cerebral ischemic la momentul prezentării în serviciul de urgență.

Atât pacienții din lotul de studiu, cât și cei din lotul martor au fost internați ulterior în Spitalul Clinic Județean de Urgență “Sfântul Apostol Andrei” Galați, Clinica de Neurologie, în perioada ianuarie 2022 – mai 2023, fiind monitorizați 12 luni după externare din punct de vedere clinic și paraclinic.

Studiul doctoral s-a efectuat în concordanță cu Declarația de la Helsinki (1964) și a fost aprobat la nivelul spitalului de către Comisia de Etică cu numărul de înregistrare 524/07.01.2021.

Criteriile de includere în cazul lotului de studiu au fost reprezentate de: vârsta peste 18 ani la momentul prezentării în serviciul de urgență; semne clinice și simptome sugestive de accident vascular cerebral ischemic acut care debutat cu maxim 24 ore anterior prezentării; aspect computer tomograf cerebral nativ la prezentare fără leziuni heterodense cu caracter acut, respectiv un scor ASPECTS [440] (Anexa 1) de 10 puncte; consimțământul scris al pacientului sau al aparținătorilor de gradul I pentru participarea la studiul doctoral.

Criteriile de excludere în cazul lotului de studiu au fost reprezentate de: vârsta sub 18 ani la momentul prezentării, aspect computer tomografic cerebral nativ la prezentare de accident vascular cerebral hemoragic sau hemoragie subarahnoidiană; infecții sistemice diagnosticate la momentul prezentării; infarct acut de miocard concomitent la momentul prezentării; insuficiențe organice avansate precum insuficiență cardiacă clasa NYHA III/IV, boală cronică de rinichi (BCR) stadiul IV (inclusiv formele dializate), insuficiență hepatică severă; neoplazii diagnosticate la momentul prezentării; istoric de intervenții chirurgicale majore sau de traumatisme importante cu 6 luni anterior prezentării; lipsa acordului scris al pacientului sau al aparținătorilor de gradul I pentru participarea la studiul doctoral.

În situația lotului martor criteriile de includere sau de excludere au fost similare, diferența fiind reprezentată la criteriile de includere prezentarea la spital pentru o altă patologie, nonischemică cerebrală.

Au fost definite momentul prezentării T_1 în serviciul UPU-SMURD și momentul evaluării la 48 ore, respectiv T_2 în Clinica de Neurologie.

Istoricul medical în detaliu a fost obținut direct de la pacient sau în anumite cazuri de la aparținătorii acestuia, cu excepția cazurilor în care informațiile nu au putut fi obținute de la pacient sau aparținătorii acestuia, fiind colectate din baza de date Hipocrate (bilete de externare).

S-au efectuat tomografii computerizate cerebrale native la toți pacienții, excepție anumite cazuri selecționate, la care au fost efectuate și tomografii cerebrale cu contrast intravenos, conform protocoalelor standard din cadrul spitalului. Imaginile tomografice au fost stocate utilizând baza de date DICOM a spitalului și ulterior analizate de către medicii radiologi pentru evidențierea unor semne radiologice de accident vascular cerebral ischemic în stadiul acut.

La momentul prezentării s-a completat scala de accident vascular cerebral a Institutului Național de Sănătate din SUA (scala NIHSS-anexa 2 [441]; ulterior la 48 ore și la externare. Clasificarea Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment(TOAST) a fost utilizată pentru a subîmpărți pacienții cu accident vascular cerebral ischemic acut în cele 5 tipuri (ateroscleroza vaselor mari, cardioembolia, ocluzia vaselor mici (lacune), AVC de cauză nedeterminată- ESUS (embolic stroke of unknown source) și alte cauze mai rare).

Setul de analize medicale inițiale în serviciul UPU/SMURD a inclus hemograma completă cu formulă leucocitară, coagulograma completă (APTT, INR, timp de protrombina, activitate protrombinică), glicemia, alaninaminotransferaza (ALT/TGP), aspartataminotransferaza (AST/TGO), ureea, creatinina, rezerva alcalină, ionograma serică, bilirubina directă și bilirubina totală, creatinkinaza (CK); ulterior, s-au efectuat în cadrul Secției clinice de Neurologie/ATI-Neurologie lipidograma completă (colesterol total, trigliceride, lipoproteine cu densitate joasă – LDL-col și lipoproteine cu densitate crescută – HDL-col), sumarul de urină, urocultura, markerii de inflamație (proteina C reactivă, VSH- viteza de sedimentare a hematiilor, fibrinogen); analizele de control s-au reluat la 48 de ore; în situații speciale de AVC ischemic au fost solicitate analize specifice pentru decelarea etiologiei. Pe lângă acestea, toți pacienții au beneficiat la momentul internării de o radiografie cardiopulmonară standard de incidență postero-anterioară.

La momentul prezentării și ulterior la 48 ore s-au dozat următorii biomarkeri presupuși a fi specifici pentru accidentul vascular cerebral ischemic, respectiv trombomodulina (TM), adiponectina (ADP), caspaza-3 (CASP-3), chemerina (CHEM), matrix metaloproteinaza de tip-9 (MMP-9), receptorul solubil al produșilor finali de glicare avansată (sRAGE).

Probele de sânge au fost recoltate în vacutainere de biochimie cu dop roșu, cu clot activator de 9 ml pentru dozarea biomarkerilor la momentele T₁, respectiv T₂. Probele, trimise rapid în Laboratorul clinic de analize medicale, au fost păstrate 1 oră la temperatura camerei pentru decantare, apoi au fost centrifugate la 2000 rot/min, timp de 10 minute, iar serul a fost congelat la o temperatură constantă de -20°C până la analizare.

Nivelurile serice ale biomarkerilor au fost măsurate prin metoda ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), folosind următoarele kituri: HUMAN TM ELISA KIT (număr de catalog E-EL-H0166), HUMAN ADP/Acrp30 ELISA KIT (număr de catalog E-EL-H6122), HUMAN CASP-3 ELISA KIT (număr de catalog E-EL-H0017), HUMAN CHEM ELISA KIT (număr de catalog E-EL-H0698), HUMAN MMP-9 ELISA KIT (număr de catalog E-EL-H6075), HUMAN

sRAGE ELISA KIT (număr de catalog E-EL-H0295), toate acestea fiind furnizate de către ELABSCIENCE (Houston, Texas, SUA).

Procedura de lucru a biomarkerilor a necesitat pregătirea reactivilor și ulterior tehnica de lucru propriu-zisă.

Citirea s-a efectuat cu ajutorul cititorului automat DYNAREAD.

Analiza statistică a fost efectuată cu ajutorul programului statistic R versiunea 4.4.0 (Viena, Austria) – „Puppy Cup”[442]. Pentru figuri s-a utilizat programul Microsoft Office 365. Variabilele continue au fost raportate ca mediană, percentile 25-75 sau medie $\pm$ deviație standard, iar variabilele categoriale au fost raportate ca frecvență și procent. Normalitatea variabilelor continue a fost testată utilizând testul Kolmogorov–Smirnov, iar egalitatea varianțelor a fost cercetată prin testul F sau Levene, după cerințe. Pentru variabilele continue, în cazul analizei a două grupuri au fost utilizate testul t student pentru varianțe egale sau inegale, sau testul Mann–Whitney U, după caz, în funcție de tipul distribuției variabilelor.

Diferențele dintre grupuri au fost evaluate folosind testul ANOVA sau testul Kruskal–Wallis, în funcție de tipul distribuției variabilelor.

Variabilele categoriale au fost analizate folosind testul Chi-Pătrat. Performanța modelului de clasificare binar, folosind TM, CASP-3, ADP, CHEM, MMP-9, sRAGE ca biomarkeri de diagnostic, a fost evaluată prin curbe tip ROC. Indicele Youden a fost utilizat pentru a stabili cel mai bun prag de discriminare pentru variabila outcome de interes.

Au fost calculați parametri de precizie, sensibilitate, specificitate, valoare predictivă negativă (VPN) și valoare predictivă pozitivă (VPP). Performanța curbelor ROC a fost comparată folosind testul statistic DeLong.

Regresia logistică a fost utilizată pentru analiza univariabilă a impactului parametrilor relevanți asupra decesului pacienților cu accident vascular cerebral ischemic în decurs de 12 luni după episodul acut. Variabilele semnificative au fost combinate folosind modelul multivariabil pentru a identifica elementele asociate independent cu variabila outcome de interes.

Pentru toate analizele efectuate în acest studiu doctoral, valoarea $p < 0.05$ a fost considerată ca prag pentru semnificația statistică.

Rezultate

Studiul a inclus analiza datelor a 70 de pacienți diagnosticați cu accident vascular cerebral ischemic acut, precum și a unui număr de 68 de pacienți pentru lotul de control internați cu alte patologii non-ischemice cerebrale la momentul respectiv.

Pacienții cu AVC ischemic acut au fost internați în Spitalul Clinic de Urgență “Sfântul Apostol Andrei” Galați - Secția clinică Neurologie, pentru semne și simptome sugestive de accident vascular cerebral ischemic acut, dar fără imagine constituită la momentul prezentării, adică un scor ASPECTS de 10 puncte.

Tab. 2. Valorile normale ale celor 6 biomarkeri testați

Nr. crt.	Biomarker	Valori normale
1	Trombomodulina (TM)	<10 ng/ml
2	Adiponectina (ADP)	<10 ng/ml
3	Caspaza-3 (CASP-3)	<2 ng/ml
4	Chemerina (CHEM)	<10 ng/ml
5	Matrix metaloproteinaza-9 (MMP-9)	<100 ng/ml
6	Receptorul solubil ai produșilor finali de glicare avansată (sRAGE)	<100 pg/ml

Caracteristicile demografice ale lotului cu AVC și ale lotului martor sunt prezentate în tabelul:

-în lotul cu AVC au fost înrolați 43 pacienți de sex masculin și 27 de sex feminin; din punct de vedere al mediului de proveniență au fost 46 (65.71%) de pacienți din mediul urban și 24 (34.29%) din mediul rural;

-în lotul martor au fost înrolați 68 de pacienți, dintre care 38 (55.88%) persoane de sex masculin și 30 (44.12%) de sex feminin; 36 (52.94%) dintre pacienți au fost din mediul urban și 32 (47.06%) din mediul rural;

-vârsta medie a fost de 70.24 (± 10.93) ani pentru lotul cu AVC și 69.28 (± 10.5) ani pentru lotul martor ($p=0.598$).

Din punct de vedere al caracteristicilor demografice pacienții celor 2 loturi nu prezintă diferențe semnificative statistic.

Totuși, am notat diferențe semnificative între cele două grupuri în ceea ce privește distribuția anumitor comorbidități.

Diabetul zaharat a prezentat o frecvență mai mică în lotul de studiu comparativ cu lotul martor, respectiv 15 pacienți (21.43%) vs 27 pacienți (39.71%); $p=0.020$ - diferență semnificativă statistic.

Atât pacienții cu accident vascular cerebral, cât și cazurile de control au prezentat hipertensiune arterială de diferite grade. Astfel, pacienții cu AVC au prezentat mai frecvent HTA grad III decât pacienții din lotul martor – 41 pacienți vs 25 pacienți, în timp ce HTA grad I a fost mai puțin frecventă 5 pacienți vs 11 pacienți, $p=0.027$; diferențe semnificative statistic

S-a analizat și diferența de distribuție a fibrilației atriale între cele două loturi, cu obținerea unei valori p sub nivelul de semnificație statistică ($p=0.087$), întrucât FiA a fost discret mai frecventă în lotul pacienților cu AVC față de lotul de control, cu 27 pacienți vs 17 pacienți.

Dislipidemia a fost prezentă la mai mult de jumătate din subiecții înrolați în studiu, pacienți cu AVC, existând doar o frecvență mai mică în această patologie – 55 pacienți vs 41 pacienți; $p=0.177$. Practic între cele două grupuri nu s-au înregistrat diferențe semnificative statistic.

În ceea ce privește comportamentele personale, analiza statistică a arătat diferențe semnificative statistic prin frecvențele mai mici ale consumului cronic de tutun și alcool în lotul de pacienți cu AVC față de lotul pacienților fără AVC; $p=0.02$ pentru etilism cronic cu 10 pacienți vs 21 pacienți, respectiv $p=0.007$ pentru tabagismul cronic cu 10 pacienți vs 23 pacienți (tabelul 3).

Aceste rezultate sunt în concordanță cu literatura de specialitate care a concluzionat că factorii de risc cei mai importanți pentru apariția unui accident vascular cerebral ischemic sunt reprezentați de către diabetul zaharat, hipertensiunea arterială, tulburările de ritm cardiac sau comportamentele modificate, precum etilismul și tabagismul cronic.

Un scop principal al acestei cercetări doctorale l-a reprezentat evaluarea capacității de diagnostic a celor șase biomarkeri.

Astfel, am comparat nivelul seric al acestora între pacienții diagnosticați cu accident vascular cerebral ischemic și lotul de control. Din analiză a reieșit un nivel semnificativ crescut în serul pacienților cu accident vascular cerebral ischemic a tuturor biomarkerilor, în timp ce în serul pacienților din lotul de control valorile tuturor biomarkerilor au fost în intervale normale; diferențele valorilor fiecărui biomarker având o semnificație statistică foarte înaltă cu un $p<0.001$ (tabelul 17).

Tab. 17. Valorile serice ale biomarkerilor la pacienții cu AVC vs control

Variabila	control	AVC	pvalue
ADP T ₁ (ng/ml)	3.95±1.8	17.32±6.94	<0.001
sRAGE T ₁ (pg/ml)	71.67±40.24	920.51±787.34	<0.001
CASP-3 T ₁ (ng/ml)	1.58±1.86	6.86±6.91	<0.001
CHEM T ₁ (ng/ml)	5.47±2.81	25.16±10.71	<0.001
MMP9 T ₁ (ng/ml)	38.19±22.43	405.86±140.17	<0.001
TM T ₁ (ng/ml)	3.64±1.72	23.2±9.17	<0.001

Astfel, conform tabelului 17, am obținut pentru fiecare biomarker următoarele valori la pacienții cu accident vascular cerebral ischemic acut vs control: ADP 17.32(±6.94) ng/ml vs 3.95(±1.8) ng/ml; sRAGE 920.51(±787.34) pg/ml vs 71.67(±40.24) pg/ml; CASP-3 s-a obținut o valoare 6.86(±6.91) ng/ml vs 1.58(±1.86) ng/ml; CHEM 25.16(±10.71) ng/ml vs 5.47(±2.81) ng/ml; MMP-9 405.86(±140.17) ng/ml vs 38.19(±22.43) ng/ml; TM 23.2(±9.17) ng/ml vs 3.64(±1.72) ng/ml, toate variabilele prezentând un $p < 0.001$.

Ținând cont de faptul că nivelurile serice ale biomarkerilor sunt semnificativ crescute la pacienții diagnosticați cu accident vascular cerebral ischemic în absența imaginii constituite la computerul tomograf cerebral nativ, următoarea întrebare de relevanță clinică a fost legată de capacitatea biomarkerilor de a diferenția pacienții cu accident vascular cerebral ischemic de pacienții fără această patologie, la momentul internării în spital (în primele 24 h de la debut, CT cerebral fără imagine constituită – criterii de includere în studiu).

Pentru a răspunde la această întrebare am realizat curbe ROC pentru fiecare biomarker în parte și am calculat parametrii caracteristici ale acestora.

Tab. 18. Parametrii curbelor ROC (T₁) pentru diferențierea pacienților cu AVC de pacienții fără AVC

	Valoare optimă	Specificitate	Sensibilitate	Acuratețe	VPN	VPP
sRAGE	197.191 pg/ml	1.000	0.829	0.913	0.850	1.000
ADP	7.321 ng/ml	0.985	0.971	0.978	0.971	0.986
CASP-3	2.470 ng/ml	0.897	0.886	0.891	0.884	0.899
CHEM	12.200 ng/ml	1.000	0.986	0.993	0.986	1.000
TM	8.690 ng/ml	1.000	0.986	0.993	0.986	1.000
MMP-9	101.756 ng/ml	1.000	0.986	0.993	0.986	1.000
vpn-valoare predictivă negativă; vpp-valoare predictivă pozitivă						

Astfel, coroborând valorile AUC din fig. 42-47 cu alte date statistice conform tabelului 18, se obțin următoarele rezultate pentru biomarkeri:

- sRAGE - specificitate de 1.000; sensibilitate 0.829; valoare optimă calculată de 197.191 pg/ml; o VPN de 0.850 și o VPP de 1.000; AUC de 0.926 (0.880 – 0.972);
- ADP - specificitate de 0.985; sensibilitate de 0.971; valoare optimă calculată de 7.321 ng/ml; o VPN de 0.971 și o VPP de 0.986; AUC 0.990 (0.977 – 1.000);
- CASP-3 - specificitate de 0.897; sensibilitate de 0.886; valoare optimă calculată de 2.470 ng/dl; o VPN de 0.884 și o VPP de 0.899; AUC de 0.906 (0.852 - 0.959);
- CHEM - specificitate de 1.000; sensibilitate de 0.986; valoare optimă calculată de 12.200 ng/dl; o VPN de 0.986 și o VPP de 1.000; AUC de 0.994 (0.982 - 1.000);
- TM - specificitate de 1.000; sensibilitate de 0.986; valoare optimă calculată de 8.690 ng/ml; o VPN de 0.986 și o VPP de 1.000; AUC de 0.988 (0.965 - 1.000).
- MMP-9 - specificitate de 1.000; o sensibilitate 0.986; valoare optimă calculată de 101.756 ng/ml; o VPN de 0.986 și o VPP de 1.000; AUC de 0.995 (0.986 - 1.000).

În continuare am analizat toate caracteristicile biomarkerilor din tabelul 18, pentru a evalua performanța fiecăruia cu scopul de a realiza un clasament al celor 6 biomarkeri analizați, utilizând testul DeLong. (tabelul 19)

Tab. 19. Comparatia performanței biomarkerilor pentru diagnosticul diferențial dintre AVC și control

p-value	ADP	sRAGE	CASP-3	CHEM	MMP9	TM
ADP	-					
sRAGE	0.008	-				
CASP-3	0.002	0.521	-			
CHEM	0.316	0.005	0.002	-		
MMP-9	0.201	0.004	0.001	0.445	-	
TM	0.772	0.018	0.004	0.324	0.324	-

Adiponectina a avut o performanță mai înaltă față de sRAGE pentru diferențierea pacienților cu AVC față de pacienții fără AVC dată fiind acuratețea de 0.978 vs 0.913, $p=0.008$; similar, pentru caspaza-3 cu o acuratețe de 0.978 vs 0.891, $p=0.002$. Adiponectina a avut însă o

performanță mai slabă în comparație cu chemerina (acuratețe 0.993 și $p=0.316$), matrix metaloproteinaza-9 (acuratețe 0.993 și $p=0.201$) sau trombomodulina (acuratețe 0.993 și $p=0.772$).

În privința sRAGE, acesta a avut o performanță mai bună față de caspaza-3 date fiind acuratețea 0.913 față de 0.891 și $p=0.521$. În schimb, sRAGE a avut o performanță mai scăzută față de CHEM (acuratețe 0.993 și $p=0.005$), MMP-9 (acuratețe 0.993 și $p=0.004$), TM (acuratețe 0.993 și $p=0.018$).

În privința chemerinei a avut o acuratețe similară cu MMP-9 ($p=0.445$) și cu TM ($p=0.324$), toți cei 3 biomarkeri având o acuratețe de 0.993.

Cele mai slabe performanțe ale biomarkerilor au fost ale caspazei-3 (acuratețe 0.891) față de CHEM (acuratețe 0.993 și $p=0.002$), MMP-9 (acuratețe 0.993 și $p=0.001$) sau TM (acuratețe 0.993 și $p=0.004$).

Stratificând biomarkerii după acuratețe au fost obținute următoarele rezultate: CHEM, TM și MMP-9 au prezentat fiecare o acuratețe de 0.993, urmate de ADP cu acuratețe de 0.978, sRAGE cu acuratețe de 0.913 și CASP-3 cu acuratețe de 0.891.

În cadrul studiului de cercetare doctorală am observat anumite corelații clinico-paraclinice care m-au determinat să analizez câțiva biomarkeri și din alte perspective obținând rezultate interesante.

Trombomodulina

Comparând pacienții cu AVC și cei fără AVC s-a evidențiat o creștere semnificativă a nivelurilor în sângele persoanelor cu AVC ischemic.

În mod specific, persoanele cu AVC au prezentat o concentrație medie de TM de 23.2 ± 9.17 ng/ml, în timp ce pacienții din lotul de control au prezentat un nivel semnificativ mai scăzut la 3.64 ± 1.72 ng/ml, $p < 0.001$ (Fig. 60 A).

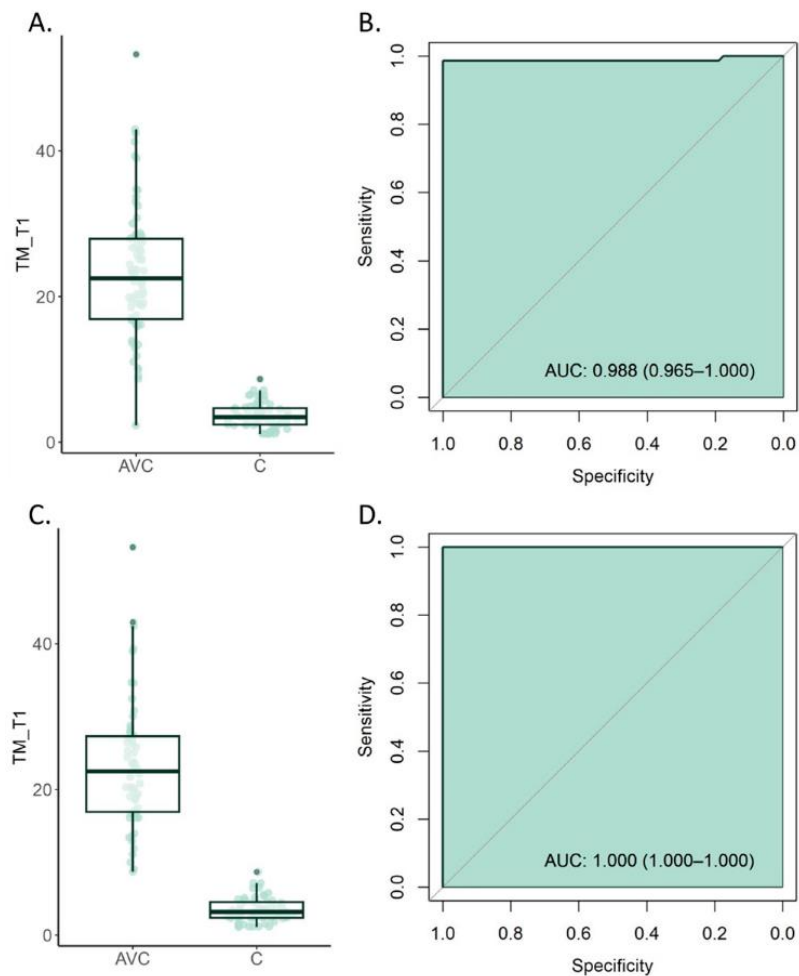


Fig. 60 (A): Analiza comparativă a nivelurilor serice de TM la pacienții cu AVC acut și martori. (B) Curba ROC și AUC pentru măsurătorile TM serice în primele 24 de ore de spitalizare. (C, D) Cifrele ilustrează aceleași analize după propensity score.

Ulterior, am efectuat o analiză ROC pentru a evalua eficacitatea TM ca biomarker precoce în identificarea pacienților cu accident vascular cerebral ischemic.

Rezultatele arată că, la un prag seric de 8.69 ng/ml, TM a prezentat o capacitate de diferențiere puternică în diagnosticarea accidentului vascular cerebral în rândul pacienților cu semne și simptome specifice, obținând o acuratețe de 0.99 (Tabelul 21). Specificitatea a fost calculată ca 1, în timp ce sensibilitatea a fost de 0.98. Mai mult, valoarea predictivă pozitivă (VPP) și valoarea predictivă negativă (VPN) au fost calculate ca fiind 1 și respectiv, 0.98 (Figura 60(B), Tabelul 21).

Tab. 22. ROC parameters for the serum levels of TM in patients with acute stroke and controls.

TM-T ₁	<u>Valoare optimă</u>	<u>Specificitate</u>	<u>Sensibilitate</u>	<u>Acuratete</u>	NPV	PPV
All cases	8.69 ng/ml	1	0.986	0.993	0.986	1
After propensity matching		1	1	1	1	1

Având în vedere prezența diferențelor în comorbiditățile și istoricul pacienților, am efectuat un propensity score pentru a atenua orice posibile distorsiuni cauzate de aceste variații.

Astfel, am alcătuit un model care a încorporat următoarele variabile, fiind patologii ale pacienților: diabet zaharat, hipertensiune arterială, elitism cronic și tabagism cronic pentru a selecta două grupuri de pacienți cu cea mai bună similaritate.

Reanalizarea acestor două grupuri (N = 58 de cazuri/grup) a evidențiat că propensity score a eliminat cu succes diferențele semnificative între toți participanții la studiu (Fig. 61; Tab. 23).

Tab. 23. Demographic, clinical and pathological profiles of patients affected by acute stroke and non-affected counterparts after propensity score matching.				
Variable		Control group N=58	Stroke group N=58	Chi Square p-value
<u>Age (years) mean±sd</u>		69.97±10.3	70.38±10.7	0.832
<u>Sex N(%)</u>	Female	24(41.38)	20(34.48)	0.444
	Male	34(58.62)	38(65.52)	
<u>Residential background N(%)</u>	Urban	29(50)	39(67.24)	0.059
	Rural	29(50)	19(32.76)	
<u>Atrial Fibrillation N(%)</u>	No	44(75.86)	36(62.07)	0.108
	Yes	14(24.14)	22(37.93)	
<u>Dyslipidemia N(%)</u>	No	29(50)	22(37.93)	0.19
	Yes	29(50)	36(62.07)	
<u>Diabetes N(%)</u>	No	37(63.79)	43(74.14)	0.229
	Yes	21(36.21)	15(25.86)	
<u>Blood Hypertension N(%)</u>	grade 1	6(10.34)	5(8.62)	0.323
	grade 2	31(53.45)	24(41.38)	
	grade 3	21(36.21)	29(50)	
<u>Chronic Alcohol use N(%)</u>	No	43(74.14)	48(82.76)	0.259
	Yes	15(25.86)	10(17.24)	
<u>Chronic Smoker N(%)</u>	No	41(70.69)	48(82.76)	0.124
	Yes	17(29.31)	10(17.24)	

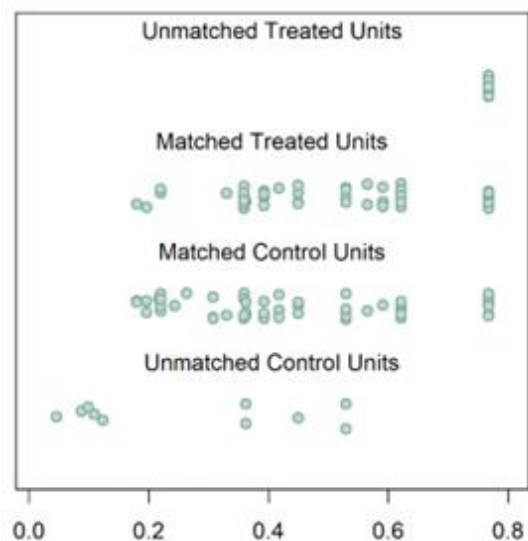


Fig. 61 Propensity score

Reanalizarea nivelurilor de TM a confirmat rezultatele anterioare. Și anume, după propensity score, grupul cu accident vascular cerebral a prezentat niveluri semnificativ crescute ale TM în sânge în comparație cu grupul de control (23.19 ± 8.91 ng/ml vs. 3.5 ± 1.7 ng/ml; valoarea $p < 0.001$) (Figura 60 C).

Mai mult, analiza ROC a demonstrat o valoare AUC excepțională de 1 (Figura 60 D, Tabel 22).

Nivelurile serice de TM au fost evaluate în două momente distincte: la prezentarea pacientului în serviciul de urgență și la 48 de ore după aceea. O comparație între aceste măsurători a evidențiat stabilitate între nivelurile TM la cele 2 măsurători, după accidentul vascular cerebral (23.2 ± 9.17 ng/ml vs. 23.09 ± 8.34 ng/ml; $p = 0.361$).

Nivelurile TM la T_1 s-au dovedit a fi mai mari la pacienții cu AVC cu dislipidemie față de cei fără dislipidemie (25.12 ± 9.64 ng/ml vs. 20.14 ± 7.57 ng/ml; $p = 0.021$) (Tabel 24).

Tab. 24. Variation of TM levels at the first measurement (T1) in patients with stroke and in the control group.

		All cases		Control group		Stroke group	
Variable		<u>mean±sd</u>	t-test p-value	<u>mean±sd</u>	t-test p-value	<u>mean±sd</u>	t-test p-value
Sex	Female	11.72±10.22	0.126	3.8±1.88	0.511	20.53±8.25	0.053
	Male	14.85±12.76		3.52±1.6		24.87±9.42	
Atrial Fibrillation <u>N(%)</u>	No	12.99±12.09	0.411	3.51±1.69	0.289	24.23±9.05	0.236
	Yes	14.78±11.31		4.02±1.82		21.55±9.3	
Dyslipidemia <u>N(%)</u>	No	10.95±9.74	0.021	3.65±1.86	0.963	20.14±7.57	0.026
	Yes	15.63±12.96		3.63±1.6		25.12±9.64	
Diabetes <u>N(%)</u>	No	14.57±11.89	0.132	3.39±1.73	0.134	22.9±8.98	0.608
	Yes	11.26±11.54		4.03±1.66		24.28±10.1	
Chronic Alcohol use <u>N(%)</u>	No	14.54±12.1	0.071	3.72±1.76	0.586	23.01±9.71	0.685
	Yes	10.19±10.36		3.47±1.65		24.3±5.02	
Chronic Smoker <u>N(%)</u>	No	14.55±11.49	0.081	3.8±1.65	0.277	22.6±8.75	0.185
	Yes	10.43±12.56		3.32±1.84		26.77±11.24	

În plus, nivelurile de TM s-au corelat cu LDL-colesterol ($p=0.002$) și colesterolul total ($p=0.06$), precum și cu transaminazele ($p<0.001$) (Tabelul 25).

Tab. 25. Correlation of TM values at T ₁ and T ₂ with the biochemical parameters of the AIS patients. <i>R</i> : Pearson correlation coefficient.				
Biochemical parameter	TM T ₁		TM T ₂	
	R	p-value	R	p-value
LDL Cholesterol [mg/dl]	0.365	0.002	0.291	0.017
HDL Cholesterol [mg/dl]	0.14	0.253	0.064	0.608
Total Cholesterol [mg/dl]	0.333	0.006	0.241	0.05
Triglycerides [mg/dl]	0.075	0.544	0.031	0.805
Total Lipids [mg/dl]	0.255	0.036	0.17	0.169
Alanine aminotransferase (ALAT) [U/L]	0.415	<0.001	0.377	0.002
Aspartate aminotransaminase (ASAT) [U/L]	0.471	<0.001	0.475	<0.001
Urea [mg/dl]	-0.114	0.345	-0.006	0.961
Creatinine [mg/dl]	-0.109	0.371	0.032	0.795
Na [mmol/L]	-0.069	0.573	-0.026	0.832
Cl [mmol/L]	0.166	0.169	0.166	0.176
K [mmol/L]	-0.196	0.104	-0.176	0.151
AR [mmol/L]	-0.09	0.458	-0.063	0.607

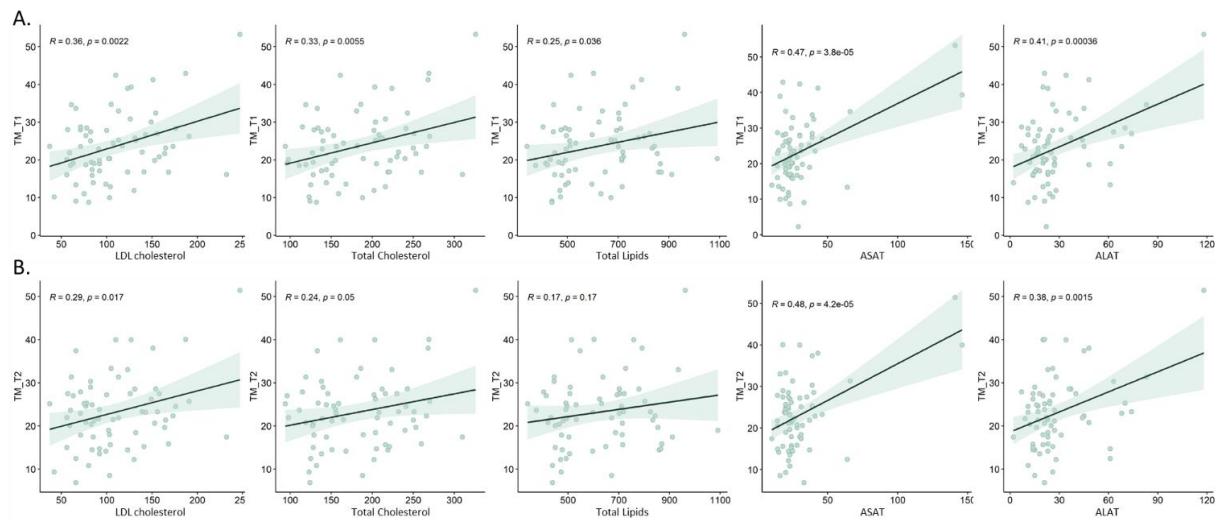


Fig. 62 Correlation plots of TM levels at T₁ (A) and at T₂ (B) with biochemical parameters in AIS patients. *R*: Pearson correlation coefficient.

Pacienții de sex masculin cu AVC ischemic au avut valori TM mai mari decât pacienții de sex feminin la ambele momente măsurate (T₁: 24.87 ± 9.42 ng/ml vs. 20.53 ± 8.25 ng/ml; p = 0.053 și T₂: 25.11 ± 8.76 ng/ml vs. 19.82 ± 6.53 ng/ml).

Am căutat să evaluez corelația dintre nivelurile serice de TM și tipul specific de accident vascular cerebral. Când am comparat pacienții cu AVC de cauză cardioembolică cu cei cu AVC de cauză aterotrombotică, analiza efectuată nu a evidențiat corelație semnificativă între nivelurile TM, atât la momentul inițial (T_1), $21,55 \pm 9,3$ ng/ml vs. $24,23 \pm 9,05$ ng/ml; $p = 0,236$, cât și ulterior la 48 de ore (T_2) $22,66 \pm 8,18$ ng/ml vs $23,35 \pm 8,53$ ng/ml; $p = 0,744$.

Tab. 26. TM values analysis with the type of stroke			
Variable	<u>mean±sd</u>		<u>t-test p-value</u>
	Cardioembolic	Atherothrombotic	
TM T1	21.55±9.3	24.23±9.05	0.236
TM T2	22.66±8.18	23.35±8.53	0.744

Am efectuat de asemenea o analiză comparativă între pacienții care au beneficiat de revascularizare intravenoasă cu alteplază ca parte a tratamentului pentru AVC (pacienții prezentându-se la spital în maxim 4.5 ore de la debutul simptomatologiei specifice) și cei care nu au beneficiat, fie din cauza că au ieșit din această fereastră limitativă de timp sau au prezentat contraindicații pentru procedură. Am observat niveluri serice de TM ușor mai scăzute la pacienții care au primit tromboliză comparativ cei fără revascularizare, atât la T_1 ($19,16 \pm 6,7$ ng/ml vs. $23,87 \pm 9,4$ ng/ml) cât și la T_2 ($19,33 \pm 7$ ng/ml vs. $23,74 \pm 23,74$ ng/ml), deși aceste diferențe nu au atins semnificație statistică ($p = 0,134$, respectiv $p = 0,124$).

În continuare, mi-am propus să evaluez corelația dintre nivelurile serice de TM și severitatea accidentului vascular cerebral, măsurată cu ajutorul scalei NIHSS. Rezultatele relevă o corelație modestă între nivelurile TM și NIHSS la momentul prezentării (coeficientul Pearson = -0,22, $p = 0,07$). Observații similare au fost evidențiate în analiza de corelație efectuată cu NIHSS la 48 de ore post-prezentare (coeficientul Pearson = -0,23, $p = 0,053$). De remarcat puterea corelației a părut să scadă cu NIHSS în momentul externării (coeficientul Pearson = -0,14, $p = 0,27$), fig. 63(A). În mod similar, această corelație a fost redusă la analiza nivelurilor serice de TM la T_2 , fig.63 (B).

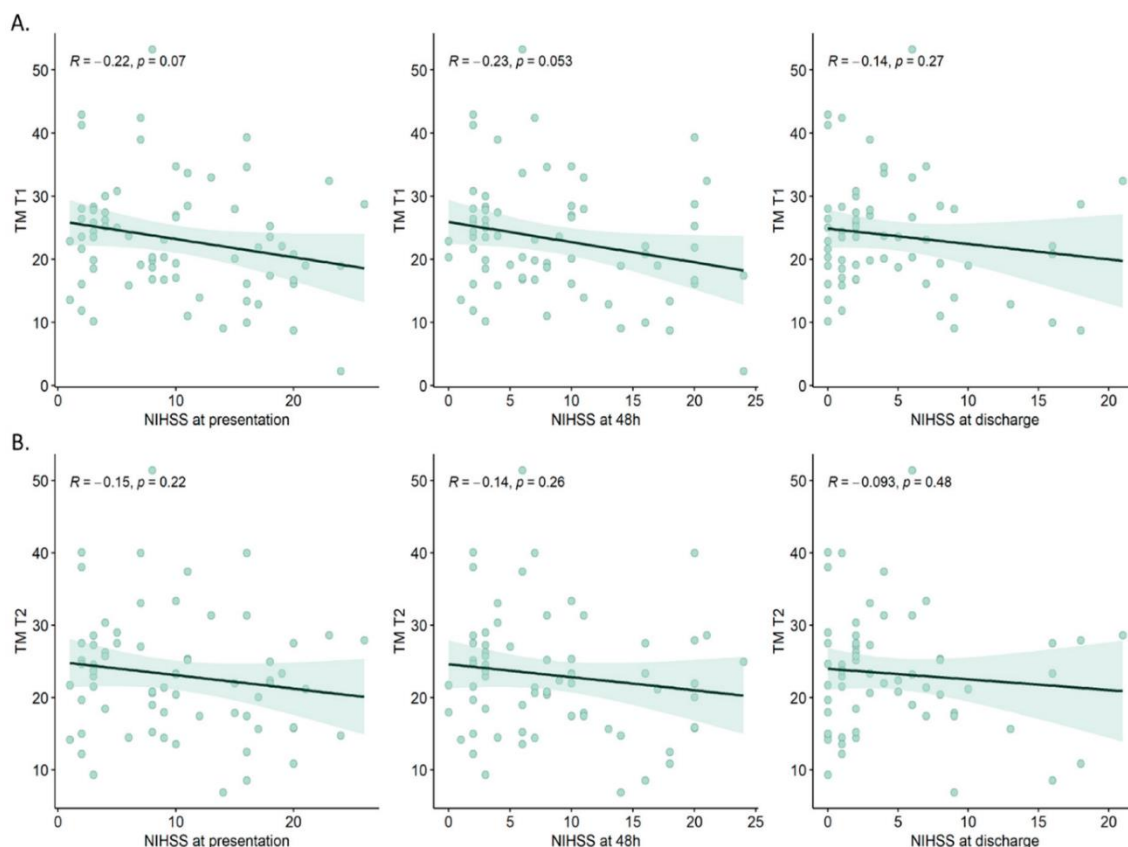


Fig. 63 Analiza corelației dintre nivelurile serice de TM la T1 (A) și la T2 (B) și NIHSS măsurate la prezentarea pacientului, 48 de ore și la externare.

R: Pearson correlation coefficient.

Caspaza-3

Analiza nivelurilor serice medii al caspazei-3 la prezentarea tuturor pacienților la spital a evidențiat valori semnificativ mai mari la pacienții cu AVC cu 5.1 (3.4; 7.9) ng/ml decât la pacienții lotul de control 1.13 (0.53; 1.91) ng/ml, $p < 0,001$, fig. 64 (A).

Puterea de calcul pentru această analiză a fost de 98,02%. Mai mult, măsurătorile repetate la pacienții cu AVC efectuate la 48 de ore după spitalizare au arătat o oarecare variație între momente, unii pacienți prezentând niveluri în creștere, în timp ce alții au avut niveluri în scădere. Cu toate acestea, nivelurile de caspază-3 au rămas constante în sângele pacienților (T₁: 5.10 (3.42; 7.90) ng/ml vs. T₂: 5.35 (3.45; 8.03) ng/ml, $p = 0,899$, fig. 64 (B).

Analiza de regresie logistică a evidențiat importanța caspazei-3 în clasificarea corectă a pacienților înrolați (84.7%). Detaliat, pacienții au avut un HR de 2,08 la momentul diagnosticului

de AVC (HR = 2.08, 95% CI = 1.65; 2.75 $p < 0,001$). Cel mai bun prag al caspazei-3 serice pentru diferențierea între AVC și martori a fost de 2.50 ng/mL.

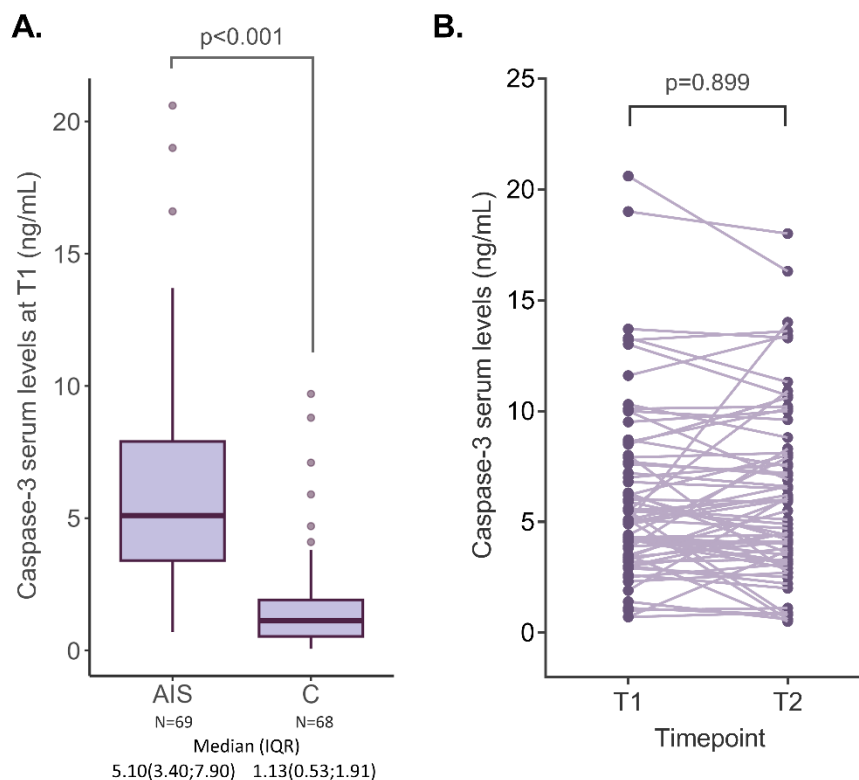


Fig. 64(A) Nivelurile de caspază-3 la pacienții AVC și subiecții de control.
(B) Nivelurile de caspază-3 la pacienții cu AVC la cele două momente (T₁ și T₂)

Mai departe, am căutat să investighez dacă nivelurile de caspază-3 au fost asociate antecedentelor personale patologice ale pacienților cu AVC. Analiza a evidențiat absența oricărei corelații dintre nivelul seric al caspazei-3 la pacienții cu AVC și parametri tip comorbidități (fibrilație atrială, obezitate, diabet zaharat, dislipidemia, hipertensiunea arterială), tipul de AVC, teritoriul vascular, NIHSS și decesul precoce pe perioada internării.

Am căutat să evaluez în continuare dacă investigațiile clinice și paraclinice efectuate la internarea pacientului au variat cu nivelurile serice de caspază-3 și am observat o asocierie slab pozitivă între nivelurile de caspază-3 și hemoglobină ($r = 0,29$; $p < 0,05$) (Fig. 65). După cum era de așteptat, NIHSS a fost asociat pozitiv cu vârsta pacienților și cu nivelurile AST.

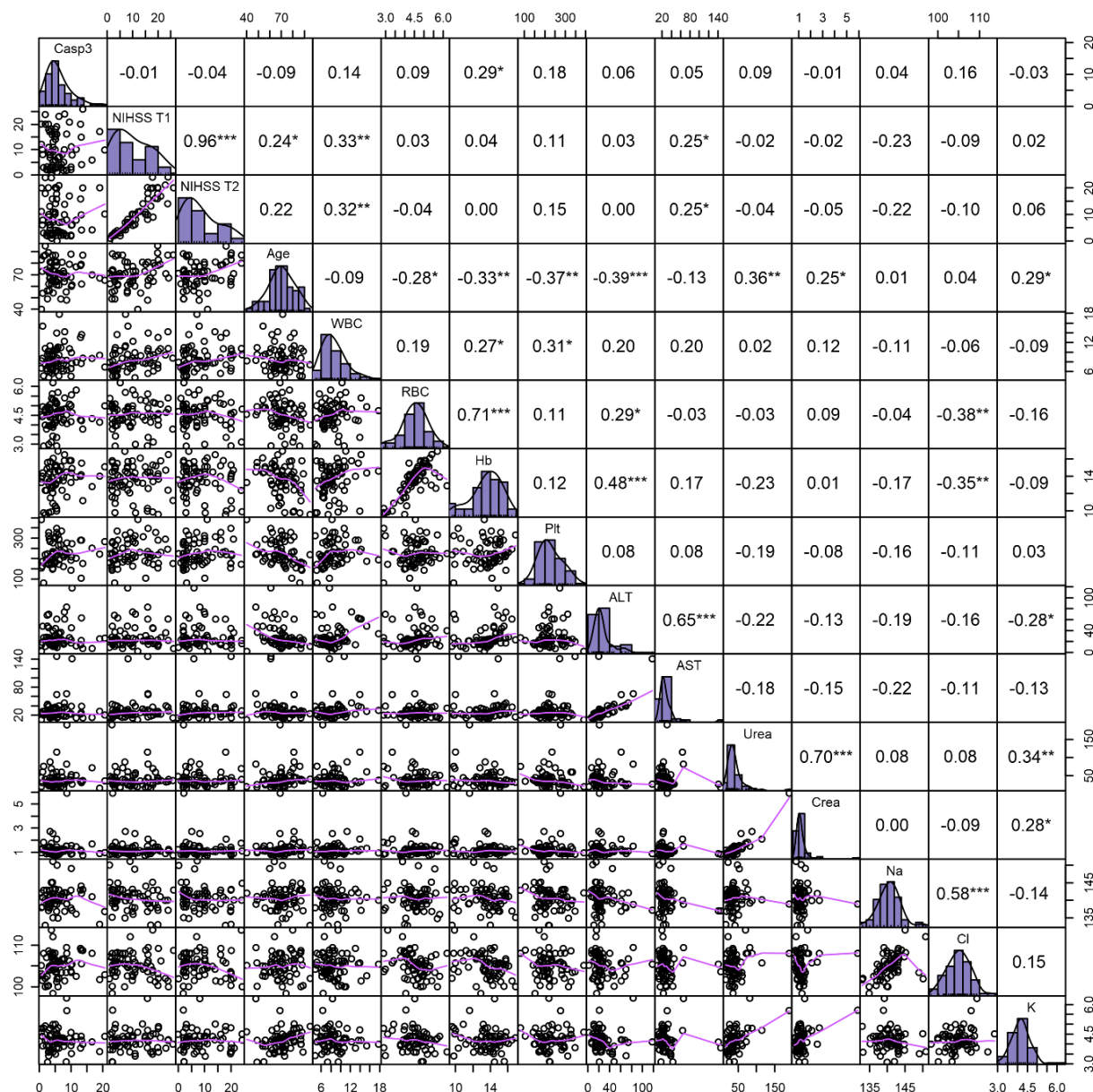


Fig. 65 Analiza corelației dintre investigațiile paraclinice și nivelurile serice de caspază-3. Valorile din cadranul din dreapta sus al graficului reprezintă coeficienții de corelație, în timp ce nivelul de semnificație este raportat cu simboluri după cum urmează: ***: 0–0,001; **: 0,001–0,01; *: 0,01–0,05; •: 0,05–0,10. Histogramele de distribuție (violet mediu) și graficele de densitate ale variabilelor sunt prezentate pe diagonală, în timp ce cadranul din stânga jos arată punctele individuale de date cu potrivirea modelului.

Ținând cont de faptul că scala NIHSS reprezintă cel mai important predictor al mortalității în rândul pacienților cu AVC [441], am căutat să cercetăm dacă stratificările suplimentare ale riscului ar putea să fie utile în cazul în care pacienții prezintă scoruri NIHSS de peste 16, corespunzătoare claselor de severitate ale moderat/sever și sever.

Dintre toți pacienții cu AVC analizați, un total de 20 (28,98%) au avut scorul NIHSS mai mare de 16 puncte. La acești pacienți am examinat caspaza-3 împreună cu alte variabile. Rezultatele au arătat că pacienții cu exitus au prezentat niveluri mai scăzute de caspază-3 la momentul T₁: 5.85 (3.15; 7.1) ng/ml vs. 3.8 (3.15; 7.1) ng/ml, $p = 0.027$; fig. 66 (A). După cum era de așteptat, un NIHSS mai mare la 48 de ore a fost, de asemenea, asociat cu un prognostic nefavorabil, respectiv 16 (15; 20) puncte vs. 20 (15; 20) puncte; $p = 0,001$.

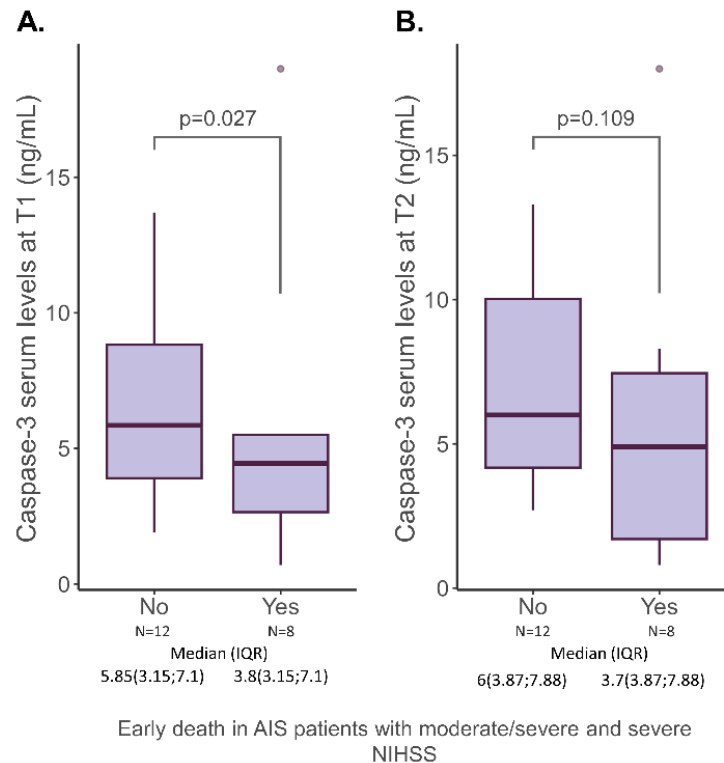


Fig. 66 Nivelurile serice de caspază-3 la 24 de ore (A) și 48 de ore (B) de la spitalizare la pacienții cu AVC și NIHSS peste 16 puncte. Dotul descris deasupra valorii p a fost identificat ca un outlier (conform testului Dixon; $p < 0,001$) și ulterior exclus din analiză, dar reținut pe grafic pentru integritatea și transparența datelor.

Adiponectina

O analiză comparativă între pacienții cu AVC ischemic și lotul martor (fără accident vascular cerebral) a evidențiat o creștere importantă a nivelurilor serice de adiponectină în situația unui AVC ischemic acut.

Specific, pacienții cu AVC au prezentat un nivel mediu de adiponectină de 16.64 ng/ml cu o varianță mai mare, în timp ce la grupul de control a fost obținut un nivel semnificativ scăzut de 3.78 ng/ml cu $p < 0,001$, fig. 67 (A).

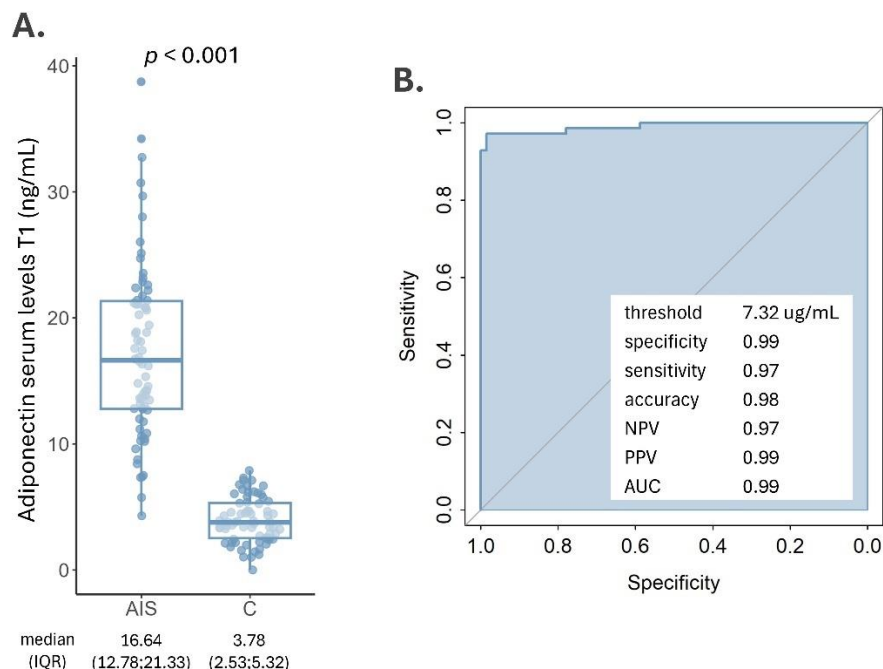


Fig. 67 (A) Nivelurile de adiponectină la pacienții cu AVC vs control; (B) Curba ROC (controale direcției < cazuri AVC) care arată capacitatea de discriminare între cazurile AVC și controalele nivelurilor serice de adiponectină în 24 de ore după debutul accidentului vascular cerebral la un prag de 7,32 ng/ml. AVC: AVC ischemic acut; C: control; NPV: valoare predictivă negativă; PPV: valoare predictivă pozitivă; AUC: aria sub curbă.

Nivelurile de adiponectină nu au prezentat modificări semnificative între cele două momente de măsurare, observându-se doar o scădere ușoară a mediei de 0.34 ng/ml; $p=0,490$.

A fost efectuată apoi o analiză ROC pentru a evalua eficacitatea adiponectinei în diagnosticarea pacienților cu AVC ischemic. Analiza a indicat că la un prag seric de 7.32 ng/ml (fig. 67B) adiponectina a prezentat o acuratețe de 0.99, o specificitate de 0.99 și o sensibilitate de 0.97, valori înalt semnificative în diagnosticul unui AVC ischemic; VPN a fost de 0.97 și VPP a fost de 0.99. Eroarea standard a fost 0.007 și intervalul de încredere de 95% a fost între 0.957 și 1. Statistica testului z de 72,69 și nivelul de semnificație, $p < 0,001$, confirmă importanța acestui test pentru diagnosticul AVC.

Nivelurile adiponectinei serice au fost semnificativ mai scăzute la pacienții cu AVC și obezitate, în ambele momente (T_1 $p=0.034$; T_2 $p=0.038$). În ceea ce privește severitatea accidentului vascular cerebral măsurat pe scala NIHSS, nivelurile mai mari de adiponectină la T_1 au fost asociate cu un accident vascular cerebral moderat/sever la externare, respectiv 20,25 (17,11;

22,14) puncte pentru pacienții cu un scor NIHSS ≥ 16 cu un $p=0,048$. Nu au fost observate alte asocieri semnificative la celelalte momente.

În termen de un an de la diagnosticul episodului AVC, 12 (17.14%) pacienți au decedat. Am investigat dacă nivelurile de adiponectină au fost corelate cu acest rezultat. Concentrațiile mediane de adiponectină au fost mai scăzute la pacienții care au supraviețuit unui episod de AVC ischemic acut, cu valori de 15.77 ng/ml la T₁, respectiv de 15.45 ng/ml la T₂, cu o semnificație statistică la limită de $p = 0.054$ respectiv, $p = 0.075$ (Fig. 68 A,B). Analizele ROC au relevat o performanță modestă a adiponectinei în prezicerea acestui rezultat în ambele momente; Cu toate acestea, adiponectina a avut VPN mari.

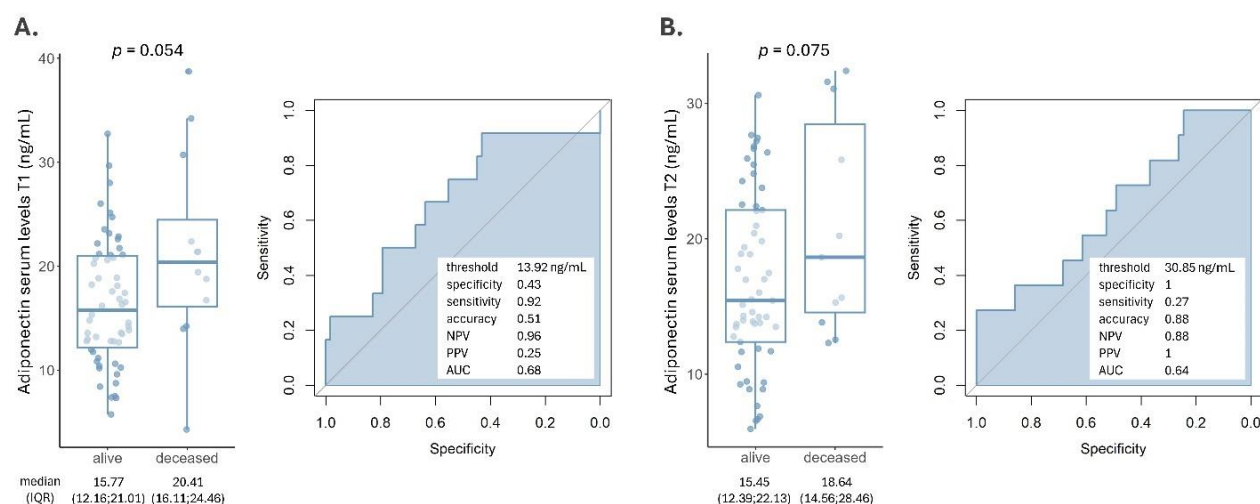


Fig. 68 Nivelurile de adiponectină la T1-24 h (A) și T2-48 h (B) între pacienții care au decedat în decurs de un an de la momentul debutului AVC și cei care au supraviețuit. Analiza ROC cu următoarea direcție: controale < cazurile de AVC au prezentat o performanță modestă, dar VPN mari.

În continuare am evaluat parametrii care ar putea fi asociați în mod semnificativ cu existusul pacienților în decurs de 12 luni după episodul acut de AVC.

Analiza univariabilă fiecărui parametru a evidențiat că hipertensiunea arterială de gradul III, NIHSS crescut la momentul prezentării și nivelurile de adiponectină T₁ de peste 13.92 ng/ml sunt asociate semnificativ cu decesul pacientului, cu valori $p=0,031$ și $p=0,001$ respectiv, $p=0,049$ (Tabelul 27).

În modelul multivariabil, hipertensiunea arterială și NIHSS și-au menținut semnificația ca factori de risc independenți ($p=0,039$ și $p=0,005$), în timp ce nivelurile de adiponectină au atins o valoare statistică limită ($p=0,060$).

Tab. 27. Analiza univariabilă și multivariabilă a parametrilor care influențează decesul pacienților cu AVC în decurs de 12 luni de la episodul acut.

Variable		Univariable Analysis		Multivariable Analysis	
		OR (95%CI)	p-value	OR (95%CI)	p-value
Sex	ref = female	0.86(0.24;3.2)	0.809		
Vârstă		1.05(0.99;1.12)	0.149		
Obezitate	ref = normal weight	0.57(0.03;3.59)	0.611		
Tabagism cronic	ref = non-smoker	0.49(0.03;3.06)	0.525		
Etilism cronic	ref = no use	1.25(0.17;5.98)	0.796		
Fibrilație atrială	ref = absent	2.66(0.75;10.03)	0.131		
Diabet zaharat	ref = absent	2.14(0.5;8.19)	0.277		
HTA	ref = grade I + II	10.27(1.24;84.76)	0.031	19.91(1.16;342.6)	0.039
Tip AVC	ref = cardioembolic	0.38(0.1;1.32)	0.131		
NIHSS la prezentare		1.23(1.09;1.39)	0.001	1.28(1.08;1.53)	0.005
Adiponectin T1	ref ≤ 13.92 ng/mL	8.33(1.47;157.37)	0.049	14.08(0.90;221.74)	0.060

OR: odds ratio; CI: confidence interval.

Discuții

Atât în domeniul medical în general cât și în cazul de față al rutinei clinice din România, bolile cerebrovasculare în stadiul acut necesită de urgență identificarea unui număr de biomarkeri cu specificitate și sensibilitate înalte pentru diagnosticul de accident vascular cerebral, cu un raport cost-beneficiu important, în special la nivel de prespital pentru o intervenție cât mai promptă.

Trombomodulina(TM) a reprezentat un interes pentru cercetare, prin complexitatea rolurilor pe care aceasta le evidențiază în situații fiziologice sau patologice. Astfel, nivelul seric crescut al TM s-ar corela cu diversele antecedente personale patologice de tip: cardiovascular, coagulare intravasculară diseminată, accident vascular cerebral ischemic, insuficiența multiplă de organe din diverse patologii sau chiar cu riscul de deces.

Valorile considerate normale la persoanele fără un AVC sunt considerate sub 10 ng/ml, iar valorile peste această limită au fost asociate cu diverse patologii.

Dohi și colaboratorii a ajuns la concluzia că există o relație între nivelul seric de trombomodulină și riscul de boală aterosclerotică. Alte studii au obiectivat că nivelul trombomodulinei serice a fost semnificativ crescut la pacienții cu leziuni vasculare aterosclerotice

comparativ cu lotul martor, nivelul seric fiind direct proporțional cu generalizarea procesului aterosclerotic la nivelul întregului organism boala aterosclerotică fiind cunoscută ca un puternic factor de risc cardiovascular și implicit de AVC.

Studiile recente au demonstrat prin modele experimentale, că administrarea trombomodulinei ca formă de tratament în situația unui AVC ischemic acut ar putea să reducă dimensiunea infarctului ca urmare a repermeabilizării vasului de sânge.

Rezultatul studiului de cercetare doctorală este în concordanță cu literatura de specialitate, adică nivelul trombomodulinei s-a corelat cu dislipidemia la pacienții cu AVC, dar nu au existat diferențe între nivelul de trombomodulina și tipurile de AVC conform clasificării TOAST.

Totuși, există discrepanțe între rolul posibil protectiv al trombomodulinei, deoarece un studiu realizat de Olivot și colab. a observat că trebuie să se realizeze o interpretare a valorilor trombomodulinei serice în funcție de antecedentele personale patologice ale pacientului cu privire la boala cerebrovasculară. Astfel, valorile serice crescute au posibil rol protectiv la pacienții fără istoric de AVC, dar crește riscul de deces la pacienții cu istoric pozitiv. Analiza lotului de pacienți cu accident vascular cerebral nu a evidențiat o asociere între nivelul de trombomodulină și decesul acestor pacienți, o posibilă explicație fiind aceea că doar 8 pacienți au decedat pe perioada spitalizării în cadrul clinicii. Din lotul studiat, am avut un singur pacient cu istoric pozitiv de AVC ischemic, care a confirmat posibilul rol neuroprotectiv al trombomodulinei.

În cadrul studiului de cercetare doctorală am măsurat nivelul trombomodulinei la momentul prezentării și la 48 ore, iar la monitorizarea pe termen scurt am observat o corelație inversă între severitatea episodului ischemic acut și nivelurile trombomodulinei serice. Ca observație, valoarea crescută a trombomodulinei la momentul acut ar putea să contribuie la limitarea progresiei accidentului vascular și în același timp să ofere un potențial efect protectiv pe termen mediu și lung.

În cercetarea doctorală, am investigat utilitatea trombomodulinei serice ca marker diagnostic și am evidențiat că valori care depășesc 8.69 ng/ml s-au asociat cu prezența AVC ischemic acut.

Ținând cont că există interrelații ale trombomodulinei cu diverse patologii, am utilizat propensity score pentru a minimiza influența datorată anumitor comorbidități cu obținerea unui AUC de 1. Astfel, trombomodulina a reprezentat un important ajutor pentru identificarea

pacienților cu AVC în condițiile unei tomografii computerizate cerebrale native de aspect normal (scor ASPECTS 10 puncte) la momentul prezentării.

Caspazele, și în special caspaza-3, sunt bine cunoscute pe de o parte ca inițiatori ai morții celulare, iar pe de altă parte ca executanți direcți ai acestui proces.

Montaner și colab.(2011) au realizat un studiu pe baza unui panel de biomarkeri printre care și caspaza-3, concluzionând că valorile crescute ale caspazei-3 au reprezentat cel mai bun indicator de diagnostic al pacienților cu AVC comparativ cu ceilalți biomarkeri.

Rossel și colaboratorii, într-un studiu a concluzionat că a existat o diferență semnificativă între pacienții cu AVC ischemic acut și cei din lotul martor. Mai mult decât atât, creșterea nivelului seric al caspazei-3 a fost în relație direct proporțională cu volumul accidentului vascular pe baza imagisticii prin rezonanță magnetică.

Lynch și colab. au efectuat un studiu prin care a urmărit nivelul seric al caspazei-3 la pacienții cu semne și simptome sugestive de AVC ischemic în stadiu acut la 3 ore de la debut.

În studiul de cercetare doctorală nivelurile serice au fost mult crescute în primele 24 ore de la debutul ischemiei cerebrale comparativ cu lotul de control; aceste valori s-au menținut constant crescute și la 48 ore, adică la momentul T₂. Deci caspaza-3 poate ajuta la diagnosticul diferențial între un AVC ischemic și o patologie, noncerebrovasculară care mimează un AVC în primele 24 ore de la debut, în situația în care pacienții se vor prezenta în acest interval relativ scurt de timp, ținând cont de faptul că imaginea constituită pe tomografia computerizată nativă cerebrală se evidențiază de cele mai multe ori între 24-72 ore.

În ceea ce privește dinamica nivelurilor serice ale caspazei-3, conform studiului lui Asahi și colab., s-a observat o creștere a nivelurilor de ARNm și de caspază-3 la modelele de ischemie cerebrală focală la șoareci după o oră de la debut. Mai mult decât atât, Namura și colaboratorii au evidențiat pe modele experimentale de AVC ischemic acut la șoareci niveluri crescute ale caspazei-3 și fragmentelor sale, atingând valori maxime, la două ore de la reperfuzia unei artere sylviene în ocluzie. Pe lângă aceasta, Qi și colab. au arătat că nivelurile serice ale caspazei-3 au prezentat o creștere lentă pe parcursul primelor 8 ore de la debutul ischemiei, urmate de o creștere extrem de abruptă până la 24 ore; după 72 ore de la momentul debutului ischemiei cerebrale focale ulterior s-a evidențiat o scădere lentă.

Prin studiul de cercetare doctorală am măsurat nivelurile serice ale caspazei-3 în două momente și am observat că nivelurile acestea au fost crescute la pacienții cu accident vascular

cerebral în primele 24 ore de la debutul semnelor și simptomelor specifice ischemiei cerebrale, valori menținute crescute și la 48 de ore, comparativ cu lotul martor la care valorile serice s-au menținut normale.

În ceea ce privește clinica pacienților cu accident vascular cerebral ischemic, Gafurodegullan și colab. au concluzionat că nu există diferențe semnificative din punct de vedere statistic între nivelurile serice ale caspazei-3 și sexul pacienților, gradul de severitate al AVC măsurat pe scala NIHSS sau volumul infarctului măsurat pe CT/IRM. Studiul a fost efectuat pe un lot de 100 pacienți cu AVC și antecedente personale patologice similare cu cele din studiul doctoral (etilism cronic, tabagism cronic, DZ, sindrom coronarian sau HTA). În final aceștia au concluzionat că între nivelurile caspazei-3 nu au existat diferențe semnificative statistic între lotul de studiu comparativ cu lotul martor; mai mult decât atât nivelurile nu s-au corelat semnificativ statistic cu momentul debutului ischemiei sau cu durata acesteia și nu au ajutat la selectarea cât mai precoce a pacienților care au putut beneficia de terapie de revascularizație cerebrală prin trombectomie sau tromboliză intravenoasă cu alteplază.

Linfante și colaboratorii au remarcat că nu există diferențe semnificative statistic între scorul de severitate al AVC măsurat pe scala NIHSS și volumul infarctului cerebral, dar aceștia au cercetat doar nivelurile serice ale caspazei-3 la pacienții cu ischemie cerebrală în teritoriul vertebrobazilar.

Diferențele observate în studiile anterioare ar putea să apară datorită momentului în care s-a măsurat caspaza-3, adică perioada de la debutul simptomatologiei până la momentul recoltei.

În studiul doctoral nivelurile serice ale caspazei-3 au fost semnificativ statistic mai mari față de lotul martor, lucru foarte important pentru managementul unui astfel de pacient atunci când imagistica prin tomografie nu prezintă leziuni ischemice cu caracter acut. Această observație are un impact semnificativ, deoarece markerii serici pentru diagnosticul unui accident vascular cerebral în această situație ar putea să aibă o relevanță clinică importantă.

O observație de real interes a reprezentat-o nivelurile serice mai scăzute ale caspazei-3 evidențiate la pacienții cu AVC care au decedat precoce pe perioada spitalizării; cu toate acestea ipoteza ar trebui să fie interpretată cu prudență.

Într-un model experimental de ischemie cerebrală la șobolani la care s-a realizat ocluzia arterei cerebrale medii, nivelul seric al caspazei-3 s-a menținut mai scăzut chiar și după ce au trecut

24 de ore. Pe de altă parte, reperfuzia ulterioară a fost asociată cu o creștere extrem de abruptă a nivelului caspazei.

Ținând cont de această observație, se poate emite ipoteza că acei pacienți care au decedat perioada spitalizării au prezentat, probabil, ocluzia arterei cerebrale medii, ceea ce a determinat un prognostic relativ rapid nefavorabil; astfel, nivelul seric fiind scăzut nu s-a mai repermeabilizat vasului arterial respectiv.

Cu privire la adiponectină, aceasta a fost marcată de cercetări importante în funcție de presupusul rol pe care îl are în diverse afecțiuni precum dislipidemia, HTA, obezitatea, DZ și alte disfuncții metabolice. Nivelurile serice ale adiponectinei au avut modificări în sens pozitiv sau negativ în prezența afecțiunilor neurologice, inclusiv cele cerebrovasculare. Receptorii adiponectinei sunt bogat exprimați în diverse structuri ale sistemului nervos central unde exercită multiple efecte neuroprotective. La acest nivel, adiponectina prezintă un rol important în neurogeneză și refacerea membranei sinaptice, conform studiilor realizate pe șoarecii de laborator.

Adiponectina influențează în mod negativ legarea și absorbția lipoproteinelor cu densitate joasă la nivelul celulelor spumoase, acest proces fiind extrem de important în inițierea și progresia aterosclerozei, influențând în mod negativ patogenia bolilor cerebrovasculare (accident vascular cerebral ischemic și hemoragic) și a sindroamelor coronariene acute.

Cu toate că adiponectina este o citokină cu rol important în afecțiunile cardiovasculare, semnificația clinică în privința accidentului vascular cerebral este controversată; datele din literatura de specialitate cu privire la valorile serice sunt destul de puține și nu sunt încă pe deplin integrate în privința riscului, fiziopatologiei și a prognosticului acestuia.

Studiul efectuat de Wang și colaboratorii a concluzionat că valorile adiponectinei erau mai mari la pacienții care au prezentat un accident vascular cerebral acut în comparație cu lotul de control ($p < 0.001$).

În studiul de cercetare doctorală am observat că pacienții cu accident vascular cerebral ischemic au prezentat valori semnificativ mai mari față de cei din lotul martor ($p < 0.001$).

Cu toate acestea, alte studii au demonstrat că nu există diferențe semnificative statistic între pacienții cu accident vascular cerebral și lotul de control.

La pacienții de cercetare doctorală nivelurile adiponectinei au fost în concordanță cu cele din literatura de specialitate, dar nu a fost atins pragul de semnificație statistică (probabil datorită lotului mai mic de pacienți înrolați în studiu). Această observație arată că valoarea serică a

adiponectinei poate să reprezinte un instrument de diagnostic al pacienților cu AVC ischemic în stadiu acut, la cazurile la care CT cerebral nativ nu a prezentat imagini hipodense de aspect ischemic acut, oferind astfel posibilitatea inițierii unui tratament cât mai rapid cu o posibilă rată de recanalizare arterială mai bună.

Un alt studiu a concluzionat că nivelul seric crescut al adiponectinei a fost asociat cu decesul pacienților ce au prezentat ateroscleroză carotidiană (confirmată imagistic), ulterior supuși endarterectomiei carotidiene, dar fără asocieri cu viitoarele evenimente cardiovasculare ischemice.

Rezultatele studiului de cercetare doctorală sunt în concordanță cu aceste observații, dar prezintă semnificație statistică la limită (număr mic de cazuri, respectiv 12 pacienți), datorită faptului că pacienții cu AVC ischemic care au decedat în decursul celor 12 luni de monitorizare au avut niveluri ale adiponectinei serice mai mari. Mai mult decât atât, prin analiza multivariabilă care viza identificarea unor predictori independenți pentru decesul acestor pacienți, doar hipertensiunea arterială și scorul de severitate măsurat pe scala NIHSS la internare au rămas semnificative din punct de vedere statistic.

Totuși, fiind un număr mic de decese, este necesar să se efectueze investigații suplimentare pentru a confirma sau infirma aceste rezultate.

În ceea ce privește analiza severității AVC ischemic, nivelurile serice crescute ale adiponectinei recoltate în primele 24 ore de la debutul semnelor și simptomelor ischemiei cerebrale au fost asociate cu un scor NIHSS > 16 puncte, adică un AVC moderat-sever. Deși semnificative statistic, aceste rezultate necesită a fi interpretate cu prudență, dat fiind numărul extrem de redus (6 pacienți). În plus am observat că semnificația statistică s-a pierdut la momentul T₂, deoarece nu am putut urmări toți parametri, dată fiind reducerea numărului lor prin deces.

Valoarea serică crescută a adiponectinei ar putea fi utilizată ca instrument de prognostic, pentru predicția unor leziuni ischemice de lungă durată, ceea ce ar necesita loturi mai mari de pacienți.

Pera și colaboratorii au concluzionat că la pacienții cu AVC ischemic, nivelurile serice ale adiponectinei au prezentat o scădere în faza acută. Aceste valori serice s-au corelat cu rezultatele obținute de către Yatomi și colaboratorii pe un model experimental de accident vascular cerebral folosind animale de laborator.

Sasaki et al au evidențiat că există o reducere tranzitorie a nivelurilor adiponectinei serice în prima zi de internare pentru un episod acut de ischemie cerebrală focală comparativ cu a 14-a

zi de internare. În cazul lotului studiat, scăderea nivelului seric de adiponectină între cele 2 determinări a fost nesemnificativă.

Studiul efectuat de Park și colaboratorii a evidențiat că nivelurile serice de sRAGE au fost mai scăzute la persoanele fără accident vascular cerebral comparativ cu lotul de studiu ($p < 0.01$). În cadrul cercetării doctorale valorile serice de sRAGE au fost mult crescute la pacienții din lotul cu accidentul vascular cerebral ischemic față de pacienții din lotul de control.

Tang et al au observat că nivelurile de sRAGE s-au corelat cu severitatea accidentului vascular cerebral măsurat pe scala NIHSS. Nivelurile serice ale sRAGE au fost mai crescute la pacienții cu accident vascular cerebral comparativ cu cei din lotul martor.

Niveluri mai scăzute de sRAGE au fost prezente la pacienții cu tabagism cronic, scor de severitate al accidentului vascular cerebral mai mare la momentul prezentării și funcția renală normală ($p = 0.05$). La pacienții cu fibrilație atrială a existat o corelație importantă din punct de vedere statistic ($p = 0.007$). În același timp sRAGE era în relație cu leucoaraoza severă, ca semn al hipertensiunii arteriale vechi.

În studiul doctoral nu a fost evidențiată nicio semnificație statistică al valorii sRAGE în corelație cu scorul de severitate al AVC măsurat pe scala NIHSS sau cu fibrilația atrială.

Cercetarea lui Zhong și colaboratorii a observat că există o relație semnificativ statistică între severitatea accidentului vascular cerebral măsurat prin scorul NIHSS și nivelul seric al matrix metaloproteinazei-9 ($p < 0.001$), dar și o corelație cu subtipul cardioembolic de AVC ($p < 0.001$). Nivelurile serice crescute ale MMP-9 au fost asociate cu dizabilitate neurologică majoră post episod ischemic acut și risc de deces pe termen scurt și mediu.

Metaanaliza realizată de către Ramos-Fernandez a evidențiat că nivelurile serice de MMP-9 au fost crescute după un accident vascular cerebral, existând o corelație cu volumul AVC; totodată valoarea serică crescută a MMP-9 ar putea deveni factor predictiv al transformării hemoragice în cazul revascularizării intravenoase cu alteplază.

Hasirci și colaboratorii au remarcat că nu există nicio corelație între valorile chemerinei și scorul de severitate al AVC măsurat pe scala NIHSS, valorile serice la pacienții cu AVC fiind mai mari comparativ cu pacienții din lotul martor; $p = 0.001$.

Limitările cercetării doctorale sunt reprezentate de: numărul mic de pacienți înrolați, studiu monocentric, perioada de urmărire posibil redusă (12 luni de la evenimentul acut). Eșantionul mic de pacienți a limitat realizarea de subgrupuri populaționale. Sunt necesare studii efectuate pe

cohorte mari de pacienți, cu populații diverse, pentru a putea observa dacă există diferențe semnificative statistic din punct de vedere al etniei, mediului de proveniență sau al stilului de viață.

Cu privire la biomarkeri, aceștia au fost măsurați doar la momentul acut, respectiv la prezentare și la 48 de ore, acest lucru putând să nu ofere o imagine a variațiilor pe termen scurt, mediu și lung. Totuși, validarea unor biomarkeri măsurați cu ajutorul tehnicii ELISA ar fi sub semnul întrebării după Blüher și colaboratorii, care au observat diferențe ale valorilor între diferitele kituri disponibile pe piață.

Concluzii

Nivelurile serice ale tuturor biomarkerilor analizați au prezentat o sensibilitate și specificitate crescută în diagnosticul accidentului vascular cerebral ischemic acut, în condițiile în care tomografia computerizată cerebrală nativă efectuată la momentul prezentării în serviciul de urgență nu a relevat modificări hipodense cu caracter ischemic acut.

Trombomodulina poate fi considerată un biomarker de diagnostic la momentul debutului unui accident vascular cerebral ischemic, chiar în situația în care manifestările clinice sunt minime, adică prezența unui scor NIHSS scăzut. Astfel, valoarea trombomodulinei poate ajuta la inițierea terapiei de revascularizare, împreună cu scorul ASPECTS, după evaluarea contraindicațiilor absolute și relative.

Valorile serice ale trombomodulinei au prezentat creșteri la pacienții cu accident vascular cerebral ischemic în primele 24 ore de la debutul simptomatologiei specifice.

Mai mult decât atât, nivelurile s-au corelat cu severitatea episodului, dar și cu riscul de deces, fiind în relație directă cu factorii de risc cardiovasculari cunoscuți.

Pacienții care au beneficiat de revascularizare farmacologică cu alteplază nu au prezentat modificări semnificative ale nivelurilor de trombomodulină la prezentare sau la 48 de ore, fapt ce a demonstrat că tromboliza nu a influențat valorile trombomodulinei.

Se deschid noi perspective pentru de cercetare în vederea completării rolului ca biomarker de diagnostic și de prognostic.

Nivelurile serice ale caspazei-3 nu au avut semnificație statistică în privința severității sau prognosticului accidentului vascular cerebral luând în considerare cele trei subgrupuri de severitate pe baza scalei NIHSS. Cu toate acestea, la pacienții cu un scor NIHSS moderat-sever, nivelurile

serice scăzute ale caspazei-3 ar putea sugera prezența ocluziei unei artere cerebrale de calibru major, cu risc mare de deces în perioada imediat următoare.

Nivelurile serice ale adiponectinei s-au menținut crescute atât la momentul T_1 , cât și la momentul T_2 , la pacienții cu AVC ischemic, în absența imaginii constituite pe tomografia computerizată cerebrală nativă, indiferent de scorul de severitate pe scala NIHSS sau de revascularizarea intravenoasă cu alteplază.

Adiponectina a prezentat o mare acuratețe ca biomarker de diagnostic al AVC, avînd și un posibil rol prognostic pe parcursul celor 12 luni de monitorizare.

Nivelurile serice ale sRAGE au prezentat o corelație puternică cu dislipidemia, aceasta menținându-se crescută atât la momentul T_1 ($p=0.004$), cât și la T_2 ($p=0.002$).

Nivelurile chemerinei serice s-au corelat cu severitatea accidentului vascular cerebral ischemic măsurat pe scala NIHSS și cu prezența tabagismului cronic.

Contribuții personale și perspective ale cercetării

Prin această teză de doctorat vin cu propunerea utilizării a unui panel de biomarkeri alcătuit trombomodulină, adiponectină și caspaza-3 la toți pacienții cu suspiciune de accident vascular cerebral ischemic acut pentru a confirma diagnosticul cât mai rapid și precis; acești trei biomarkeri au prezentat cea mai bună corelație cu tabloul clinico-imagistic. (Fig. 75)

Panelul propus ar putea fi inclus într-un test de sânge simplu de efectuat, accesibil în majoritatea spitalelor, ceea ce ar reduce timpul de inițiere a tratamentului specific cu scăderea mortalității prin afecțiuni cerebrovasculare.

De asemenea supraviețuitori pot beneficia de scăderea riscului de dizabilitate fizică și/sau mentală cu posibilitatea cu creșterea calității vieții prin reinsertie familială, socială și/sau profesională.

Implementarea utilizării în practica medicală a biomarkerilor va duce la dezvoltarea unor kituri de diagnostic mai ample bazate pe biomarkeri validați prin studii multicentrice naționale și internaționale tip cohortă.

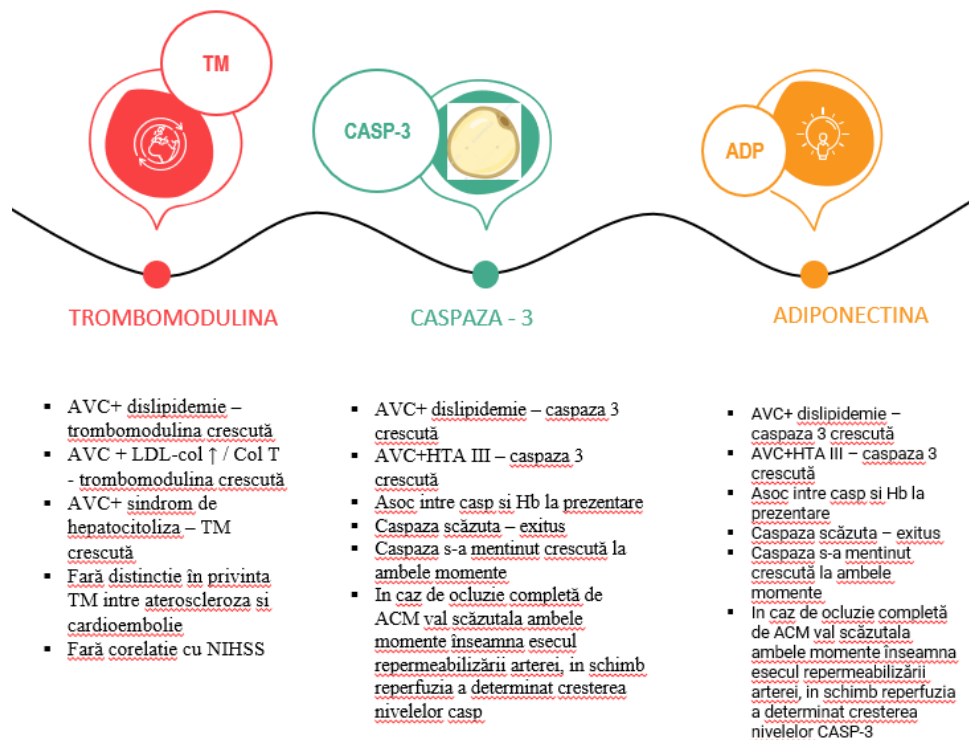


Fig. 69 Panelul propus și recomandările de interpretare

Punctele tari ale cercetării doctorale au fost reprezentate de omogenitatea lotului de pacienți înrolați în studiu, investigațiile și tratamentul fiind sub supravegherea unei singure echipe medicale multidisciplinară (neurolog, radiolog, medic de medicină de urgență, anestezist, cardiolog, medic de medicină de laborator), astfel nu au existat diferențe semnificative în privința managementului acestor pacienți. Măsurarea biomarkerilor la momentul prezentării și la 48 ore au evidențiat fiabilitatea testelor.

Alte direcții de cercetare privind identificarea biomarkerilor asociați cu inflamația și neurodegenerarea poate conduce la o mai bună înțelegere a patogeniei accidentului vascular cerebral ischemic. Biomarkeri asociați căilor fiziopatologice specifice ar putea deveni ținte pentru noi terapii inovatoare.

Nivelurile crescute ale trombomodulinei în stadiul acut necesită cercetări mai amănunțite și o urmărire pe termen mai lung al pacienților pentru posibilul efect protector.

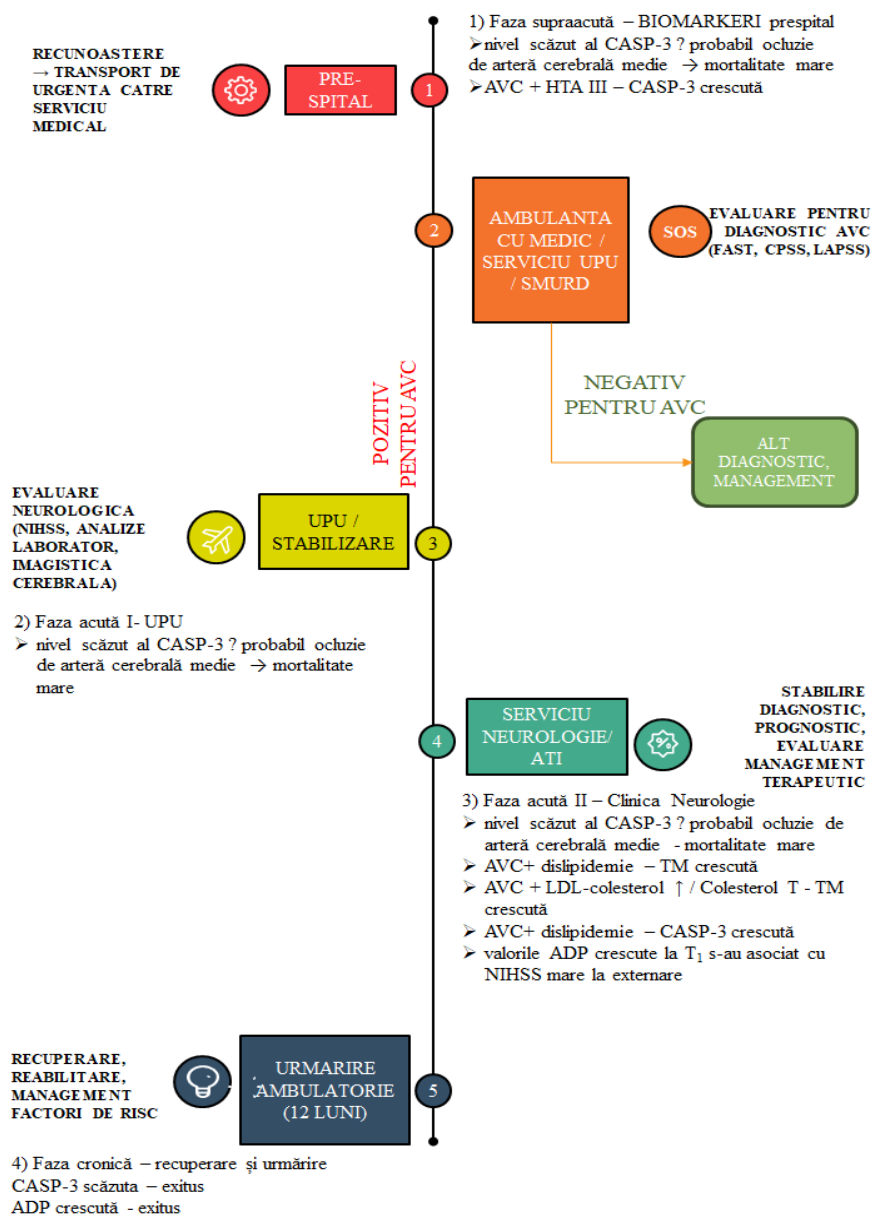
În privința caspazei-3 sunt necesare studii mai ample și pe un lot mai mare de pacienți cu o perioadă mai lungă de monitorizare pentru a putea înțelege mai bine semnificația acestora ca potențial biomarker de prognostic la pacienții cu AVC ischemic acut.

Posibilele implicații ale caspazei-3 în fiziopatogenia morții neuronale determină definirea ei ca țintă terapeutică, ambele conducând la noi direcții de cercetare ulterioare. Este important să se observe dacă blocarea caspazei-3 ar putea să prevină moartea neuronală și să îmbunătățească recuperarea pacienților, având în vedere că există concluzii contradictorii cu privire la rolul acesteia, conform datelor din literatura de specialitate.

Biomarkerii descoperiți ar putea fi utilizați în programe de screening pentru identificarea persoanelor cu risc crescut de AVC ischemic. De exemplu, un test de sânge pentru biomarkeri specifici ar putea fi inclus în examenele medicale de rutină pentru persoanele cu factori de risc cunoscuți, precum HTA sau DZ.

Astfel propun integrarea biomarkerilor într-un algoritm referitor la managementul pacienților cu accident vascular cerebral ischemic în stadiul acut. (Fig. 76)

Algoritmul recomandat pentru managementul optimal al AVC ischemic acut



Viitoarele cercetări în domeniul biomarkerilor se vor putea axa evaluarea eficacității tratamentelor personalizate. Aceste studii vor putea testa diverse adaptate la profilurile biomarkerilor pacienților. Studiile clinice ulterioare vor contribui la rapiditatea progresului în domeniul neurologiei cu implicații asupra calității atât a actului medical cât și a vieții pacientului neurologic.

Listă cu publicații

Lucrările științifice publicate ca rezultat al cercetării doctorale în reviste indexate ISI Web of Science/ PubMed

1. **Zaharia, A.-L.**; Tutunaru, D.; Oprea, V.D.; Tanase, C.E.; Croitoru, A.; Stan, B.; Voinescu, D.C.; Ionescu, A.-M.; Coadă, C.A.; Lungu, M. *Thrombomodulin Serum Levels—A Predictable Biomarker for the Acute Onset of Ischemic Stroke*. Curr. Issues Mol. Biol. 2024, 46, 677–688. <https://doi.org/10.3390/cimb46010044>, IF - 3.1, Indexat ISI Web of Science (Q3 - BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY, in SCIE edition), PubMed, PMC, Scopus, DOAJ, EBSCO, Google Scholar. Autor principal (prim autor)
2. **Zaharia, A.-L.**; Oprea, V.D.; Coadă, C.A.; Tutunaru, D.; Romila, A.; Stan, B.; Croitoru, A.; Ionescu, A.-M.; Lungu, M. *Serum Caspase-3 Levels as a Predictive Molecular Biomarker for Acute Ischemic Stroke*. Int. J. Mol. Sci. 2024, 25, 6772. <https://doi.org/10.3390/ijms25126772>, IF – 5.6, Indexat ISI Web of Science (Q1 - Biochemistry & Molecular Biology, Q2 - Chemistry, Multidisciplinary - in SCIE edition), Scopus, PubMed, PMC, MEDLINE, Embase, CAPus / SciFinder. Autor principal (prim autor)
3. **Zaharia, A.-L.**; Oprea, V.D.; Coadă, C.A.; Tănase, C.E.; Ionescu, A.-M.; Chirila, S.I.; Mihailov, R.; Tutunaru, D.; Lungu, M. *Serum Adiponectin Levels Increase in Acute Ischemic Stroke and Correlate with Patients' Outcomes: A Pilot Study*. Biomedicines 2024, 12, 1828. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12081828>, IF – 3.9, Indexat ISI Web of Science (Q1 - Pharmacology and Pharmacy, Q2 - Medicine, Research and Experimental, Q2 - Biochemistry and Molecular Biology), Scopus, SCIE, PubMed, PMC, CAPus / SciFinder. Autor principal (prim autor)
4. Mihaela Lungu, Violeta Diana Oprea, **Andrei-Lucian Zaharia**, Bianca Stan, Laura Rebegea, Dan Iulian Mocanu, Eva Maria Elkan, Elena Niculet, Ana Croitoru. *Stroke-Associating Acute Limb Ischemia Due to the Rupture of a Hydatid Cyst*, Curr. Issue Mol. Biol. 2023, 45, 2597-2608, IF- 2.9, WOS: 000956580100001, PubMed ID: 36975540, ISSN: 1467-3037, eISSN: 1467-3045, IDS number: A6ZJ2, Journal Citation Indicator: 0.29 (2021), Q3, <https://doi.org/10.3390/cimb45030170> , Indexat ISI Web of Science (Q3 - BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY, in SCIE edition), PubMed, PMC, Scopus, DOAJ, EBSCO, Google Scholar; Co-autor

Lucrări publicate în volume de rezumate indexate ISI ale unor conferințe științifice

1. **A.L. Zaharia**, A. Croitoru, A.M. Paduraru, C. Marinescu, D.C. Voinescu, M. Chetrone, M. Lungu. *Controversies regarding the differential diagnosis between hemorrhagic stroke due to ruptured arteriovenous malformation and a brain tumor in a patient with onset of coma*. Restorative Neurology and Neuroscience, vol.41, no. 1-2, pp.81-82, 2023. DOI:10.3233/RNN-239002, ISSN print 0922-6028, ISSN on-line 1878-3627. Books of abstracts The 17-th World Congress on Controversies in Neurology CONY 2023, March 23-25, 2023 Dubrovnik, Croatia.

Lucrări prezentate la conferințe indexate BDI

1. Violeta Diana Oprea, Sorina Nicoleta Munteanu, **Andrei-Lucian Zaharia**, Mihaela Lungu, Aurelia Romila. *Accidentul vascular cerebral la pacienții cu boala Alzheimer: o mare provocare? Stroke in patients with Alzheimer Disease: a greater challenge*, Volum de rezumate științifice, Vol. XIII, 2023, Ed. XIII, ISSN 2783-9486 ISSN-L 2783-9846, Conferința Națională Alzheimer 2023, cu participare internațională – Volum de Rezumate Științifice Vol. XIII, 2023, Ed. XIII; Pag. 33; ISSN 2783-9486 ISSN-L 2783-9486 <https://az659834.vo.msecnd.net/eventsairwesteuprod/production-ralcom-public/863b2278b0514f498e919c0cc5b502a9>

Lucrări prezentate la conferințe neindexate

1. Mihaela Lungu, **Andrei-Lucian Zaharia**, Bianca Stan, Ana Croitoru, Diana Violeta Oprea. *Thrombolysis in stroke in young patient with multiple comorbidities. Tromboliza în accidentul vascular cerebral la pacientul tânăr cu multiple comorbidități*. Cardiogal 2023, Conferința de Cardiologie „Dunarea de Jos”. Provocări și interdisciplinaritate. Galați, 5-7 oct. 2023

2. Mihaela Lungu, Violeta Sapira, **Andrei-Lucian Zaharia**, Ana Croitoru. *Ischemic aphasia in the polyglot patient. Afazia de cauză ischemică la bolnavul poliglot*. E-poster. Al XX-lea Congres al Societății de Neurologie din România- virtual, București, 14-18 noiembrie 2022.

Bibliografie selectivă

1. Hort I, Karenberg A. Medieval Descriptions and Doctrines of Stroke: Preliminary Analysis of Select Sources. Part I: The Struggle for Terms and Theories - Late Antiquity and Early Middle Ages (300-800) n.d.; 7:162–73. <https://doi.org/10.1076/jhin.7.3.162.1849>.

2. Virchow R. Ueber die akute Entzündung der Arterien n.d.; 1:272–378. <https://doi.org/10.1007/BF01975873>.

3. A G. Alternating hemiplegia, a sign of pontine lesion, and documentation of the proof of the facial decussation. In: JK Wolf, trans. (1971). The Classical Brainstem Syndromes. Charles C Thomas, Springfield, IL, pp. 9–24. n.d.: 749–54, 811–6, 789–792.

4. Califf, R.M. Biomarker Definitions and Their Applications. *Exp Biol Med (Maywood)* **2018**, *243*, 213–221, doi:10.1177/1535370217750088.

5. Ahmad, A.; Imran, M.; Ahsan, H. Biomarkers as Biomedical Bioindicators: Approaches and Techniques for the Detection, Analysis, and Validation of Novel Biomarkers of Diseases. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 1630, doi:10.3390/pharmaceutics15061630.

6. Watanabe-Kusunoki, K.; Nakazawa, D.; Ishizu, A.; Atsumi, T. Thrombomodulin as a Physiological Modulator of Intravascular Injury. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, doi:10.3389/fimmu.2020.575890.
7. Chang, J.C. Acute Respiratory Distress Syndrome as an Organ Phenotype of Vascular Microthrombotic Disease: Based on Hemostatic Theory and Endothelial Molecular Pathogenesis. *Clin Appl Thromb Hemost* **2019**, *25*, 1076029619887437, doi:10.1177/1076029619887437.
8. Foley, J.H.; Conway, E.M. Cross Talk Pathways Between Coagulation and Inflammation. *Circulation Research* **2016**, *118*, 1392–1408, doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.306853.
9. Loghmani, H.; Conway, E.M. Exploring Traditional and Nontraditional Roles for Thrombomodulin. *Blood* **2018**, *132*, 148–158, doi:10.1182/blood-2017-12-768994.
10. Thornberry, N.A.; Lazebnik, Y. Caspases: Enemies Within. *Science* **1998**, *281*, 1312–1316, doi:10.1126/science.281.5381.1312.
11. Salvesen, G.S.; Ashkenazi, A. Snapshot: Caspases. *Cell* **2011**, *147*, 476–476.e1, doi:10.1016/j.cell.2011.09.030.
12. Nguyen, T.M.D. Adiponectin: Role in Physiology and Pathophysiology. *Int J Prev Med* **2020**, *11*, 136, doi:10.4103/ijpvm.IJPVM_193_20.
13. Schöndorf, T.; Maiworm, A.; Emmison, N.; Forst, T.; Pfützner, A. Biological Background and Role of Adiponectin as Marker for Insulin Resistance and Cardiovascular Risk. *Clin Lab* **2005**, *51*, 489–494.
14. Achari, A.E.; Jain, S.K. Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences* **2017**, *18*, 1321, doi:10.3390/ijms18061321.
15. Tan, L.; Lu, X.; Danser, A.H.J.; Verdonk, K. The Role of Chemerin in Metabolic and Cardiovascular Disease: A Literature Review of Its Physiology and Pathology from a Nutritional Perspective. *Nutrients* **2023**, *15*, 2878, doi:10.3390/nu15132878.
16. Ferland, D.J.; Mullick, A.E.; Watts, S.W. Chemerin as a Driver of Hypertension: A Consideration. *American Journal of Hypertension* **2020**, *33*, 975–986, doi:10.1093/ajh/hpaa084.
17. Silveira Rossi, J.L.; Barbalho, S.M.; Reverete de Araujo, R.; Bechara, M.D.; Sloan, K.P.; Sloan, L.A. Metabolic Syndrome and Cardiovascular Diseases: Going beyond Traditional Risk Factors. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* **2022**, *38*, e3502, doi:10.1002/dmrr.3502.
18. Laronha, H.; Caldeira, J. Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases. *Cells* **2020**, *9*, 1076, doi:10.3390/cells9051076.
19. Fischer, T.; Senn, N.; Riedl, R. Design and Structural Evolution of Matrix Metalloproteinase Inhibitors. *Chemistry – A European Journal* **2019**, *25*, 7960–7980, doi:10.1002/chem.201805361.
19. Maskos, K. Crystal Structures of MMPs in Complex with Physiological and Pharmacological Inhibitors. *Biochimie* **2005**, *87*, 249–263, doi:10.1016/j.biochi.2004.11.019.
20. Hudson, B.I.; Lippman, M.E. Targeting RAGE Signaling in Inflammatory Disease. *Annu Rev Med* **2018**, *69*, 349–364, doi:10.1146/annurev-med-041316-085215.
21. Kierdorf, K.; Fritz, G. RAGE Regulation and Signaling in Inflammation and Beyond. *J Leukoc Biol* **2013**, *94*, 55–68, doi:10.1189/jlb.1012519.
22. Prantner, D.; Nallar, S.; Vogel, S.N. The Role of RAGE in Host Pathology and Crosstalk between RAGE and TLR4 in Innate Immune Signal Transduction Pathways. *FASEB J* **2020**, *34*, 15659–15674, doi:10.1096/fj.202002136R.

23. Anderson, L. Candidate-Based Proteomics in the Search for Biomarkers of Cardiovascular Disease. *J Physiol* **2005**, *563*, 23–60, doi:10.1113/jphysiol.2004.080473.
24. Ridker, P.M.; Brown, N.J.; Vaughan, D.E.; Harrison, D.G.; Mehta, J.L. Established and Emerging Plasma Biomarkers in the Prediction of First Atherothrombotic Events. *Circulation* **2004**, *109*, IV6-19, doi:10.1161/01.CIR.0000133444.17867.56.
25. Dohi, Y.; Ohashi, M.; Sugiyama, M.; Takase, H.; Sato, K.; Ueda, R. Circulating Thrombomodulin Levels Are Related to Latent Progression of Atherosclerosis in Hypertensive Patients. *Hypertens Res* **2003**, *26*, 479–483, doi:10.1291/hypres.26.479.
26. Bustamante, A.; López-Cancio, E.; Pich, S.; Penalba, A.; Giralt, D.; García-Berrocó, T.; Ferrer-Costa, C.; Gasull, T.; Hernández-Pérez, M.; Millán, M.; et al. Blood Biomarkers for the Early Diagnosis of Stroke: The Stroke-Chip Study. *Stroke* **2017**, *48*, 2419–2425, doi:10.1161/STROKEAHA.117.017076.
27. Linfante, I.; Llinas, R.H.; Schlaug, G.; Chaves, C.; Warach, S.; Caplan, L.R. Diffusion-Weighted Imaging and National Institutes of Health Stroke Scale in the Acute Phase of Posterior-Circulation Stroke. *Arch Neurol* **2001**, *58*, 621–628, doi:10.1001/archneur.58.4.621.
28. Jeon, J.Y.; Ha, K.H.; Han, S.J.; Kim, H.J.; Lee, K.-W.; Kim, D.J. Blood Adiponectin Levels Are Not Associated with Risk of Cardiovascular Events in Patients with Type 2 Diabetes. *Diab Vasc Dis Res* **2018**, *15*, 571–575, doi:10.1177/1479164118793349.
29. Wang, Z.; Li, B.; Wang, Y.; Maimaitili, A.; Qin, H.; Dangmurenjiafu, G.; Wang, S. The Association between Serum Adiponectin and 3-Month Outcome after Ischemic Stroke. *Cardiovasc Diabetol* **2019**, *18*, 105, doi:10.1186/s12933-019-0908-z.
30. Söderberg, S.; Stegmayr, B.; Stenlund, H.; Sjöström, L.-G.; Agren, A.; Johansson, L.; Weinehall, L.; Olsson, T. Leptin, but Not Adiponectin, Predicts Stroke in Males. *J Intern Med* **2004**, *256*, 128–136, doi:10.1111/j.1365-2796.2004.01351.x.