



REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Biomarkeri ai disfuncției astrocitare în prognosticul pacienților cu atac vascular cerebral ischemic acut

Doctorand: Timea Forró

Conducătorii științifici: Prof. Dr. Rodica Bălașa, Prof. Dr. László Csiba

Stadiul actual al cunoașterii. Accidentul vascular cerebral (AVC) ischemic reprezintă una dintre principalele cauze de mortalitate și invaliditate la nivel mondial. Tratamentul de revascularizare prin tromboliză intravenoasă sau prin trombectomie mecanică a revoluționat îngrijirea post-AVC, însă >50% dintre pacienți au un prognostic nefavorabil deși sunt tratați cu încadrarea în fereastra de timp. Tehnicile neuroimagistice moderne (CT și RMN) ne-au permis detectarea modificărilor ischemice precoce, evaluarea țesutului cerebral recuperabil, respectiv a circulației colaterale și a hemodinamicii cerebrale, însă nu oferă informații asupra proceselor biologice, care au loc în timpul ischemiei cerebrale. Veziculele extracelulare (VE) sunt nanostructuri încapsulate de un bistrat lipidic, secretate de majoritatea celulelor umane. Fiind prezenți în aproape toate fluidele corporale, aceste vezicule pot traversa liber bariera hemato-encefalică ajungând în circulația periferică, conținând markeri specifici celulelor din care provin. Ei pot transporta proteine, lipide și acizi nucleici celulelor țintă, facilitând comunicarea intercelulară atât în condițiile fiziologice, cât și în cele patologice. Toate aceste calități ai VE susțin potențialul lor de a fi biomarkeri non-invazivi diagnostici, terapeutici și prognostici în stroke. Astroците reprezintă cele mai numeroase și eterogene celule gliale ale sistemului nervos central (SNC). Fiind componente importante ale unității neurovasculare (UNV), ele interacționează și comunică cu ceilalți constituenți ale acestei unități, eliberând VE. Aceste vezicule secretate de astrocite (AVE) sunt implicate activ în neuroprotecția și neurorepararea post-AVC, însă pe lângă efectele benefice, ele pot determina și efecte nocive asupra SNC.

Obiectivul principal al tezei de doctorat a constat în explorarea răspunsului astrocitar la ischemia cerebrală la pacienți cu AVC prin purificarea AVE și prin caracterizarea cargo-ului lor în dinamică pe parcursul primei luni, focusând pe trei proteine cheie: proteina acidă fibrilară glială (GFAP), aquaporina-4 (AQP4) și factorul neurotrofic derivat din linia celulară glială (GDNF). Un alt obiectiv a fost determinarea potențialului de biomarker al acestor proteine VE în vederea aprecierii severității clinice și a prognosticului post-AVC.

Metodologie generală. Am recoltat sânge periferic în trei momente-cheie, la 24 de ore, la 7 zile, și la o lună de la debutul simptomatologiei în vederea obținerii plasmei. Pentru izolarea VE am folosit kitul de precipitare ExoQuick ULTRA®. Suspensiile VE obținute au fost vizualizate și analizate prin microscopie de scanare respectiv microscopie electronică de transmisie. În continuare, VE au fost puse în contact cu suspensia de bile magnetice cu streptavidină din kitul Basic Exo-Flow Capture și cuplate cu anticorpii biotinilați anti-tetraspanine (CD9, CD63 și CD81), pentru a putea evalua eficacitatea procesului de izolare. Expresia diferitelor proteine, inclusiv a tetraspaninelor, pe suprafața VE a fost de asemenea analizată prin citometrie în flux cu bile magnetice folosind kitul MACSPlex EV IO. Apoi, VE au fost capturate folosind bile magnetice cuplate cu anticorpii anti-GLAST, care este un marker specific astrocitelor. Aceste vezicule GLAST-pozitive au fost considerate subpopulația AVE. Suspensiile VE au fost lizate pentru a detecta și cuantifica conținutul de GFAP, AQP4 și GDNF a veziculelor prin Western blotting. La final, am investigat datele experimentale în context clinic, corelând cu diferite scale de evaluare clinică: National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS), modified Rankin Scale (mRS), Barthel Index (BI), Activities of Daily Living Scale (ADL) și Instrumental Activities of Daily Living (IADL). Astfel, am examinat potențialul de biomarker non-invaziv al proteinelor VE izolate din plasmă, în determinarea severității și a prognosticului AVC-ului.

Studiul 1 reprezintă o analiză a literaturii de specialitate a VE secretate de celulele UNV, și rolurile acestora în AVC. Am planuit prezentarea în parte a fiecărui tip de celulă care constituie această unitate. VE devin un nou



mod de interacțiune între celulele UNV datorită rolului lor în comunicarea intercelulară. În condiții ischemice se modifică expresia diferitelor microARN-uri transportate în aceste VE, sugerând aplicabilitatea lor ca posibili biomarkeri diagnostici, terapeutici și prognostici în AVC.

Studiul 2 a evaluat și a validat un protocol de izolare și caracterizare a VE tetraspanin-, și GLAST-pozitive din plasma pacienților cu AVC, care combină precipitarea și citometria în flux cu bile magnetice. Rezultatele obținute au indicat eficacitatea purificării VE: particulele izolate au prezentat dimensiuni, morfologie și markeri de suprafață tipice pentru VE. Aceste vezicule au fost pozitive pentru toate cele trei tetraspanine, CD81 relevând expresia cea mai ridicată dintre ele, ceea ce sugerează că CD81 ar putea fi cel mai potent indicator al VE secretate de celulele ischemice la 24 de ore post-AVC. Pe lângă tetraspanine, VE au exprimat CD3 și CD42a, sugerând ca anumite vezicule post-ischemice derivă din limfocite T sau trombocite, respectiv CD62P, indicând activarea endotelială și a trombocitelor. Sortarea VE GLAST-pozitive ne-a permis capturarea unor cantități egale de VE cu capacități de captare uniforme la fiecare pacient, ceea ce este esențială pentru caracterizarea ulterioară a suspensiilor AVE și analiza diferențelor în cargo-ul și dinamica lor post-AVC.

Studiul 3 a intenționat clarificarea unor aspecte referitoare la dinamica AVE secretate în condiții ischemice, detectând prezența GFAP, AQP4 și GDNF în cargo-ul veziculelor în prima lună post-AVC. Am observat creșterea expresiei ale acestor proteine AVE la pacienți în comparație cu grupul control, în special la 24 de ore după producerea AVC. De asemenea, toate trei au demonstrat fluctuații dependente de timp în intervalul evaluat sugerând că aspectele fiziopatologice induse de ischemie se pot reflecta și la periferie. Tratamentul trombolitic nu a avut impact asupra conținutului vezicular. Determinările prin tehnica Western blotting au evidențiat multiple benzi, indicând variate izoforme, prezența unor dimeri, tetrameri, diferite grade ale glicozilării sau produși de degradare ai proteinelor VE țintă. Conținutul VE s-a dovedit a fi o nouă platformă pentru evaluarea dinamică a progresului recuperării după faza acută a leziunilor cerebrale în timpul primei luni după AVC.

Studiul 4 a explorat aplicabilitatea clinică a VE și a cargo-ului acestora, evaluând potențialul proteinelor VE detectate ca biomarkeri în AVC. Toate cele trei proteine VE au corelat cu severitatea simptomatologiei, în special la 24 de ore de la debut. În privința prognosticului, VE GFAP și VE AQP4 au fost asociate cu prognosticul la 7 zile, în contrast VE GDNF atât la 7 zile, cât și la o lună. Aceste constatări evidențiază rolul VE în practica clinică ca potențiali biomarkeri prognostici în fazele acute-subacute ale bolii.

Originalitatea tezei. VE transportă semănături moleculare specifice celulelor din care provin. Această teză de doctorat propune ca noi biomarkeri non-invazivi pe AVE. Aceste vezicule permit monitorizarea directă a semnalelor SNC in vivo, facilitând colectarea de date longitudinale privind funcția astrocitelor și răspunsul lor la ischemie. Publicațiile din acest domeniu au fost concentrate în primul rând pe veziculele derivate din celule stem. Însă în ultimii ani, VE specifice fiecărui tip de celulă au atras un interes din ce în ce mai mare pentru potențialul lor de biomarkeri post-AVC – reflectând proprietăți moleculare specifice în comunicarea intercelulară. În numeroase studii au fost detectate diferite VE în timpul AVC sau a fost caracterizat conținutul veziculelor circulante, însă în foarte puține lucrări era identificat tipul celulei de origine a VE-ului din SNC. Majoritatea studiilor sunt preclinice, evaluând mai ales microARN-uri. Explorările proteinelor VE post-AVC sunt relativ rare. GFAP, AQP4 și GDNF au fost deja evaluate în diferite fluide corporale ca potențiali markeri. Cu toate acestea, niciunul dintre ei nu a fost izolat din cargo-ul VE. Studiul prezent este primul în această direcție. Expresia diferită de GFAP, AQP4 și GDNF din VE față de martori subliniază importanța profilării proteinelor VE în înțelegerea mai bună a rolului astrocitelor în patofiziologia AVC. Acest lucru sugerează, de asemenea, că modificările induse de ischemie la nivelul SNC pot fi reflectate și în circulația periferică a pacienților. Studiul VE și cargo-ului acestora oferă perspective pentru implementarea tehnicilor de biopsie lichidă. Datele obținute prin evaluarea proteinelor țintă din cargo-ul VE sunt promițătoare. Ele pot reprezenta biomarkeri potențiali ai severității bolii și a prognosticului după evenimentul ischemic. Astfel ne propunem integrarea determinării proteinelor VE în evaluarea AVC-ului pe lângă criteriile clinice, de laborator și imagistice pentru un management individualizat al pacienților cu stroke.

