

Lek. Pamela Dominika Czajka

**OKREŚLENIE ZNACZENIA ROKOWNICZEGO NOWYCH MIKRONA
ZWIĄZANYCH Z PŁYTKAMI KRWI U PACJENTÓW Z UDAREM
NIEDOKRWIENNYM MÓZGU**

**Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych w dyscyplinie nauki
medyczne**

Promotor: prof. dr hab. n. med. Dagmara Mirowska - Guzel

Promotor pomocniczy: dr n. med. Ceren Eyiletlen - Postuła

Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej

Warszawski Uniwersytet Medyczny



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2023

Słowa kluczowe:

mikroRNA, udar niedokrwienny, płytki krwi, znaczenie prognostyczne, biomarker, znaczenie diagnostyczne, patofizjologia

Key words:

microRNA, ischemic stroke, platelets, prognostic, biomarker, diagnostic, pathophysiology

Praca została zrealizowana w ramach projektu “Time 2 MUW doskonałość dydaktyczna szansą rozwoju Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.” współfinansowanego z Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój na lata 2014 – 2020, numer umowy o dofinansowanie: POWR. 03.05.00-00-Z040/18-00

Pracę tą dedykuję moim Rodzicom i Nauczycielom

Spis treści

Wykaz zastosowanych skrótów.....	5
Streszczenie w języku polskim.....	7
Streszczenie w języku angielskim.....	9
1. Wstęp.....	10
2. Udar niedokrwienny – epidemiologia, patofizjologia, postępowanie kliniczne.....	12
2.1. Epidemiologia.....	12
2.2. Patofizjologia.....	12
2.2.1. Rola układu odpornościowego w patofizjologii udaru niedokrwiennego.....	14
2.3. Diagnostyka.....	15
2.4. Leczenie.....	23
3. MikroRNA związane z pęcherzykami pozakomórkowymi w patofizjologii udaru niedokrwiennego.....	24
3.1. Badania przedkliniczne.....	24
3.1.1. Aktywność mikrogleju po niedokrwieniu i rola miRNA związanych z mikropęcherzykami.....	24
3.1.2. Pęcherzyki pozakomórkowe uwalniane przez mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego w udarze niedokrwiennym mózgu.....	28
3.1.3. Egzosomy pochodzące z tkanki nerwowej w udarze niedokrwiennym mózgu.....	29
4. Badania badania kliniczne.....	31
4.1. Egzosomy.....	31
4.2. Mikrocząsteczki i inne rodzaje EV.....	36
4.3. MikroRNA w różnicowaniu udaru niedokrwiennego i krwotocznego.....	37
5. Aktywacja płytek krwi w patofizjologii udaru niedokrwiennego.....	37
5.1. Znaczenie mikroRNA w reaktywności płytek krwi.....	40
5.2. MikroRNA jako regulatory fizjologicznej reaktywności płytek krwi.....	41
5.2.1 MikroRNA i receptory związane ze ścieżkami agregacji płytek krwi.....	41
6. Założenia, cel pracy, hipotezy badawcze.....	45
6.1. Materiał i metody.....	46
6.1.1 Pacjenci.....	46
6.1.2. Pobieranie i opracowanie próbek.....	47
6.1.3 Metody molekularne.....	47

6.1.4 Analiza statystyczna.....	48
6.2. Wyniki.....	49
6.2.1. Charakterystyka uczestników badania.....	49
6.2.2. Zmiana ekspresji krążących miRNA związanych z płytkami krwi oraz wartość diagnostyczna miR-125a-3p i -5p.....	51
6.2.3. Wysoka wyjściowa ekspresja miR-16-5p u pacjentów z udarem niedokrwiennym wiąże się z większą ciężkością udaru.....	53
6.3. Dyskusja.....	55
7. Wnioski.....	61
8. Bibliografia.....	62
9. Spis tabel.....	79
10. Spis rycin.....	80
11. Opinia komisji bioetycznej.....	81

Wykaz zastosowanych skrótów

AdipoR2 – receptor adiponektyny 2

ADP – adenozyndifosforan

ADSCs – *ang. adipose tissue stem cells*, komórki macierzyste tkanki tłuszczowej

ASA – *ang. acetylsalicylic acid*, kwas acetylosalicylowy

AUC – *ang. area under curve*, pole pod krzywą

ATF3 – aktywiający czynnik transkrypcyjny 3

BDNF - *ang. brain-derived neurotrophic factor*, czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego

BMI – *ang. body mass index*, wskaźnik masy ciała

BMSCs – *ang. bone marrow stem cells*, komórki macierzyste szpiku kostnego

CI – *ang. confidence interval*, przedział ufności

CT – *ang. computed tomography*, tomografia komputerowa

DAPT – *ang. dual antiplatelet therapy*, podwójna terapia przeciwplateletowa

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

EV – *ang. extracellular vesicles*, pęcherzyki zewnątrzkomórkowe

FOUR – *ang. Full Outline of Unresponsiveness*, skala FOUR

GCS – *ang. Glasgow Coma Scale*, skala Glasgow

HR – *ang. hazard ratio*, współczynnik ryzyka

hUMSCs – *ang. human umbilical mesenchymal stem cells*, mezenchymalne komórki macierzyste sznura pępowinowego

hUVECs – *ang. human umbilical vein endothelial cells*, komórki śródbłonka pochodzące z żyły pępkowej

IL-1 β – interleukina 1 β

IL-4 – interleukina 4

IL-6 – interleukina 6

IL-10 – interleukina 10

ITC – *lac. insufficientia trunci cerebri*, Skala Niedomogi Pnia Mózgu

IVBSS – *ang. Israeli Vertebrobasilar Stroke Scale*, Izraelska Kręgowopodstawna Skala Udaru

miRNA, miR – mikro-kwasrybonukleinowy

MRI – *ang. magnetic resonance imaging*, rezonans magnetyczny

mRNA –matrycowy kwas rybonukleinowy
mRS – zmodyfikowana skala Rankina
ncRNA – niekodujące RNA
NIHSS – *ang. National Institutes of Health Stroke Scale*, Skala Udarowa Narodowego Instytutu Zdrowia
NO-cGMP – tlenek azotu-cykliczny monoguananylofosforan
OGD/R – *ang. oxygen-glucose deprivation/re-oxygenation*, deprivacja tlenowo-glukozowa / reoksygenacja
OR – *ang. odd ratio*, ilorazszans
OUN – ośrodkowy układ nerwowy
OZW – ostry zespół wieńcowy
PAR4 – receptor aktywowany proteazą 4
PCR – reakcja łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym
PPAR γ – proliferatory peroksysomów γ
PTCP – białko transferowe fosfatydylocholiny
qRT-PCR – *ang. quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*, reakcja łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym poprzedzona reakcją odwrotnej transkrypcji
RIPC – *ang. remote ischemic post-conditioning*, kondycjonowanie niedokrwiennie
RNA – kwas rybonukleinowy
SOR – szpitalny oddział ratunkowy
TIA – *ang. transient ischemic attack*, przemijający epizod niedokrwienny
TNF- α – *ang. tumor necrosis factor alpha*, czynnik martwicy guza alfa
TOAST – *ang. The Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment*
T2DM – *ang. type 2 diabetes melitus*, cukrzycy typu 2
TXA2 – tromboksan A2
USCs – *ang. urine-derived stem cells*, komórki macierzyste obecne w moczu
VAMP8 – *ang. vesicle associated membrane protein 8*, synaptobrewina

Streszczenie w języku polskim

Wprowadzenie: Udar niedokrwienny jest jedną z najczęstszych przyczyn niepełnosprawności i przedwczesnych zgonów w populacji Świata, jednak zarówno metody jego diagnozowania jak i oceny rokowania wymagają udoskonalenia. Obiecującymi w tym zakresie wydają się być biomarkery udaru dostępne we krwi obwodowej. Celem przedstawionego badania była ocena ekspresji wybranych mikroRNA (miRNA) krążących we krwi pełnej (miR-106b-5p, miR-16-5p, miR-15a-5p, let-7e oraz miR-125a-3p i -5p), aby określić przydatność diagnostyczną i prognostyczną u pacjentów udarem niedokrwiennym mózgu w ostrej fazie.

Metody: Populację badaną stanowiło 60 pacjentów z rozpoznaniem ostrego udaru niedokrwiennego mózgu włączonych do badania w czasie pierwszej doby od początku epizodu. Grupę kontrolną stanowiło 30 dobranych pod względem wieku i płci pacjentów bez udaru i/lub przemijającego ataku niedokrwiennego (ang. transient ischemic attack, TIA) w wywiadzie, ze stabilną chorobą wieńcową i współistniejącymi czynnikami ryzyka sercowo-naczyniowego, w tym zawałem serca i cukrzycą typu 2. Ekspresję miRNA określano za pomocą qRT-PCR w próbkach krwi pełnej pobranej z żył obwodowych. Próbkę pobierano od grupy kontrolnej jednorazowo oraz od pacjentów z udarem mózgu w ciągu 24 godzin po wystąpieniu ostrego udaru niedokrwiennego i w 7 dobie hospitalizacji.

Wyniki: Poziom ekspresji miR-125a-3p u pacjentów z udarem mózgu był niższy zarówno wyjściowo, jak i 7 dni po przyjęciu do szpitala w porównaniu z osobami zdrowymi (odpowiednio $p=0,008$ i $p=0,020$). Ekspresja miR-125a-5p była wyższa u pacjentów w momencie przyjęcia do szpitala w porównaniu z grupą kontrolną, jednak w trakcie hospitalizacji ekspresja ta uległa istotnemu zmniejszeniu w 7. dobie w porównaniu z dniem przyjęcia do szpitala (odpowiednio $p=0,002$ i $p=0,016$). Analiza krzywej ROC wykazała potencjał diagnostyczny dla miR-125a-3p i -5p (AUC dla miR-125a-3 $p=0,705$; AUC dla miR-125a-5 $p=0,709$). Pacjenci z udarem o umiarkowanym nasileniu mieli istotnie wyższy poziom ekspresji miR-16-5p w porównaniu z pacjentami z udarem o małym nasileniu w dniu wystąpienia ostrego udaru niedokrwiennego. AUC w analizie krzywej ROC wynosiło 0,718, (95% CI, 0,59-0,85) $p=0,004$. Wieloczynnikowy model regresji logistycznej wykazał, że, wysoka wyjściowa ekspresja miR-16-5p oraz obecność cukrzycy, były niezależnymi predyktorami ciężkości udaru (OR: 4,34; 95% CI, 1,15-16,42; $p=0,031$ i OR: 4,65; 95% CI, 1,07-20,19; $p=0,040$, odpowiednio).

Wnioski: Przeprowadzone badanie pozwoliło na ocenę ekspresji wybranych miRNA związanych z płytkami krwi i pokazało, że mogą służyć w przyszłości jako diagnostyczne i prognostyczne biomarkery udaru niedokrwiennego mózgu.

Streszczenie w języku angielskim

Determination of the diagnostic and prognostic significance of new platelet-related microRNAs in ischemic stroke patients.

Background: Searching for circulating fluid biomarkers are needed for patients with ischemic stroke as diagnosis and prognosis of stroke requires cost-effective methods. In the current study we aimed to assess several whole blood circulating miRNAs (miR-106b-5p, miR-16-5p, miR-15a-5p, let-7e and miR-125a-3p and -5p) to analyze their diagnostic and prognostic utility in patients with acute ischemic stroke.

Methods: The study population consisted of 60 patients with the diagnosis of acute ischemic stroke. The control group consisted of 30 age- and gender-matched patients without history of stroke and/or TIA with established stable coronary artery disease and concomitant cardiovascular risk factors, including myocardial infarction and type 2 diabetes (DM). MiRNA expressions were determined by using venous whole blood samples with qRT-PCR, blood samples were collected from the control group (only once) and patients with stroke 24 h after onset of acute ischemic stroke and 7-days following index hospitalization.

Results: The expression levels of miR-125a-3p in stroke patients were lower both at baseline and 7-days after admission compared to the healthy individuals ($p=0.008$, $p=0.020$, respectively). MiR-125a-5p expression was higher in patients at admission compared to controls, however during hospitalization the expression significantly decreased in day-7 compared to day at admission ($p=0.002$, $p=0.016$, respectively). ROC curve analysis showed diagnostic potential for miR125a-3p and -5p (AUC for miR-125a-3p= 0.705; AUC for miR-125a-5p= 0.709). Patients with moderate stroke had significantly elevated miR-16-5p expression levels compared with patients with minor stroke at the day of acute ischemic stroke. AUC in ROC curve analysis was 0.718, (95% CI, 0.59–0.85) $p = 0.004$. Multivariate logistic regression model showed that, a high baseline miR-16-5p expression, together with DM, were independent predictors of increased stroke severity (OR: 4.34; 95% CI, 1.15–16.42; $p = 0.031$ and OR: 4.65; 95% CI, 1.07–20.19; $p = 0.040$, respectively).

Conclusion: In this study we validated platelet-related miRNAs which could serve as diagnostic and prognostic biomarkers of the ischemic stroke complications like increased severity.

1. Wstęp

Udar niedokrwienny mózgu stanowiący 85% wszystkich typów udarów jest jedną z najczęstszych chorób układu sercowo-naczyniowego i jedną z częstszych przyczyn zgonów oraz niepełnosprawności na świecie [1]. Mimo dostępności skutecznych metod terapeutycznych, takich jak tromboliza dożylna czy trombektomia mechaniczna, tylko około 13% pacjentów z udarem niedokrwiennym kwalifikuje się do leczenia przyczynowego. Głównym powodem jest wąskie terapeutyczne okno czasowe czyli okres od rozpoznania udaru do rozpoczęcia leczenia. Zgodnie z obowiązującymi rekomendacjami czas ten nie powinien przekraczać 4,5 godziny [1]. W ciągu kilkudziesięciu lat diagnostyka udaru mózgu i rokowanie chorych poprawiły się dzięki rozwojowi nowych metod obrazowania, takich jak tomografia komputerowa (CT) i rezonans magnetyczny (MRI) [2]. Niezależnie od tego, najbardziej dostępne i najczęściej wykonywane obrazowanie oparte na CT osiąga tylko 30% czułości w ciągu pierwszych 12 godzin [1,2]. Rezonans magnetyczny, choć jest narzędziem znacznie skuteczniejszym, nie jest dostępny w wielu szpitalach, a transport pacjenta do oddalonych placówek zabiera cenny czas [1,3]. Dlatego wciąż poszukuje się nowych metod szybkiej i skutecznej diagnostyki udaru niedokrwiennego. Jednymi z bardziej obiecujących wydają się być biomarkery możliwe do oceny w badaniu krwi obwodowej ze względu na łatwość i szybkość pobrania materiału [4]. Niekodujące RNA (ncRNA), w tym miRNA, wykazały potencjalną przydatność jako biomarkery diagnostyczne i prognostyczne udaru niedokrwiennego mózgu stwierdzoną w badaniach *in vitro*, na zwierzętach jak i u ludzi [5].

MikroRNA są regulatorami transkrypcji mRNA, które wpływają na proces translacji i syntezę białek poprzez łączenie się jego z regionem 3' [6–8]. MiRNA wpływają na ekspresję genów na terenie komórki, z której pochodzą, co więcej mogą być uwalniane do przestrzeni pozakomórkowej i internalizowane przez inne komórki, na terenie których również modyfikują transkrypcję [9–11]. Ta unikalna komunikacja komórkowa okazuje się ważna w procesie regeneracji tkanek mózgu po urazie spowodowanym niedokrwieniem i następującą po nim reperfuzyją [11]. Krążące miRNA mogą być wykrywane w surowicy krwi pobranej od pacjentów z udarem niedokrwiennym i są wystarczająco stabilne, aby można było wykonać wiarygodne pomiary laboratoryjne [12,13]. Ekspresja niektórych krążących miRNA zidentyfikowanych u pacjentów z udarem była istotnie zmieniona w porównaniu z osobami bez udaru i korelowała z ciężkością stanu i rozległością

uszkodzonego obszaru, co sugeruje potencjalną przydatność miRNA jako biomarkerów diagnostycznych i prognostycznych w udarze.

Wykazano, że wiele rodzajów miRNA jest transportowanych jako zawartość pęcherzyków pozakomórkowych (ang. extracellularvesicles, EV), uwalnianych przez różne typy komórek zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i na skutek stymulacji przez bodźce zapalne, toksyny, stres oksydacyjny itd. Pęcherzyki pozakomórkowe wydają się być istotnym elementem patofizjologii udaru niedokrwiennego, będąc elementem komunikacji, przez który komórki przekazują sobie informacje zakodowane w postaci cytokin, chemokin i materiału genetycznego np. ncRNA. Jak pokazują badania przeprowadzone in vitro i na zwierzętach przenoszone w EV miRNA może być internalizowane przez różne komórki biorące udział w patogenezie udaru niedokrwiennego i działać na ich terenie. Co więcej przenoszone w ten sposób miRNA może w przyszłości okazać się przydatne w terapii udaru niedokrwiennego. Udowodniono, że EV zawierające miRNA mogą przekraczać barierę krew-mózg i wpływać na ekspresję genów w uszkodzonej tkance nerwowej [14].

Istotną rolę w patofizjologii udaru niedokrwiennego pełnią płytki krwi będące nie tylko elementem hemostazy, ale także ważnym mediatorem odpowiedzi zapalnej [15]. Biorą one aktywny udział w tworzeniu się blaszek miażdżycowych będących przyczyną znacznego odsetka zdarzeń naczyniowo-mózgowych. Prowadzą także bezpośrednio do upośledzenia przepływu krwi w tętnicy mózgowej przez adhezję do uszkodzonej blaszki, aktywację i uwolnienie substancji prowadzących do aktywacji kaskady krzepnięcia [16]. Wykazano, że różne typy miRNA mogą modulować reaktywność płytek krwi, a z kolei te, które są przez nie uwalniane w trakcie aktywacji mogą być istotne dla patofizjologii udaru niedokrwiennego. Dlatego postuluje się ich możliwą kliniczną przydatność w charakterze biomarkerów diagnostycznych i prognostycznych udaru niedokrwiennego. W przeprowadzonych przez nasz zespół badawczy wcześniej dwóch analizach bioinformatycznych wyłoniono kilkanaście rodzajów miRNA związanych z procesami krzepnięcia i aktywacji płytek krwi oraz udarem niedokrwinnym mogących być potencjalnymi kandydatami do badań w kierunku określenia przydatności jako biomarkery [8,17].

2. Udar niedokrwienny – epidemiologia, patofizjologia, postępowanie kliniczne

2.1. Epidemiologia

Każdego roku na całym Świecie około 17 milionów osób doświadcza udaru, z czego u 85% rozpoznawany jest udar o etiologii niedokrwiennej [1,18,19]. Szacunkowo, w skali globalnej, co około sześć sekund dochodzi do zgonu z powodu udaru [20]. W ciągu całego życia udaru mózgu doświadczy średnio jedna na sześć osób. W Polsce ogólna liczba pacjentów doznających rokrocznie udaru niedokrwiennego wynosi około 75 tys., a śmiertelność spowodowana tą chorobą ocenia się na 22% w ciągu pierwszych trzech miesięcy po jego wystąpieniu. Udar mózgu jest również jedną z ważniejszych przyczyn trwałej niepełnosprawności, drugą co do częstości przyczyną otępienia oraz najczęstszą przyczyną padaczki u seniorów. Przebyte udaru u wielu osób prowadzi do rozwoju depresji i zaburzeń lękowych związanych z niepełnosprawnością i znacznym obniżeniem jakości życia [18]. Choć powszechnie uważa się, że udar dotyczy raczej pacjentów ze starszych grup wiekowych, odnotowuje się istotny wzrost zachorowań osób młodych i w średnim wieku, około 31% incydentów udarowych dotyczy osób poniżej 65. roku życia [1,21].

2.2. Patofizjologia

Pomimo, że udar niedokrwienny jest chorobą powszechnie występującą, jego patofizjologia wciąż pozostaje nie w pełni wyjaśniona [22]. Istnieje wiele przyczyn mogących prowadzić do okluzji naczynia mózgowego i niedokrwienia. Tkanka nerwowa, bardzo wrażliwa na niedostateczny dowóz tlenu w krótkim czasie ulega martwicy, a uszkodzenie staje się nieodwracalne [23]. W praktyce klinicznej możemy określić jedynie prawdopodobną przyczynę udaru, ponieważ obecność danego czynnika ryzyka np. migotania przedsionków nie musi świadczyć o tym, że to właśnie on doprowadził do incydentu. Stosowana powszechnie klasyfikacja TOAST (The Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment), nazwana tak od badania, dla którego ją przygotowano, wyróżnia następujące etiologiczne kategorie udaru mózgu:

- udar spowodowany chorobą dużych naczyń,
- udar spowodowany chorobą małych naczyń,
- udar sercowo-zatorowy, tzw. kardiogeny
- udar o innej etiologii
- udar o nieustalonej etiologii

Dla każdej kategorii wyróżniono szczegółowe kryteria kliniczne, na podstawie których można stwierdzić, że dany mechanizm patofizjologiczny jest z dużym prawdopodobieństwem odpowiedzialny za wystąpienie incydentu naczyniowo-mózgowego [24].

Udar spowodowany chorobą dużych naczyń

- zwężenie ($> 50\%$) tętnicy wewnątrz- lub zewnątrzczaszkowej zaopatrującej obszar mózgu, z którego pochodzą objawy udaru stwierdzone w badaniu ultrasonograficznym lub angiograficznym
- ognisko niedokrwienne o średnicy $> 1,5$ cm widoczne w badaniach obrazowych ośrodkowego układu nerwowego (OUN) (CT, MRI)
- wykluczona zatorowość pochodzenia sercowego
- dodatkowe czynniki przemawiające za rozpoznaniem udaru o tej etiologii to chromanie przestankowe, stan po przebyciu TIA w tym samym zakresie unaczynienia, szmer nad tętnicą szyjną lub osłabienie tętna na tętnicy szyjnej

Udar spowodowany chorobą małych naczyń

- objawy udaru lakunarnego
- brak ogniska lub ognisko o średnicy $\leq 1,5$ cm uwidocznione w badaniach obrazowych OUN (CT, MRI)
- brak innych przyczyn udaru mózgu

Udar kardiogeny

- obecność co najmniej jednego źródła zatorowości w sercu np. sztuczna zastawka serca, zwężenie zastawki mitralnej zwłaszcza jeżeli towarzyszy mu migotanie przedsionków, zespół chorego węzła zatokowego, zawał serca w okresie 6 miesięcy poprzedzających udar, przetrwały otwór owalny, skrzeplina w lewym przedsionku lub w lewej komorze, kardiomiopatii rozstrzeniowa, segmentalna akineza ściany lewej komory, infekcyjne zapalenie wsierdzia itd.
- wykluczona choroba dużych naczyń

Udar o innej etiologii

- rozpoznane chorób i stanów będących rzadkimi przyczynami udaru np. zaburzenia krzepnięcia, zapalenia naczyń, ch. autoimmunizacyjne, intoksykacje, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych itd.
- wykluczone pochodzenie związane z chorobą dużych naczyń i udar kardiogeny

Udar o nieustalonej etiologii

- współistnienie kilku prawdopodobnych przyczyn udaru
- niemożność określenia przyczyny udaru pomimo wykonania koniecznych badań diagnostycznych
- niekompletne badania

Warto wspomnieć, że rozkład częstości poszczególnych etiologii udaru niedokrwiennego jest zależny od wieku [18,22]. U osób młodych najczęstszą przyczyną jest rozwarstwienie tętnicy szyjnej lub kręgowej, częściej zdarzają się też udary o innej etiologii związane z chorobami autoimmunizacyjnymi, wrodzonymi zaburzeniami krzepnięcia, a także spowodowane nadużyciem substancji psychoaktywnych [25]. U osób starszych do najczęstszych przyczyn należy udar kardiogeny związany z migotaniem przedsionków lub przebytym zawałem mięśnia sercowego, a także udar spowodowany miażdżycą dużych naczyń [21].

2.2.1. Rola układu odpornościowego w patofizjologii udaru niedokrwiennego

Nie tylko układ sercowo-naczyniowy jest bezpośrednio związany z patofizjologią udaru niedokrwiennego. Wraz z pogłębianiem wiedzy na temat funkcji układu immunologicznego i roli stanu zapalnego w przebiegu wielu schorzeń, okazuje się że ma on także ogromne znaczenie w przypadku wystąpienia ostrego niedokrwienia OUN [26–28]. Do inicjacji zapalenia dochodzi już w ciągu kilku, kilkunastu minut po dokonaniu się udaru. Najprawdopodobniej staje się ono jednym z ważniejszych mechanizmów uszkodzenia tkanki nerwowej w ciągu kilku pierwszych godzin fazy ostrej, a zwiększona aktywność układu immunologicznego utrzymuje się przez kolejne dni. Rozwojowi stanu zapalnego sprzyja uszkodzenie komórek spowodowane niedostatecznym zaopatrzeniem w tlen i składniki odżywcze i ich martwica [29]. W tym stanie uwalniają one szereg cząsteczek określanych jako związane z uszkodzeniem komórki nazywanych inaczej alarminami. Do alarmin należą m.in. ATP, wolne kwasy nukleinowe, białko HMGB1 czy białka szoku cieplnego. Uwolnione z wnętrza uszkodzonej komórki alarminy mogą następnie aktywować komórki mikrogleju będące mózgowymi komórkami immunologicznymi poprzez tzw. receptory rozpoznające wzorce (ang. pattern recognition receptor, PRR) np. receptory z rodziny NOD-podobnych czy Toll-podobnych [30]. Aktywacja PRR uruchamia w komórkach mikrogleju kaskady wewnątrzkomórkowe szlaków sygnałowych prowadząc do aktywacji czynników transkrypcyjnych takich jak NF-κB, co z kolei skutkuje wytwarzaniem i uwalnianiem cytokin prozapalnych, zwłaszcza

IL-1 β , IL-6, TNF- α . Ich obecność w przestrzeni międzykomórkowej prowadzi do migracji i aktywacji innych komórek układu immunologicznego nasilających zapalenie [31]. W warunkach niedokrwienia, głównie na skutek hipoksji zwiększa się także aktywność komórek śródbłonna. W wyniku aktywacji na ich powierzchni pojawiają się liczne adhezyny takie jak ICAM, VCAM czy selektyna P. Interreagują one z leukocytami powodując ich przyleganie, toczenie się i przenikanie przez ścianę naczynia do sąsiadujących z nim uszkodzonych tkanek [27,32]. Ekspresja adhezyn na powierzchni śródbłonna ma także wpływ na płytki krwi prowadząc do ich aktywacji i agregacji [33]. Ten aspekt lokalnego stanu zapalnego rozwijającego się na terenie uszkodzonej przez udar tkanki nerwowej jest istotny ponieważ spowodowana nim agregacja płytek krwi i aktywacja układu krzepnięcia może pogorszyć i tak już upośledzony dopływ krwi do uszkodzonego obszaru OUN, a także spowodować zaburzenia mikrokrążenia w obszarach zlokalizowanych w pobliżu ogniska niedokrwiennego [26]. Rola układu immunologicznego w patofizjologii udaru wydaje się zatem równie istotna co zaburzenia sercowo-naczyniowe, zaś płytki krwi są elementem łączącym oba układy w tym procesie.

2.3 Diagnostyka

Wstępne rozpoznanie udaru niedokrwiennego opiera się na objawach klinicznych takich jak nagłe wystąpienie niedowładu toż stronnych kończyn, afazji, opadania kącika ust, zawrotów głowy, zaburzeń równowagi czy widzenia [1,20,22]. Dlatego tak ważne jest stałe zwiększanie świadomości społecznej i edukacja na temat udaru. W większości przypadków pierwsze oznaki niedokrwienia mózgu są zauważane przez rodzinę pacjenta lub inne przebywające z nim osoby i to one najczęściej powiadamiają Pogotowie Ratunkowe rozpoczynając tym samym łańcuch zdarzeń mających na celu przeprowadzenie diagnostyki w odpowiednim czasie. Według znanej wszystkim osobom zajmującym się problematyką udarów dewizy “czas to mózg”, szybkość z jaką dojdzie do rozpoznania udaru decyduje o tym czy w ogóle uda się je rozpocząć oraz o jego efekcie [34]. Niestety nadal nierzadko zdarza się, że pacjenci z udarem są przywożeni do szpitali w 2., 3. czy kolejnej dobie po epizodzie. Wynika to z nadal zbyt małej świadomości społecznej i przekonania, że te nietypowe objawy miną samoistnie za jakiś czas. Jeżeli jednak pacjent trafia do szpitala w ciągu kilkunastu czy kilkudziesięciu minut od początku objawów o sukcesie terapeutycznym decyduje szybkość wykonania właściwych badań diagnostycznych.

Kryteria rozpoznania udaru niedokrwienego obejmują rozpoznanie ostrych objawów ogniskowego uszkodzenia mózgu, rdzenia kręgowego lub siatkówki oka oraz spełnienie co najmniej jednego z kryteriów:

- wykazanie w badaniu obrazowym OUN lub neuropatologicznym świeżego ogniska niedokrwienia mózgu, rdzenia kręgowego lub siatkówki oka;
 - utrzymywanie się objawów klinicznych ogniskowego uszkodzenia mózgu, rdzenia kręgowego lub siatkówki oka przez co najmniej dobę lub zgon z ich przyczyny (w tym przypadku należy wykluczyć inne przyczyny zgonu);
 - ustąpienie objawów ogniskowego uszkodzenia mózgu, rdzenia kręgowego lub siatkówki oka po leczeniu reperfuzyjnym (wówczas nie bierze się pod uwagę kryterium utrzymywania się objawów klinicznych przez ≥ 24 h ani wyniku badania obrazowego sugerującego cechy świeżego niedokrwienia mózgu, rdzenia kręgowego lub siatkówki) [1].
- Spośród zaburzeń związanych z niedokrwieniem OUN wyróżniamy także TIA, zdefiniowane jako krótkotrwały, odwracalny epizod zaburzeń neurologicznych spowodowany ogniskowym niedokrwieniem mózgu, rdzenia kręgowego lub siatkówki oka bez pojawienia się ostrego zawału [27]. Objawy podobne to tych, które obserwuje się w łżejszych postaciach udaru zazwyczaj ustępują po kilku lub kilkunastu minutach, zwykle nie trwają dłużej niż godzinę. Nadal jednak granica czasowa różnicująca objawy kliniczne dokonanego udaru od TIA (24 godziny) jest mniej istotna niż wyniki badań obrazowych OUN, ponieważ utrzymywanie się objawów neurologicznych związanych z niedokrwieniem mózgu przez ponad 60 minut może świadczyć o obecności ognisk niedokrwienych, które będą widoczne w obrazowaniu MRI [35,36]. W celu uwzględnienia zarówno wczesnych objawów TIA, jak i dokonanego udaru mózgu, alternatywnie stosowany jest termin „ostry zespół mózgowo-naczyniowy” [37].

Do oceny ciężkości udaru, a co za tym idzie rokowania pacjentów, stosowanych jest kilka wystandaryzowanych skal klinicznych. Najbardziej rozpowszechnioną jest Skala Udarowa Narodowego Instytutu Zdrowia (NIHSS) (Ryc 1.), w której ocenia się zarówno stan świadomości będący istotnym wykładnikiem ciężkości udaru i rokowania jak i inne parametry wchodzące w skład badania neurologicznego [38]. Do jej zalet należy wysoka czułość w wykrywaniu zmian stanu klinicznego w ostrej fazie udaru, korelacja z umiejscowieniem niedokrwienia i jego objętością opisywanymi w badaniu MRI. Ma także dużą wartość prognostyczną w zakresie śmiertelności krótko- (7 dni) i długoterminowej (3 miesiące), a także ryzyka wystąpienia powikłań krwotocznych po zastosowaniu leczenia trombolitycznego [38,39]. Wadą skali NIHSS jest czasochłonność,

a także możliwość wykonania jedynie przez personel biegły w ocenie neurologicznej. Jest ona polecana szczególnie do monitorowania pacjentów z udarami z przedniego unaczynienia mózgowia. Do oceny stanu świadomości służy wykorzystywana często w warunkach przedszpitalnych i SOR skala Glasgow (ang. Glasgow Coma Scale, GCS) [40,41]. Nie uwzględnia ona jednak objawów neurologicznych innych niż zaburzenia świadomości. Co więcej jej wyniki mogą być fałszywie zaniżone przez obecność deficytów neurologicznych np. afazji czy niedowładu kończyn, dlatego też powinna być interpretowana ostrożnie, wraz z dokładną oceną kliniczną pacjenta [40].

Istnieją także inne, rzadziej używane skale takie jak Izraelska Kręgowopodstawna Skala Udaru (ang. Israeli Vertebrobasilar Stroke Scale, IVBSS) [42], Full Outline of Unresponsiveness (FOUR) [43] czy Skala Niedomogi Pnia Mózgu (łac. insufficientiatruncicerebri, ITC) [44], których dokładne omówienie przekracza ramy niniejszego opracowania. U pacjentów udarowych ocenia się także stopień niesprawności oraz zdolność do samodzielnego wykonania codziennych czynności, składające się na stan funkcjonalny. Czołową pozycję wśródskal służących do oceny tych parametrów zajmują zmodyfikowana Skala Rankina (Ryc 2.) i wskaźnik Barthel (Ryc 3.).

Skala Udarowa Narodowego Instytutu Zdrowia (NIHSS)				
Parametr			Imię i nazwisko, data przyjęcia do szpitala	Data oceny
1a	PRZYTOMNOŚĆ	0	Czuwa, żywa reakcja na bodźce	
	Rurka intubacyjna, bariera językowa, Uraz twarzy i/lub szyi, Opatrunek – ocena subiektywna	1	Reakcja na słabe bodźce, spełnianie poleceń	
		2	Reakcja na silny bodziec bólowy	
		3	Brak reakcji lub reakcja odruchowa	
1b	ORIENTACJA	0	Prawidłowa odpowiedź na oba pytania	
	Aktualny miesiąc i wiek, afazja – 2 pkt, Intubacja,	1	Prawidłowa odpowiedź na jedno pytanie	

	dyzartria, uraz, bariera językowa – 1 pkt	2	Brak prawidłowej odpowiedzi na oba pytania	
1c	POLECENIA	0	Prawidłowe wykonanie obu poleceń	
	Otwarcie i zamknięcie oczu, zaciśnięcie i rozluźnienie władnej ręki	1	Prawidłowe wykonanie jednego polecenia	
		2	Chory nie spełnił żadnego polecenia	
2	GĄŁKI OCZNE	0	Ruchy prawidłowe	
	Poziołe ruchy gałek ocznych. Dowolne i odruchowe ruchy	1	Częściowe porażenie (zbaczenie)	
		2	Porażenie pełne lub przymusowe spojrzenie	
3	POLE WIDZENIA	0	Bez ubytków w polu widzenia	
	Ocena za pomocą liczenia palców lub bodźca zagrażającego	1	Niedowidzenie +/- kwadrantowe oka	
		2	Niedowidzenie połowicze oka	
		3	Ślepotą organiczną lub korową	
4	NERW VII	0	Twarz prawidłowa, symetryczna	
	Zmarszczenie brwi, zaciśnięcie oczu, wyszczerzenie zębów	1	Spłylenie fałdu, asymetria przy uśmiechu	
		2	Całkowity (lub prawie) paraliż dolnego piętra twarzy	
		3	Całkowity paraliż dolnej i górnej części twarzy	
5a	LKG	0	LKG nie opada w ciągu 10 s	
	Każdą kończynę testujemy	1	LKG opada przed 10 s ale nie	

	osobno, zaczynamy od kończyny władnej. Pozycja siedząca – 90 stopni w stosunku do tułowia. Pozycja leżąca – 45 stopni w stosunku do tułowia		całym impetem	
		2	LKG opada przed 10 s ale oporuje grawitacji	
		3	LKG opada, nie oporuje grawitacji, minimalne ruchy czynne	
		4	LKG – porażenie (całkowity brak ruchów czynnych)	
		UN		
5b	PKG	0	PKG nie opada w ciągu 10 s	
	Każdą kończynę testujemy osobno, zaczynamy od kończyny władnej. Pozycja siedząca – 90 stopni w stosunku do tułowia. Pozycja leżąca – 45 stopni w stosunku do tułowia	1	PKG opada przed 10 s ale nie całym impetem	
		2	PKG opada przed 10 s ale oporuje grawitacji	
		3	PKG opada, nie oporuje grawitacji, minimalne ruchy czynne	
		4	PKG – porażenie (całkowity brak ruchów czynnych)	
		UN		
6a	LKD	0	LKD nie opada w ciągu 5 s	
	Każdą kończynę testujemy osobno, zaczynamy od kończyny władnej, pozycja wyjściowa – kończyna dolna uniesiona do 30 stopni w stosunku do podłoża.	1	LKD opada przed 5 sekundami ale nie całym impetem	
		2	LKD opada przed 5 s ale oporuje grawitacji	
		3	LKD opada, nie oporuje grawitacji, minimalne ruchy czynne	
		4	LKD – całkowite porażenie	

		UN		
6b	PKD	0	PKD nie opada w ciągu 5 s	
	Każdą kończynę testujemy osobno, zaczynamy od kończyny władnej, pozycja wyjściowa – kończyna dolna uniesiona do 30 stopni w stosunku do podłoża.	1	LKD opada przed 5 sekundami ale nie całym impetem	
		2	LKD opada przed 5 s ale oporuje grawitacji	
		3	LKD opada, nie oporuje grawitacji, minimalne ruchy czynne	
		4	LKD – całkowite porażenie	
7	ATAKSJA	0	Ataksja nieobecna	
	Test z otwartymi oczyma. Gdy afazja, brak zrozumienia polecenia, śpiączka, paraliż – 0 pkt!!!	1	Ataksja obecna w minimum 1 kończynie lewej lub prawej	
		2	Ataksja obecna w obu kk. górnych lub dolnych (ew. skos)	
		UN		
8	CZUCIE	0	Czucie prawidłowe	
	Twarz, KG, tułów, KD, afazja – 0 lub 1 pkt, śpiączka, tetraplegia – 2 pkt.	1	Łagodna do umiarkowanej utrata czucia	
		2	Poważna, całkowita lub obustronna utrata czucia	
9	AFAZJA	0	Brak afazji	
		1	Łagodna do umiarkowanej afazja	
		2	Poważna afazja	
		3	Mutyzm, Afazja globalna	
10	DYZARTRIA	0	Mowa prawidłowa	

	Afazja – ocena spotanicznej wypowiedzi; Intubacja – brak wydawania głosu	1	Niewyraźne wymawianie przynajmniej niektórych słów
		2	Mowa bardzo niewyraźna lub brak mowy
11	ZANIEDBYWANIE	0	Bez nieprawidłowości
	Afazja: ocena zainteresowania ciałem. Śpiączka – 0 pkt	1	Zaniedbywanie lub ekstynkcja bodźców w jednej modalności
		2	Połowicza nieuwaga lub ekstynkcja bodźców w kilku modalnościach
UWAGI		SUMA	

Ryc. 1. Skala Udarowa Narodowego Instytutu Zdrowia (NIHSS) [38]

PUNKTACJA	OPIS
1	Brak objawów
2	Objawy nie wymagające zmiany stylu życia
3	Niesprawność nieznanego stopnia, chory nie jest w stanie wykonać wszystkich czynności, które wykonywał przed zachorowaniem, ale jest zupełnie samodzielny-nie wymaga pomocy
4	Umiarkowana niesprawność, pacjent chodzi samodzielnie, wymaga niewielkiej pomocy w zakresie czynności dnia codziennego
5	Pacjent wymaga znacznej pomocy w zakresie dnia codziennego, nie chodzi
6	Pacjent wymaga stałej opieki w dzień i nocą, leżący
7	Zgon

Ryc. 2. Zmodyfikowana Skala Rankina [45]

Czynności	Punktacja
Jedzenie	0 = niezdolny 1 = wymaga pomocy 2 = samodzielnie
Kąpanie się	1 = wymaga pomocy 2 = samodzielnie
Pielęgnacja	0 = wymaga pomocy 1 = samodzielnie
Ubieranie się	0 = niezdolny 1 = wymaga pomocy 2 = samodzielnie
Oddawanie stolca	0 = nietrzymanie 1 = sporadyczne 2 = kontrolowane
Oddawanie moczu	0 = nietrzymanie 1 = sporadyczne 2 = kontrolowane
Potrzeby fizjologiczne	0 = zależny 1 = wymaga pomocy 2 = samodzielnie
Przemieszczanie się	0 = niezdolny 1 = z dużą pomocą 2 = z niewielką pomocą 3 = samodzielnie
Chodzenie	0 = niezdolny 1 = za pomocą wózka 2 = z pomocą innej osoby 3 = samodzielnie
Chodzenie po schodach	0 = niezdolny 1 = wymaga pomocy 2 = samodzielnie

Ryc. 3. Wskaźnik Barthel [46]

2.4. Leczenie

W ostrej fazie udaru dostępne są dwie formy leczenia przyczynowego - tromboliza polegająca na dożylnym podaniu rekombinowanego tkankowego aktywatora plazminogenu oraz trombektomia mechaniczna czyli usunięcie zatoru za pomocą urządzenia mechanicznego [1,2,47]. Jeżeli tylko zostaną zastosowane, obie te formy leczenia cechują się skutecznością i mogą odwrócić całkowicie lub częściowo objawy udaru. Głównym kryterium ograniczającym jest czas, który upłynął od początku udaru wynoszący < 4,5 godziny [1]. Nietrudno zauważyć, że jest to restrykcyjne kryterium czasowe zwłaszcza, że w toku diagnostyki wykonuje się co najmniej jedno badanie obrazowe OUN. Statystyki pokazują, że u zdecydowanej większości pacjentów (87-88%) nie udaje się wdrożyć leczenia przyczynowego [1,2]. Wynika to najczęściej z obecności pozaszpitalnych i szpitalnych czynników wpływających na opóźnienie rozpoznania udaru:

Opóźnienia pozaszpitalne:

- brak świadomości/nierozpoznanie objawów udaru mózgu przez pacjenta
- oczekiwanie chorego na samoistne ustąpienie objawów
- zgłoszenie chorego pacjenta do lekarza rodzinnego zamiast do izby przyjęć szpitala
- nieprawidłowa kwalifikacja zgłoszenia przez dyspozytorów
- długi czas oczekiwania na pomoc
- wydłużone procedury oceny przez personel ratownictwa medycznego
- brak transportu chorego do szpitala docelowego (z oddziałem udarowym)

Opóźnienia wewnątrzszpitalne:

- nieprawidłowa kwalifikacja pacjenta (TRIAGE) na oddziale ratunkowym
- opóźniona ocena neurologiczna
- długi czas wykonania badań laboratoryjnych i obrazowych, brak bezpośrednich, szybkich do oceny biomarkerów
- opóźnienie decyzji o podjęciu terapii przez personel oddziału udarowego

W związku z tak ograniczoną możliwością leczenia przyczynowego niezwykle istotna okazuje się profilaktyka pierwotna obejmująca zarówno właściwe leczenie schorzeń zwiększających ryzyko udaru takich jak cukrzyca, nadciśnienie tętnicze, hiperlipidemia

czy migotanie przedsionków, jak i korekta stylu życia t.j. redukcja masy ciała, wysiłek fizyczny oraz zaprzestanie palenia papierosów [48,49].

3. MikroRNA związane z pęcherzykami pozakomórkowymi w patofizjologii udaru niedokrwiennego

Pęcherzyki pozakomórkowe o rozmiarach od 30 do 5000 nm są wydzielane z błon komórkowych. Stanowią one ważny element komunikacji międzykomórkowej i mogą być uwalniane w warunkach fizjologicznych lub patologicznych, konstytutywnie lub po aktywacji przez stres oksydacyjny, hipoksję czy w trakcie apoptozy. Możemy wyróżnić trzy podtypy EV - egzosomy, mikropęcherzyki i ciała apoptotyczne. Najmniejsze spośród nich, egzosomy (30-100 nm) uwalniane są w wyniku fuzji cytoplazmatycznych ciałek wielopęcherzykowych z błoną komórkową. Mikropęcherzyki (0,1-1,0 μm) uwalniane są w procesie egzocytozy, zwłaszcza w fazie wzrostu komórki. Największe (1-5 μm) ciała apoptotyczne powstają w późnych fazach apoptozy. EV mogą zawierać białka, lipidy, węglowodany, receptory błonowe, cytokiny oraz materiał genetyczny, w tym miRNA [50].

3.1. Badania *in vitro* i na zwierzętach

3.1.1. Aktywność mikrogleju po niedokrwieniu i rola miRNA związanych z mikropęcherzykami

MikroRNA związane z EV pochodzącymi z różnych typów komórek były badane *in vitro* i na modelach zwierzęcych, jako cząsteczki uczestniczące w procesie poniedokrwiennego uszkodzenia i regeneracji tkanki nerwowej. Oceniano wpływ egzosomów pochodzących z ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych sznura pępowinowego (ang. human umbilical mesenchymal stem cells, hUMSCs) na komórki mikrogleju wywołujące stan zapalny po udarze niedokrwinnym mózgu [51]. U myszy leczenie egzosomami pochodzącymi z hUMSCs znacząco zmniejszyło wielkość penumbry, złagodziło zaburzenia behawioralne i zmniejszyło ekspresję cytokin prozapalnych - IL-6, TNF- α i IL-1 β w obrębie uszkodzonej przez niedokrwienie tkanki mózgowej. Obserwacje dokonane na modelu mysim pogłębiono w badaniu *in vitro*, w którym komórki mikrogleju były hodowane z egzosomami pochodzącymi z hUMSCs, co zmieniało wzorzec ich aktywacji po deprywacji tlenowo-glukozowej/reoksygenacji

(OGD/R). Obecność egzosomów zmniejszyła liczbę klasycznie aktywowanych, prozapalnych komórek M1, zwiększyła zaś liczbę alternatywnie aktywowanych komórek mikrogleju M2, odpowiedzialnych za eferocytozę i wydzielanie czynników neurotroficznych. Ponadto w komórkach poddanych działaniu egzosomów obniżyła się ekspresja białek szlaku sygnałowego IRAK1/TRAF6 oraz cytokin IL-1 β , IL-6, TNF- α . Analiza metodą sekwencjonowania wskazała na miR-146a-5p jako czynnik odpowiedzialny za obserwowany efekt immunomodulacyjny. Wykazano, że zawartość miR-146a-5p w mikrogleju po podaniu egzosomów była znacząco zwiększona. Co więcej, zablokowanie miR-146a-5p odwracało efekt zmniejszenia ekspresji cytokin prozapalnych. Wyniki te wskazują na istotną rolę miR-146a-5p pochodzącego z egzosomów w procesach zapalnych na terenie tkanki mózgowej po niedokrwieniu i reperfuzji poprzez hamowanie szlaku IRAK1/TRAF6 [51].

Aktywność mikrogleju po epizodach niedokrwienia może być również regulowana przez uszkodzone, ale nadal żywe neurony, które uwalniają EV zawierające miR-98. Internalizowane następnie przez komórki miR-98 poprzez regulację ekspresji genu PAFR kodującego białko zaangażowane w fagocytozę komórek apoptotycznych może chronić uszkodzone neurony przed nadmierną aktywnością mikrogleju. W badaniu przeprowadzonym przez Yang i wsp. ekspresja miR-98 w obszarze penumbry utrzymywała się na stabilnym poziomie w ciągu pierwszych 24 godzin, a po 3 dniach zaobserwowano jej znaczący spadek. Wskazuje to na możliwą rolę miR-98 jako czynnika ochronnego po niedokrwieniu [52].

Inny rodzaj miRNA, mianowicie miR-126 opisywany w wielu publikacjach jako specyficzny dla śródbłonna był związany z mechanizmem zjawiska remote ischemic post-conditioning (RIPC). Polega ono na wywoływaniu krótkich epizodów niedokrwienia w tkance lub narządzie odległym od tego, który ma być narażony na uszkodzenie poniedokrwienne. Okazuje się, że takie działanie w modelu eksperymentalnym zmniejsza negatywne skutki późniejszego niedokrwienia narządu docelowego [53]. Aby określić jaki jest udział miRNA w tym procesie, do hodowli ludzkich komórek neuroblastycznych SH-SY5Y dodano egzosomy uzyskane z krwi obwodowej pobranej od zdrowych ochotników poddanych wcześniej przejściowemu niedokrwieniu kończyn w warunkach kontrolowanych. Wykazano, że niedokrwienie jest związane ze wzrostem zawartości miR-126 w egzosomach pochodzących z osocza. Cui i wsp. wykazali istotne zmiany takie jak: zmniejszona metylacja DNA, wyższa ekspresja białka P21 oraz przedłużenie fazy S cyklu komórkowego w komórkach SH-SY5Y hodowanych z egzosomami uzyskanymi z osocza

po przejściowym niedokrwieniu. Obecność egzosomów zwiększała także ekspresję i aktywność metylotransferazy DNA (DNMT) 3B w porównaniu z tą, obserwowaną w komórkach hodowanych bez egzosomów. Obserwacje zostały następnie potwierdzone przez zakażenie komórek SH-SY5Y wektorami lentiwirusowymi niosącymi miR-126, co wywołało efekt podobny do uzyskanego wcześniej w wyniku hodowli z egzosomami. Istotny wydaje się fakt, że inkubacja komórek SH-SY5Y z egzosomami uzyskanymi po niedokrwieniu zmniejszała stopień ich uszkodzenia po OGD-R. Tak więc, hamowanie ekspresji neuronalnej DNMTs przez działanie miR-126 przenoszonego przez egzosomy obecne w osoczu może być odpowiedzialne za neuroprotecyjne działanie RIPc [54].

Podobne wyniki odnotowano w badaniu przeprowadzonym przez Geng i wsp. na szczurzym modelu udaru niedokrwienego mózgu, którym po epizodzie podawano egzosomy pochodzące z komórek macierzystych tkanki tłuszczowej (ang. adipose tissue stem cells, ADSCs). Przed podaniem egzosomy pochodzące z ADSCs były transfekowane miR-126 (miR-126+) lub inhibitorem miR-126 (miR-126-), a także nietransfekowane (naiwne). W grupie leczonej egzosomami miR-126+ zaobserwowano poprawę funkcjonalną, mimo że objętość uszkodzonego obszaru nie uległa zmniejszeniu. Ponadto terapia egzosomami miR-126+ zwiększyła ekspresję czynnika von Willebranda, oraz dublokortyny - markera komórek neuroblastycznych wskazującego na wzmożoną waskuloogenezę i neurogenezę w strefie okołozawałowej [55]. Dodatkowo leczenie egzosomami pochodzącymi z ADSCs zmniejszało aktywację mikrogleju, hamowało produkcję cytokin prozapalnych TNF- α i IL-1 β oraz zmniejszało aktywację proapoptotycznej kaspazy-3 w uszkodzonej tkance nerwowej zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Neuroprotecyjne właściwości miR-126 potwierdza fakt, że procesy obserwowane po podaniu egzosomów miR-126+ były znacznie osłabione po zastosowaniu leczenia egzosomami miR-126- w porównaniu z podawaniem egzosomów miR-126+ a także naiwnych [55].

Kolejne miRNA związane z antyapoptotycznym działaniem ADSCs - miR-31, hamuje ekspresję genów TRAF6 i IRF5, prowadząc jednocześnie do redukcji wytwarzania białek istotnych dla procesu apoptozy - kaspazy-3 i Bax. W badaniach przeprowadzonych na mysim modelu udaru niedokrwienego, podanie EV pochodzących z ADSCs zawierających miR-31 było związane z poprawą funkcji układu nerwowego, ograniczeniem objętości obszaru uszkodzonego przez niedokrwienie oraz zmniejszeniem nasilenia apoptozy neuronów [56] (Rycina 1). Co ciekawe, również miR-22-3p zawarty w EV pochodzących z ADSCs był badany jako czynnik uczestniczący w procesie

poniedokrwiennego uszkodzenia neuronów. Mechanizm działania związany jest również z hamowaniem szlaków apoptotycznych poprzez ukierunkowanie na czynnik KDM6B zaangażowany w aktywację proapoptotycznej kaspazy-3 i Bax [57]. Podsumowując, działanie osi miR-31/TRAF6/IRF5 i miR-22-3p/KDM6B/BMP2/BMF może być przedmiotem dalszych badań w kierunku nowych, obiecujących strategii terapeutycznych w udarze niedokrwiennym mózgu.

Kolejne miRNA, mianowicie miR-199a-5p podobnie jak wspomniane już miR-126 było zaangażowane w proces rozwoju tolerancji niedokrwienia po RIPc. Warunki hipoksemiczne z następczą reoksygenacją zwiększały ekspresję miR-199a-5p w komórkach śródbłonna pochodzących z żyły pępkowej (ang. Human umbilical vein endothelial cells, hUVECs) i wydzielanych przez nie egzosomach. Podanie egzosomów pochodzących z hUVECs do komórek nerwowych narażonych na hipoksję i reoksygenację *in vitro*, spowodowało supresję procesów zapalnych i apoptozy. Zauważono, że zwiększony poziom miR-199a-5p w komórkach nerwowych zmniejszał stres retikulum endoplazmatycznego (siateczki wewnątrzplazmatycznej). Jednocześnie zahamowanie miR-199a-5p znacznie zmniejszyło ochronne działanie egzosomów pochodzących z hUVECs [58]. Zastosowanie egzosomów pochodzących z hUVEC w praktyce klinicznej może być jednak trudne ze względu na małą dostępność materiału, z którego są pozyskiwane. Znacznie łatwiejsze wydaje się pozyskiwanie egzosomów z bardziej uniwersalnych źródeł, takich jak krew obwodowa czy mocz. Efekt leczenia egzosomami pochodzącymi z komórek macierzystych obecnych w moczu (ang. urine-derived stem cells, USCs) w udarze niedokrwiennym mózgu oceniano zarówno *in vitro*, jak i na modelach zwierzęcych. Dożylna infuzja egzosomów pochodzących USCs zmniejszyła objętość zawału i znacząco poprawiła funkcjonalną regenerację po okluzji tętnicy środkowej mózgu u szczurów. Ponadto egzosomy te zwiększają proliferację i różnicowanie neuronalnych komórek macierzystych prowadząc do nasilenia neurogenezy w strefie granicznej zawału. Stwierdzono, że to korzystne działanie jest związane z podwyższonym poziomem miR-26a uczestniczącego w promowaniu proliferacji i różnicowania neuronalnych komórek macierzystych poprzez hamowanie deacetylazy histonowej 6. Wyniki sugerują zatem, że transfer egzosomalnego miR-26a może wyjaśniać pozytywny wpływ egzosomów pochodzących z USCs na neurogenezę [59].

3.1.2. Pęcherzyki pozakomórkowe uwalniane przez mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego w udarze niedokrwiennym mózgu

Celem wcześniej prowadzonych badań w tym zakresie była ocena wpływu EV pochodzących z mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego (ang. bone marrow stem cells, BMSCs) zawierających miR-221-3p na populację myszy z wywołaną eksperymentalnie okluzją tętnicy środkowej mózgu, a także na neurony korowe w warunkach *in vitro* [60]. Zaobserwowano, że pęcherzyki pozakomórkowe uwalniane z komórek macierzystych szpiku kostnego działają protekcyjnie w niedokrwieniu mięśnia sercowego, jak również w przypadku urazu reperfuzyjnego [61]. W populacji pacjentów ze stwierdzonym udarem niedokrwiennym mózgu ekspresja omawianych pęcherzyków była zróżnicowana, natomiast na podstawie wykonanych eksperymentów wysnuto podejrzenie ich właściwości neuroprotekcyjnych [60,62]. Docelowym miejscem działania pęcherzyków pozakomórkowych pochodzących z komórek macierzystych szpiku kostnego jest aktywujący czynnik transkrypcyjny 3 (ATF3), działający jako regulator zwiększający intensywność procesów zapalnych po urazie wywołanym stresem niedokrwiennym [63]. W grupie myszy z okluzją tętnicy środkowej mózgu ekspresja wspomnianego miR-221-3p w tkance nerwowej mózgowia była obniżona. Stwierdzono, że pęcherzyki pozakomórkowe o wyższej zawartości miR-221-3p powodowały zwiększenie przeżywalności i opóźnienie apoptozy neuronów będących pod wpływem stresu komórkowego związanego z niedoborem tlenu i glukozy. Opisany pozytywny efekt był niwelowany przez podanie si-AFT3. Ponadto, w badaniach przeprowadzonych na modelu zwierzęcym wykazano, że leczenie pęcherzykami pozakomórkowymi pochodzącymi z komórek macierzystych szpiku zawierających miR-221-3p wiązało się ze zmniejszeniem ekspresji ATF3, a w konsekwencji również z poprawą funkcjonalną układu nerwowego i zmniejszeniem rozległości uszkodzeń mózgu [64]. Tak więc, pęcherzyki pozakomórkowe pochodzące z komórek macierzystych szpiku kostnego mogą w pewnym stopniu odwrócić niedokrwienny uraz mózgu poprzez uwalnianie miR-221-3p, który wpływa hamująco na ekspresję ATF3 i w ten sposób reguluje procesy zapalne (Ryc 4.).

Wykazano, że egzosomy pochodzące z komórek macierzystych szpiku kostnego, ale zawierające inny typ miRNA-miR-21-5p mogą pełnić rolę mediatorów promujących angiogenezę w uszkodzonych przez niedokrwienie tkankach [65]. Leczenie z zastosowaniem takich pęcherzyków w populacji myszy ze stwierdzoną okluzją tętnicy

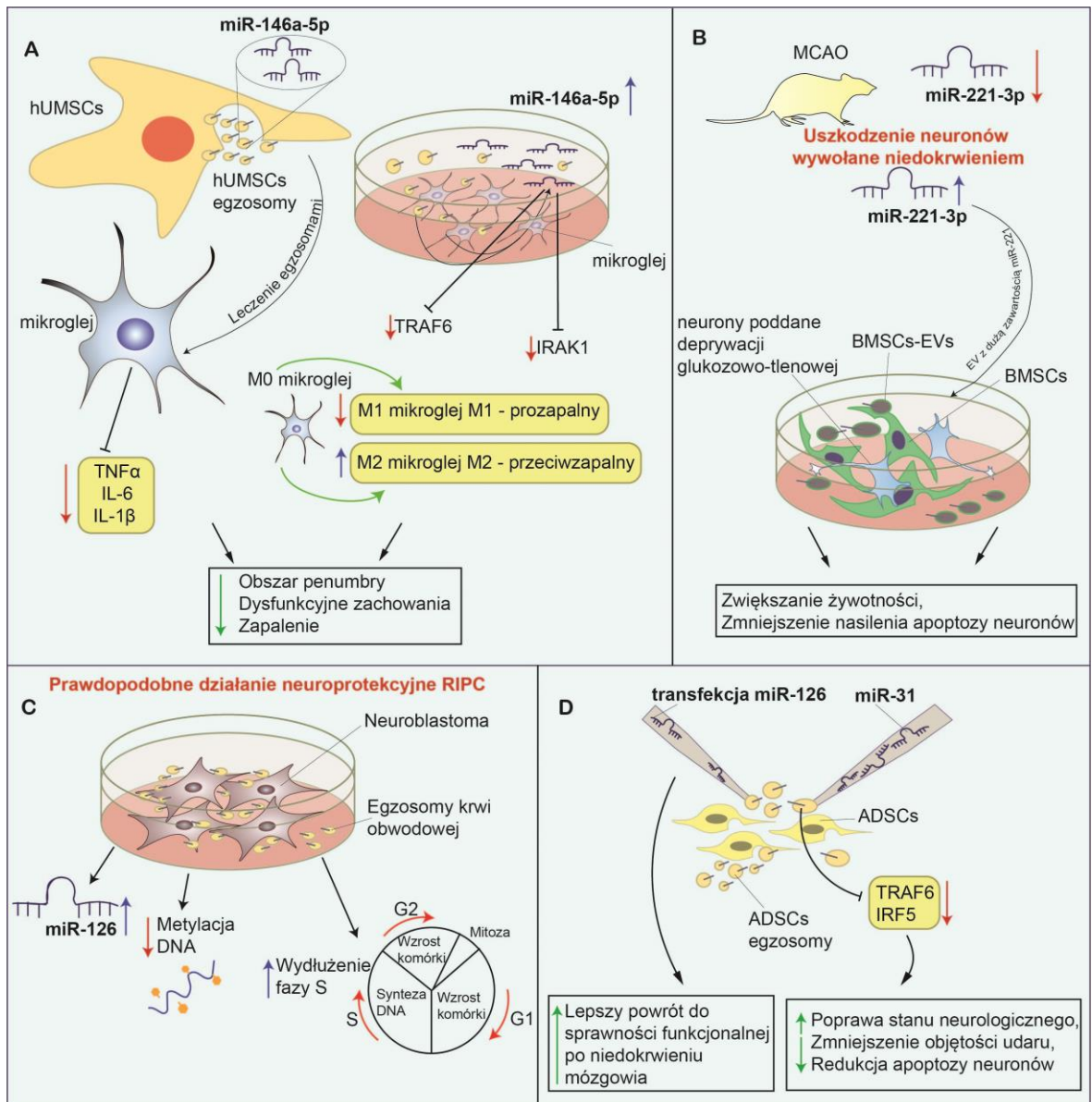
środkowej mózgu zredukowało rozległość niedokrwienia oraz wpływało na zmniejszenie deficytów neurologicznych w badanej grupie zwierząt. Obserwowany efekt terapii był dawkozależny. Podczas analizy mózgow w grupie badanej, obserwowano zwiększoną proliferację mikropęcherzyków, jak również wyższe stężenie białek VEGF/VEGFR2 i Ang-1/Tie-2 w strefie penumbry. Uwagę zwracała także zwiększona ekspresja miR-21-5p w strefie granicznej w porównaniu z grupą kontrolną. W innym eksperymencie przeprowadzonym w warunkach *in vitro* wykazano, że komórki macierzyste szpiku kostnego mogą transferować miR-21-5p do komórek endotelium, promując w ten sposób ich proliferację, migrację oraz tworzenie nowych połączeń między nimi. Potwierdzeniem poprzednich obserwacji stało się doświadczenie z użyciem anti-miR21-5p (inhibitor miR-21-5p), po zastosowaniu którego zaobserwowano ustąpienie pro-angiogennego efektu egzosomów uwalnianych z komórek macierzystych szpiku kostnego [65]. Biorąc pod uwagę kluczową rolę angiogenezy dla regeneracji tkanek po okresie niedokrwienia, należy rozważyć miR-21-5p jako potencjalną nową opcję terapeutyczną wymagającą dalszych badań w tym zakresie.

3.1.3. Egzosomy pochodzące z tkanki nerwowej w udarze niedokrwiennym mózgu

Nie tylko egzosomy pozyskiwane ze źródeł obwodowych, ale również te wydzielane przez samą tkankę nerwową, mają znaczenie w patogenezie udaru niedokrwiennego mózgu oraz w procesie naprawy tkanki po niedokrwieniu. Przeciwwzapalne działanie pęcherzyków pozakomórkowych pochodzących z neurogennych komórek progenitorowych (linii ReNcell VM) obserwowano zarówno w warunkach *in vitro* w stymulowanych lipopolisacharydem komórkach mikrogleju, jak i podczas badania populacji myszy ze stwierdzoną okluzją tętnicy środkowej mózgu. Stwierdzono, że pęcherzyki pozakomórkowe pochodzące z tkanki nerwowej wykazują aktywność wewnątrzkomórkową zmniejszając produkcję cytokin prozapalnych. W zwierzęcym modelu udaru niedokrwiennego, po ich dożylnym podaniu, egzosomy infiltrowały zmiany powstałe w wyniku niedokrwienia i hamowały odpowiedź zapalną. W wyniku bardziej precyzyjnego sekwencjonowania zawartego w nich miRNA, zidentyfikowano najistotniejsze typy zaangażowane w supresję kinazy MAPK i komórkowych szlaków zapalnych, a były to: miR-99a-5p, miR-139-5p, miR-98-5p, miR-21-5p, let-7i-5p, let-7g-5p i let-7b-5p. Zauważono ich wysoką ekspresję w pęcherzykach pozakomórkowych

tkanki nerwowej, jak również wzrost ich zawartości w stymulowanych lipopolisacharydem komórkach mikrogleju po 24 h inkubacji z egzosomami [66].

Innym miRNA obficie występującym w pęcherzykach pozakomórkowych uwalnianych z neurogennych komórek progenitorowych jest miR-150-3p, którego celem molekularnym działania jest kinaza CASP2, element ścieżki sygnałowej zaangażowanej w proliferację neuronów. Neuroprotektoryjne działanie tych egzosomów zaobserwowano zarówno w warunkach *in vitro* w komórkach linii SH-SY5Y poddanych deprivacji tlenowo-glukozowej, a także w badanej populacji szczurów po okluzji tętnicy środkowej mózgu.. Leczenie egzosomami uwalnianymi z tkanki nerwowej transfekowanych antymiR-150-3p blokowało neuroproliferyzację i hamowało apoptozę neuronów. Biorąc pod uwagę opisaną zależność działania egzosomów pochodzenia neurogennego na regenerację tkanki nerwowej poprzez zawarty w nich miR-150-3p i jego wpływ na ekspresję genu CASP2, wydaje się, że miR-150-3p może odgrywać ważną rolę w procesie naprawy tkanki nerwowej po niedokrwieniu [67]. Zarówno wyniki badań *in vitro*, jak i na zwierzętach, wskazują na obiecującą rolę egzosomów jako potencjalnych opcji terapeutycznych w niedokrwinnym uszkodzeniu mózgu. Opisany profil powyższych miRNA może być kluczem do wyjaśnienia ich mechanizmu działania.



Ryc. 4 Możliwe mechanizmy neuroprotekcynego działania miRNA po epizodzie niedokrwienia tkanki nerwowej

4. Badania przeprowadzone w grupach pacjentów z udarem niedokrwinnym

4.1. Egzosomy

Egzosomy wydzielane przez liczne komórki można znaleźć we krwi obwodowej, co czyni je cennym materiałem diagnostycznym potencjalnie przydatnym w praktyce klinicznej. Podobnie jak w badaniach *in vitro* i na modelach zwierzęcych, również u ludzi stwierdzono wpływ udaru niedokrwinnego mózgu na ekspresję kilku egzosomalnych miRNA. Ze względu na wydzielanie pęcherzyków do przestrzeni pozakomórkowej

w sposób selektywny, zależny od aktualnego stanu organizmu, egzosomalne miRNA uważa się za bardziej czułe i specyficzne biomarkery w porównaniu z całkowitym komórkowym miRNA lub wolnym miRNA [68]. MiR-223 jest jednym z najczęściej występujących egzosomalnych miRNA w osoczu u osób zdrowych, a jego zmienioną ekspresję zaobserwowano u pacjentów z chorobami zwiększającymi ryzyko wystąpienia udaru niedokrwiennego mózgu, takimi jak miażdżycy [69], cukrzyca [70] i zwiększona reaktywność płytek krwi [71,72]. Stwierdzono, że poziom miR-223 był istotnie podwyższony w grupie pacjentów w ostrej fazie udaru niedokrwiennego mózgu w porównaniu z grupą kontrolną bez udaru. Ponadto w badanej populacji poziom jego ekspresji wykazywał dodatnią korelację z wynikiem w skali NIHSS w ostrej fazie udaru oraz z gorszym rokowaniem ocenionym w skali mRSpo 3 miesiącach od wystąpienia epizodu. Nie stwierdzono natomiast korelacji z rozległością obszaru niedokrwienia [13]. Mimo to, potencjalne kliniczne zastosowanie miR-223 jako biomarkera w udarze niedokrwiennym mózgu jest wątpliwe, ponieważ ekspresja miR-223 może być zmieniona również w wielu innych chorobach takich jak zawał serca czy różne rodzaje nowotworów.

Tabela 1. MikroRNA dla których wykazano potencjalną przydatność jako biomarkerów udaru niedokrwiennego w badaniach przeprowadzonych na grupach pacjentów

Piśmiennictwo	MiRNA	AUC	P
[5]	miR-21-5p	0,714	0,007
		0,734	0,003
	miR-30-5p	0,826	0,001
		0,438	0,516
[73]	miR-134	0,834	7×10^{-5}

[74]	miR-30d-5p	n/d	n/d
[13]	miR-223	0,859	<0,001
[55]	miR-126	n/d	n/d
[75]	miR-144a	0,769	<0,001
	miR-144a	0,971	<0,001
	miR-125b-2-3p	0,889	<0,001
[76]	miR-155	0,851	<0,05

Jak wspomniano, miR-126 obficie obecny w śródbłonku wykazywał właściwości neuroprotektoryjne po udarze niedokrwiennym zarówno w badaniach *in vitro*, jak i na zwierzętach. Wyniki te wydają się potwierdzać u pacjentów - zaobserwowano bowiem, że poziom oznaczonego miR-126 był istotnie niższy w grupie chorych będących w ostrej fazie udaru niedokrwiennego w porównaniu z grupą kontrolną. Co ważne, opisano pozytywną zależność pomiędzy ekspresją miR-126 a wynikiem uzyskanym w skali Barthel, wskazując, że wyższy poziom miR-126 w osoczu wiązał się z lepszym stanem klinicznym i poprawą codziennego funkcjonowania pacjenta [55]. Zmienioną ekspresję związaną z udarem niedokrwiennym mózgu odnotowano również dla miR-152-3p, który był istotnie obniżony u pacjentów grupy badanej (z ostrym niedokrwieniem) w porównaniu z grupą kontrolną. Wykazano też, zależność pomiędzy poziomem ekspresji wspomnianej cząsteczki a klinicznie stwierdzaną ciężkością udaru ocenianą za pomocą skali NIHSS. Ponadto zaobserwowano, że ekspresja miR-152-5p była najniższa u pacjentów z udarem mózgu spowodowanym miażdżycą dużych tętnic w porównaniu do grupy chorych z przypadkami niedokrwienia mózgowia spowodowanymi innymi czynnikami [77]. Należy podkreślić, że w warunkach *in vitro* miR-152-3p okazał się czynnikiem chroniącym neurony przed nadmierną produkcją reaktywnych form tlenu oraz

ich apoptozą w warunkach deprivacji tlenowo-glukozowej poprzez wpływ na antyoksydacyjną ścieżkę sygnałową Nrf2/ARE [78].

W grupie osób z udarem niedokrwinnym mózgu zaobserwowano natomiast zwiększoną ekspresję miR-134 w porównaniu z grupą kontrolną w ciągu 24 godzin od epizodu niedokrwienia. Poziom egzosomalnego miR-134 był pozytywnie skorelowany z ciężkością udaru mierzoną wynikiem NIHSS, rozległością zawału i gorszym rokowaniem w zmodyfikowanej skali Rankina (mRS). Nie zaobserwowano jednak istotnej dynamiki dla poziomu egzosomalnego miR-134 oznaczając go w 24, 48 i 72 godziny po udarze niedokrwinnym. Ponieważ decyzja o wdrożeniu leczenia udaru mózgu podejmowana jest w pierwszych godzinach po jego wystąpieniu, konieczne są bardziej szczegółowe badania w celu wyjaśnienia wzorca zmian ekspresji miR-134 w pierwszych 24 godzinach po zaistnieniu incydentu. Stwierdzono również zależność pomiędzy poziomem ekspresji miR-134 a stężeniem CRP i IL-6 w osoczu- znanymi markerami stanu zapalnego [73]. Dodatnia korelacja pomiędzy stężeniem cytokin prozapalnych a rozległością obszaru penumbry niedokrwiennej i nasileniem rozwijanych po dokonaniu incydentu zaburzeń zachowania była wcześniej obserwowana w badaniach na zwierzętach [51]. Wcześniejsze badania wykazały, że miR-134 promowało indukowaną urazem niedokrwinnym śmierć komórek neuronalnych poprzez wpływ na szlak z udziałem czynnika transkrypcyjnego wiążącego element odpowiedzi cAMP (CREB) oraz hamowanie ekspresji antyapoptotycznego genu Bcl-2 i czynnika neurotroficznego pochodzenia mózgowego (BDNF) [79].

Jedną z zalet, jakie daje wykorzystanie egzosomów, pęcherzyków pozakomórkowych oraz zawartych w nich miRNA jako biomarkerów chorobowych, jest możliwość ustalenia przypuszczalnej etiologii dających podobny obraz kliniczny chorób z kręgu sercowo- naczyniowych i mózgowo-naczyniowych [80]. BDNF należy do rodziny neurotroficznych czynników wzrostu, odgrywających ważną rolę w dojrzewaniu układu nerwowego, wspierając jednocześnie przeżycie istniejących neuronów, jak i inicjując neurogenezę. Jest uznawany za kluczowy biomarker o potencjale terapeutycznym w zaburzeniach neurodegeneracyjnych, jednak jego działanie na poziomie molekularnym neurogenetyki nadal jest niejasny [81,82]. Ekspresja genu BDNF indukuje syntezę białka BDNF w rybosomach poprzez ich ukierunkowane kodowanie. Narzędzia i techniki badające interakcje białko-RNA są przydatne w zrozumieniu, w jaki sposób BDNF i miRNA zachowują się w odniesieniu do procesów neurodegeneracji i neuroregeneracji. W piśmiennictwie istnieją tylko ograniczone doniesienia o badaniach mających na celu

zbadanie osi BDNF-miRNA i regulacji sygnalizacji BDNF przez egzosomy/pochodne ncRNA z pęcherzyków pozakomórkowych, potrzebne są dalsze badania w tym obszarze [83].

Inne miRNA związane z udarem niedokrwiennym mózgu opisane przez Wang i wsp. miR-21-5p i miR-30-5p były oceniane nie tylko w fazie nadostrej (w ciągu 6 h od incydentu naczyniowego) i ostrej (podzielonej na dni 1-3 i 4-7), ale także w fazie podostrej (dni 7-14) i fazie zdrowienia (dni >14 dni). Poziom ekspresji miR-21-5p był istotnie podwyższony w fazie podostrej i w okresie regeneracji w porównaniu z fazą ostrą udaru. Z kolei ekspresja miR-30a-5p była znacząco wyższa w pierwszych 6 godzinach od wystąpienia niedokrwienia w porównaniu z wszystkimi innymi obserwowanymi okresami, co więcej jej poziom był zmniejszony w okresie 1-3 dni po ostrym udarze niedokrwiennym w porównaniu z grupą kontrolą. Tak więc wydaje się, że łączna ocena poziomu ekspresji egzosomalnych miR-21-5p i miR-30a-5p może być obiecującym narzędziem w diagnozowaniu udaru niedokrwiennego i rozróżnianiu fazy nadostrej, podostrej i zdrowienia. Ponadto miR-30a-5p wydaje się być przydatnym biomarkerem w diagnostyce fazy nadostrej, co ma kluczowe znaczenie w praktyce klinicznej [84]. MiR-21 został wcześniej opisany jako związany z miażdżycą i udarem niedokrwiennym [85], gdzie mógł odgrywać rolę ochronną poprzez wpływ na zwiększenie produkcji antyapoptotycznego białka Bcl-2 [86]. Przeciwnie, miR-30a był postrzegany jako promotor apoptozy i inhibitor autofagii poprzez zmniejszenie produkcji białka Beclin-1 [87,88].

Jak wykazano w badaniach na zwierzętach, polaryzacja makrofagów może być kluczowym czynnikiem regeneracji tkanki nerwowej mózgowia po udarze niedokrwiennym. W grupie pacjentów z ostrym udarem niedokrwiennym mózgu poziom ekspresji miR-30d-5p oraz cytokin przeciwzapalnych IL-4 i IL-10 był obniżony, natomiast prozapalnych IL-1 β , IL-6, TNF- α i iNOS - podwyższony. Cytokiny prozapalne są markerami makrofagów M1, podczas gdy IL-4 i IL-10 są charakterystyczne dla alternatywnie aktywowanych makrofagów M2 zaangażowanych w wydzielanie czynników neurotroficznych. Zaproponowano więc, że miR-30d-5p może brać udział w modulacji odpowiedzi zapalnej po udarze niedokrwiennym mózgu [74].

Ponadto, dwa inne miRNA pochodzące z egzosomów- miR-125b-2-3p i miR-422a były również badane jako potencjalne interesujące biomarkery w udarze niedokrwiennym mózgu. W grupie pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu poziom obu wspomnianych miRNA był istotnie obniżony w fazie podostrej (dni 4-14 po incydencie) w porównaniu

do grupy kontrolnej składającej się ze zdrowych ochotników. Zauważono także, że ekspresja miR-422a była wyższa w fazie ostrej udaru niedokrwiennego (dni 1-3 po epizodzie niedokrwienia) aniżeli w grupie kontrolnej. Wyniki te sugerują, że oznaczenie poziomu obu omawianych miRNA może być przydatne w odróżnieniu pacjentów w podostrej fazie udaru niedokrwiennego od osób, które nie przebyły incydentu naczyniowo-mózgowego, natomiast tylko poziom miR-422a może potencjalnie służyć jako biomarker ostrego udaru niedokrwiennego [75]. W dostępnej literaturze udowodniono, iż miR-422a, uważany za jeden z najbardziej specyficznych miRNA dla mózgowia, jest jednocześnie obecny w osoczu w jednym z najwyższych poziomów spośród innych tego typu cząsteczek w ostrej fazie udaru niedokrwiennego [13]. Ulega on również obfitej ekspresji w blaszce miażdżycowej i może uczestniczyć w genetycznej regulacji procesów biorących udział w miażdżycy - jednym z kluczowych czynników prowadzących do udaru niedokrwiennego mózgu [89,90]. Rola miR-125-2-3p jest potencjalnie związana z reakcją zapalną po niedokrwiennym uszkodzeniu mózgu [91,92].

4.2. Mikrocząsteczki i inne rodzaje EV

Mikrocząsteczki to struktury pęcherzykowe uwalniane z błony plazmatycznej przez różne typy komórek, zwłaszcza płytki krwi, erytrocyty, leukocyty i komórki śródbłonka [93]. Dysfunkcja śródbłonka jest jednym z kluczowych czynników patofizjologicznych biorących udział w powstawaniu i postępie udaru niedokrwiennego mózgu. U pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu oceniono mikrocząsteczki śródbłonka i zawartego w nich miR-155 w fazie ostrej ($12 \pm 4,5$ godziny), podostrej ($8 \pm 2,3$ dni) i przewlekłej. Stwierdzono ich podwyższony poziom w ostrej i podostrej fazie udaru niedokrwiennego mózgu w porównaniu z grupą kontrolną. Ponadto, ekspresja miR-155 pochodząca z śródbłonkowych mikrocząsteczek była znacząco wyższa w fazie ostrej niż w fazie przewlekłej. Badanie wykazało ponadto pozytywną korelację pomiędzy poziomem mikrocząsteczek śródbłonkowych i zawartego w nich miR-155 a wynikiem w skali NIHSS, jak również rozległością zawału, co wskazuje na jego potencjalne przyszłe zastosowanie jako biomarkera prognostycznego. Co ciekawe, zarówno ekspresja śródbłonkowych mikrocząsteczek, jak i miR-155 była związana z typem udaru niedokrwiennego według kryteriów TOAST. Wyższe stężenia obserwowano w przypadku miażdżycy dużych tętnic i etiologii sercowo-zatorowej niż u pacjentów z udarem związanym z chorobą małych naczyń. Podsumowując, zarówno same śródbłonkowe

mikrocząsteczki, jak i te zawierające miR-155 mogą być dalej badane jako czułe biomarkery pozwalające na rozróżnienie pacjentów z udarem mózgu od pozostałych. Należy jednak podkreślić, że określenie poziomu mikrocząsteczek zawierających miR-155 miało wyższą specyficzność, a zatem lepszą wartość diagnostyczną niż określenie poziomu samych śródbłonkowych mikrocząsteczek [76]. Co ważne, wcześniejsze badania ujawniły, że miR-155 odgrywa ważną rolę w regulacji procesów związanych ze stresem oksydacyjnym i apoptozą. Jego inhibicja zmniejsza apoptozę i produkcję reaktywnych form tlenu, jak również promuje powstawanie tlenku azotu w śródbłonku mikronaczyń mózgu [94]. Wpływa też na ekspresję genów szlaków związanych z procesami zapalnymi a jego zwiększone stężenia obserwowano u pacjentów z chorobami, w których stan zapalny odgrywa niebagatelną rolę, takich jak: astma, rak płuc, białaczka limfoblastyczna, a także w chorobach neurodegeneracyjnych [95–98] (Tabela 1).

4.3. MikroRNA w różnicowaniu udaru niedokrwiennego i krwotocznego

Jak wspomniano, wykluczenie krwotoku wewnątrzczaszkowego jest ważnym krokiem w diagnostyce udaru niedokrwiennego, umożliwiającym rozpoczęcie terapii fibrynolitycznej. Kalani i wsp. wykazali, że pochodzące z EV miRNA mogą mieć potencjalną wartość diagnostyczną i być przydatne w rozróżnianiu udaru krwotocznego i niedokrwiennego. Do badania włączono 3 podgrupy pacjentów z różnymi typami udaru, w tym z udarem niedokrwiennym, krwawieniem podpajęczynówkowym wywołanym pęknięciem tętniaka i samoistnym krwotokiem śródmiąższowym. Analiza *in silico* wykazała, że 67 związanych z EV miRNA było znacząco różnych w poszczególnych podgrupach udaru. Co ważne, 13 spośród nich wykazało wysoką wartość w rozróżnianiu pomiędzy udarem niedokrwiennym i krwotocznym. Badanie pokazuje potencjalną użyteczność miRNA z krwi jako biomarkerów diagnostycznych do rozróżniania podtypów udaru [99]. Ponieważ jednak jest to wyłącznie analiza *in silico* dalsze badania *in vivo* są niezbędne aby potwierdzić przedstawione doniesienia w praktyce.

5. Aktywacja płytek krwi w patofizjologii udaru niedokrwiennego

Płytki krwi są bezjądrowymi elementami morfotycznym krwi, wywodzącymi się z megakariocytów. Ich czas życia w krążeniu obwodowym jest krótki i wynosi ok. 7-10 dni [100]. Odpowiadają za hemostazę pierwotną wiążąc się z podśródbłonkową macierzą

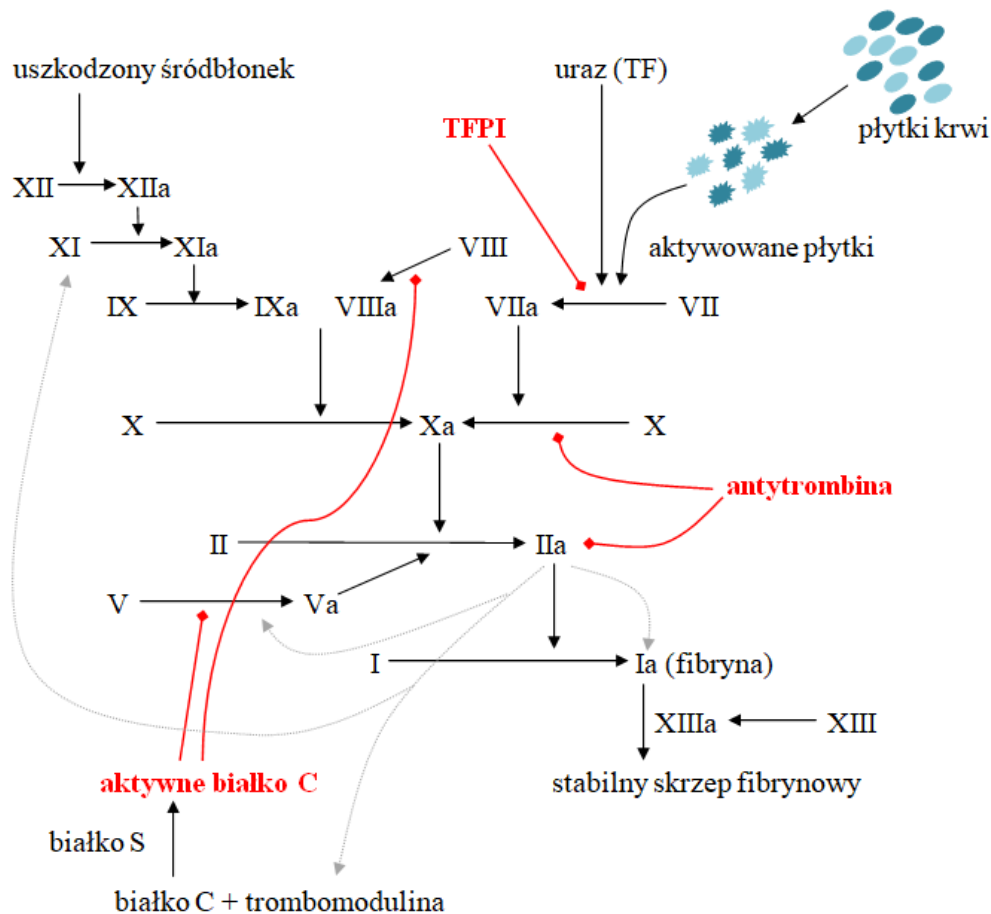
zewnątrzkomórkową odsłoniętą po uszkodzeniu naczynia. Kontakt z cząsteczkami adhezyjnymi śródbłonna odsłoniętymi po jego uszkodzeniu prowadzi do aktywacji płytek, degranulacji czyli wydzielania mediatorów zawartych w ich ziarnistościach oraz agregacji [101]. Aktywacji płytek sprzyja również interakcja pomiędzy receptorami na błonie zewnętrznej płytek a agonistami, takimi jak tromboksan A2 (TXA2), difosforan adenozyiny (ADP) i trombina [100]. Co więcej poprzez współpracę z komórkami śródbłonna i leukocytami płytki krwi są również ważnym elementem odpowiedzi zapalnej [102]. Pozbawione jąder komórkowych płytki krwi nie posiadają w naturze genomowego DNA, dlatego transkrypcja genów de novo w ich cytoplazmie opiera się na licznych miRNA, mRNA, długich niekodujących RNA oraz białkach modulujących ich ekspresję [103].

Rola płytek krwi w patofizjologii udaru niedokrwienego mózgu wydaje się być kluczowa, zarówno w kontekście tworzenia się blaszki miażdżycowej jak i okluzji naczyńia mózgowego po jej destabilizacji [15]. Receptory uczestniczące w interakcji i przekazywaniu sygnałów między płytkami krwi a innymi komórkami m.in. CD 40, P-selektyna, ligand glikoproteinowy P-selektyny, GPIb/IX/V, czy alfa IIb beta 3 integryna, odgrywają ważną rolę w inicjacji i szerzeniu się procesów zapalnych w ścianie naczyńia krwionośnego [104]. Upośledzenie funkcji śródbłonna będące podstawą rozwoju blaszki miażdżycowej wiąże się z rozwojem stanu zapalnego ściany naczyńia o niewielkim nasileniu, w wyniku którego zmniejsza się biodostępność tlenu azotu [105]. Komórki śródbłonna uszkodzone przez różne czynniki np. cholesterol LDL, wysokie stężenia glukozy czy toksyny dymu tytoniowego wydzielają czynniki prozapalne aktywujące płytki krwi. Aktywacja płytek krwi wiąże się z ich adhezją do uszkodzonego śródbłonna i degranulacją, czyli uwolnieniem cytokin, mediatorów zapalnych oraz czynników wzrostu, co prowadzi do dalszego uszkodzenia naczyńia i rozpoczyna błędne koło chorobowe. W kolejnych etapach obserwuje się migrację leukocytów, formowanie komórek piankowatych i proliferację komórek mięśni gładkich w miejscu pierwotnego uszkodzenia ściany naczyńia. Ostatecznie procesy te prowadzą do rozwoju dojrzałej blaszki miażdżycowej w różnym stopniu zamykającej światło naczyńia i upośledzającej przepływ krwi. U chorych z miażdżycą stwierdzono skrócenie czasu przeżycia trombocytów oraz zwiększoną skłonność do agregacji i nasilenia ich aktywacji [16,105,106].

Poza istotnym udziałem w inicjacji i promocji procesów odpowiedzialnych za tworzenie się blaszki miażdżycowej, płytki krwi są bezpośrednio zaangażowane w okluzję światła naczyńia po jej destabilizacji [106]. Pęknięcie blaszki powoduje

odsłonięcie kolagenu i glikoprotein macierzy śródbłonka, co z kolei jest silnym bodźcem aktywującym płytki krwi. Ich aktywacja i degranulacja prowadzi do uruchomienia kaskady krzepnięcia i wytworzenia się zakrzepu w wielu przypadkach zamykającego niemal całkowicie światło naczynia. Prowadzi to do niedokrwienia tkanek zaopatrywanych przez uszkodzone naczynie i, o ile nie są zaopatrywane przez inne źródło np. krążenie oboczne, do ich wtórnego uszkodzenia. Co ważne, hiperaktywacja i zwiększona agregacja płytek krwi obserwowana jest w obszarze całego ogniska niedokrwiennego, co może skutkować zaburzonym przepływem także przez krążenie oboczne i klinicznie - nasileniem zmian niedokrwienych [104,107].

Płytki krwi przez lata uważane za istotne wyłącznie dla krzepnięcia krwi okazują się być ważnym elementem odpowiedzi zapalnej [108]. Stymulowane przez stan zapalny aktywują się, a na ich powierzchni zwiększa się gęstość występowania receptorów takich jak CD40 czy P-selektyna, co skutkuje zwiększeniem produkcji cytokin prozapalnych. Wśród nich jedną z ważniejszych dla patofizjologii udaru niedokrwiennego jest interleukina 1 beta, a także liczne cytokiny i chemokiny wywołujące migrację, adhezję i aktywację monocytów i limfocytów w miejscu uszkodzenia śródbłonka [33,109]. Płytki krwi są zatem istotnymi mediatorami procesów zapalnych prowadzących do rozwoju miażdżycy [110]. Ponadto uwalniane przez nie receptory mogą reagować z komórkami śródbłonka, prowadząc do aktywacji metaloproteaz uszkadzających macierz tkankową, co dodatkowo nasila degradację ściany naczynia [111].



Ryc 5. Znaczenie płytek krwi i w procesie aktywacji kaskady krzepnięcia [112].

5.1. Znaczenie mikroRNA w reaktywności płytek krwi

Wykazano, że miRNA ulega obfitej ekspresji w płytkach krwi, w których znajdują się enzymy białkowe, takie jak Dicer i argonaute 2 (Ago2) uczestniczące w konwersji pochodzącego z megakariocytów pre-miRNA w dojrzałe miRNA [104,113,114]. MikroRNA odgrywają ważną rolę w regulowaniu funkcji płytek krwi i szlaków wpływających na ich reaktywność. Niektóre z omawianych cząsteczek wchodzi w interakcję z mRNA, który zawiera informację o budowie białek uczestniczących w aktywacji i agregacji płytek, i regulować w ten sposób ich ekspresję. Mimo że większość miRNA występuje wewnątrzkomórkowo, znaczna jego ilość pojawia się w przestrzeni pozakomórkowej, w tym we krwi i innych płynach ustrojowych [115]. Krążące miRNA są wykrywane w osoczu, surowicy lub pełnej krwi, co sprawia, że mogą być one wykorzystywane jako nowoczesne biomarkery w celach diagnostycznych

i prognostycznych, jak również jako nowatorskie cele terapeutyczne [8,116]. Istnieją trzy ścieżki, w jaki sposób miRNA może przedostać się do przestrzeni pozakomórkowej - pasywny wyciek z uszkodzonych komórek, aktywne wydzielanie w mikropęcherzykach, takich jak EV pochodzące z płytek krwi, lub poprzez aktywne wydzielanie na drodze zależnej od białka wiążącego RNA [117].

5.2. MikroRNA jako regulatory fizjologicznej reaktywności płytek krwi

Proces aktywacji płytek krwi, prowadzący do degranulacji, zmiany kształtu płytek i ekspresji cząsteczek powierzchniowych, zależy od interakcji licznych receptorów i szlaków biologicznych, dlatego może być modyfikowany na różne sposoby [118]. MiRNA mogą wpływać na fenotyp płytek krwi i modyfikować ich funkcję poprzez działanie na ekspresję specyficznych białek istotnych dla fizjologii płytek. Profil ekspresji MiRNA różni się pomiędzy stymulowanymi i nieaktywowanymi płytkami krwi [119]. Wcześniejsze badania wykazały liczne korelacje pomiędzy obecnością specyficznych miRNA a ekspresją białek uczestniczących w aktywacji i agregacji płytek krwi [119–121]. Warto nadmienić, iż aktywowane płytki krwi mogą wydzielać miRNA, które po internalizacji mogą wpływać na ekspresję białek w innych komórkach [122,123]. W celu omówienia wpływu leków przeciwplatekcyjnych na poziom miRNA związanego z płytkami krwi, ważne jest uwzględnienie fizjologicznych interakcji pomiędzy płytkami krwi a miRNA.

5.2.1. MikroRNA i receptory związane ze ścieżkami agregacji płytek krwi

MiR-34b-3p

Płytki krwi mogą być aktywowane poprzez receptory tromboksanowe stymulowane przez tromboksan (TxA₂), który wytwarzany jest z kwasu arachidonowego przy udziale cyklooksygenazy 1 (COX-1). COX-1 jest celem terapeutycznym kwasu acetylosalicylowego (ASA), który nieodwracalnie wiąże i inaktywuje ten enzym. W badaniach przeprowadzonych w ostatnich latach stwierdzono, że miR-34b-3p może bezpośrednio wpływać na ekspresję syntazy 1 tromboksanu A. Zahamowanie miR-34b-3p w megakariocytach zwiększyło ich żywotność i zmniejszyło ekspresję syntazy tromboksanu i tromboksanu B₂, stabilnego metabolitu tromboksanu A₂ [121].

Postulowany związek miRNA specyficznych dla płytek krwi z enzymem COX-1 wydaje się niejednoznaczny i wymaga dalszych badań.

MiR-19b-1-5p

MiR-19b-1-5p kojarzony był ze szlakiem agregacji płytek indukowanym tromboksanem. Podejrzewano, że MiR-19b-1-5p jest regulatorem szlaku sygnalizacyjnego z udziałem tlenku azotu i cyklicznego monoguanilofosforanu (NO-cGMP) co wysnuto na podstawie badań w warunkach *in silico*, podczas których stwierdzono, że oddziałuje on na ekspresję genów GUCY1A3, NOS3 i PDE5 [124]. GUCY1A3 koduje podjednostkę rozpuszczalnej cyklazy guanylowej, enzymu kluczowego dla wspomnianego szlaku NO-cGMP [125,126]. Jedną z funkcji cGMP jest hamowanie agregacji płytek krwi, dlatego wariant genetyczny GUCY1A3 związany z obniżeniem aktywności rozpuszczalnej cyklazy guanylowej i w konsekwencji upośledzeniem produkcji cGMP, zmniejszał reaktywność płytek krwi po ekspozycji na tlenek azotu [126]. Wpływ miR-19b-1-5p na aktywację płytek zależną od ścieżki NO-cGMP wymaga jednak dalszego wyjaśnienia.

MiR-223

Wykazano, że jeden z najczęściej badanych miRNA, miR-223, jest obecny w dużej zawartości w płytkach krwi i zaangażowany w regulację ich reaktywności [119,127]. Warto jednak zauważyć, że ulega on również wysokiej ekspresji w komórkach produkowanych przez układ krwiotwórczy i śródbłonek [128–130]. Niemniej jednak, wpływa bezpośrednio na region 3'UTR mRNA transkryptu P2Y12, regulując w ten sposób ekspresję receptora dla ADP odgrywającego kluczową rolę w procesie agregacji płytek krwi [127]. Ponadto aktywowane trombiną płytki uwalniają miR-223 w kompleksach z Ago2- białkiem ważnym dla działań mediowanych przez miRNA- a następnie mogą być internalizowane przez komórki śródbłonek, gdzie modyfikują ekspresję innych genów i białek [123].

MiR-126

Kolejnym miRNA ulegającym wysokiej ekspresji w płytkach krwi, które podejrzewa się o wpływ na aktywację i agregację płytek na wielu poziomach, jest miR-126. Podobnie jak miR-223, miR-126 może również odgrywać rolę w modyfikacji ekspresji receptorów P2Y12 [120,131], ale dodatkowo sugeruje się, że może on proces dojrzewania płytek krwi.

W komórkach megakarioblastycznych znaleziono zależność pomiędzy miR-126 a jego genem docelowym - ADAM9, kodującym białko potencjalnie zaangażowane w adhezję płytek krwi do kolagenu I oraz aktywację płytek indukowaną kolagenem [120,132]. Chociaż nie udowodniono udziału miR-126 w różnicowaniu ludzkich megakariocytów to ich transfekcja miR-126 powodowała wzrost ekspresji P-selektyny w strukturach płytkopodobnych po stymulacji trombiną [120,133], co wiązało się ze zwiększeniem ich właściwościami prokoagulacyjnymi i zdolnością do generowania trombiny [134]. Badania wykazały również, że miR-126-3p może bezpośrednio wpływać na gen PLXNB2, co skutkuje zmniejszeniem ekspresji białek kodowanych przez ten gen. PLXNB2 należy do rodziny pleksyn, które są receptorami dla semaforyn i odgrywają rolę w zmianach właściwości aktywności płytek krwi i tworzeniu zakrzepów. Podsumowując, miR-126 może wpływać na reaktywność płytek krwi na wielu poziomach, głównie poprzez regulację ich białek powierzchniowych [120,133].

MiR-376c

Płytki krwi mogą być aktywowane na wiele sposobów- z użyciem kilku rodzajów receptorów. Jednym z nich jest receptor aktywowany proteazą 4 (PAR4) będący receptorem błonowym dla trombiny. Analiza ontologii genów wykazała korelację pomiędzy aktywnością PAR4 a genem kodującym białko transferowe fosfatydylocholino (PTCP), które bierze udział w regulowaniu funkcji płytek krwi pod wpływem PAR4. Zaobserwowano, że zwiększona aktywacja receptorów PAR4 powodowała stymulację produkcji płytkowego PTCP. MiR-376c spowodował zahamowanie mRNA PTCP, a jego poziom był odwrotnie skorelowany z aktywnością PAR4. Ekspresja PTCP była zmniejszona dzięki zwiększonej ekspresji miR-376c [135].

MiR-96

Aktywowane płytki krwi uwalniają ziarnistości, a nadmiernie pobudzone płytki krwi wykazują wzrost stężenia synaptobrewiny (ang. vesicle associated membrane protein 8, VAMP8) - białka krytycznego dla procesu degranulacji. Stwierdzono, że MiR-96 wiąże się z regionem 3' UTR białka VAMP8, a jego nadekspresja korelowała ze spadkiem poziomu mRNA i wspomnianego białka VAMP8. Całość sugeruje zatem regulacyjną funkcję miR-96 poprzez wpływ na białko VAMP8 i wydzielanie ziarnistości [136].

MiR-15a, miR-339-3p, miR-365, miR-495, miR-98, and miR-361-3p

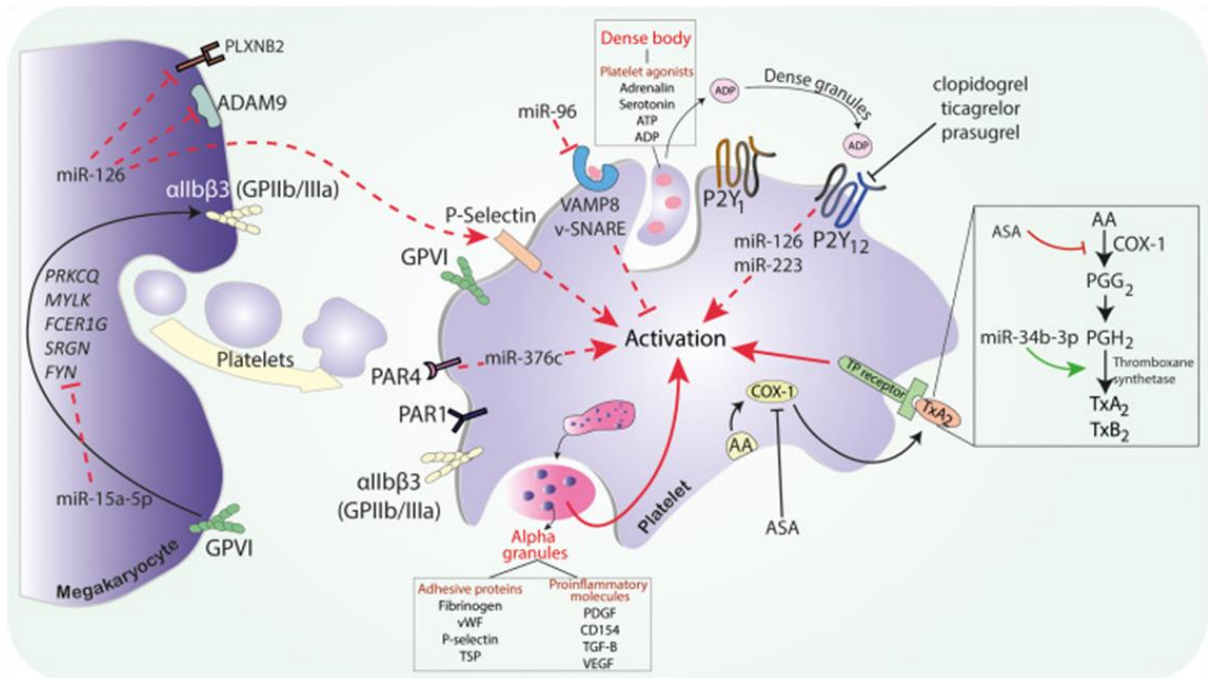
Kilka miRNA, tj. miR-15a, miR-339-3 p, miR-365, miR-495, miR-98 i miR-361-3p, zostało opisanych jako te, których występowanie jest najbardziej zmienne w płytkach krwi stymulowanych trombiną. Dalsza analiza *in silico* w celu poszukiwań ich celów molekularnych wykazała, że ekspresja najważniejszych genów ze szlaków sygnałowych neurotrofin i mTOR pozostawała w korelacji ze zidentyfikowanymi miRNA i funkcją płytek krwi [119]. Udowodniono, że kaskada mTOR odgrywa ważną rolę w pośredniczonej przez glikoproteinę GPVI agregacji płytek krwi [137]. Wykazano, że MiR-15a-5p jest bezpośrednim regulatorem pięciu genów (FYN, SRGN, FCER1G, MYLK i PRKCCQ) zaangażowanych we wspomnianą powyżej ścieżkę sygnałową GPVI, uczestniczących w aktywacji indukowanej kolagenem. Megakariocyty transfekowane miR-15a-5p wykazywały obniżoną aktywację na szlaku związanym z kolagenem i indukowanym białkiem $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, natomiast nie obserwowano zmian przy stymulacji trombiną lub ADP [138]. Konieczne są dalsze badania w celu potwierdzenia innych przewidywanych ścieżek docelowych miRNA w ludzkich płytkach krwi.

MiRNA-27b

Płytki krwi biorą udział nie tylko w utrzymaniu hemostazy, ale także w wielu innych procesach biologicznych, np. w zapaleniu, włóknieniu i angiogenezie; dlatego też niektóre inne miRNA, niezwiązane z agregacją płytek, zostały opisane w tym przeglądzie jako związane z funkcją płytek krwi. MiR-27b ulegająca ekspresji w płytkach krwi wpływa na translację proangiogennej trombospondyny 1 hamując ją. Aktywacja trombiny prowadzi do zmniejszenia ekspresji pochodzącego z płytek miR-27b, co może skutkować znacznym wzrostem indukowanej trombiną ekspresji trombospondyny w płytkach krwi. Z kolei nadekspresja miR-27b prowadzi do zwiększenia aktywności proangiogennej płytek poprzez blokowanie syntezy trombospondyny 1. Wydaje się zatem, że miR-27b może być regulatorem angiogenezy indukowanej przez płytki krwi poprzez zmianę syntezy białka w aktywowanych płytkach krwi [139].

MiRNA-320b Jak wspomniano, miRNA pochodzące z płytek krwi może regulować aktywność innych komórek. Aktywowane płytki krwi wpływały na funkcję śródbłonna poprzez wydzielanie miR-320b, opisywanego jako regulator ekspresji śródbłonkowej cząsteczki adhezji międzykomórkowej 1 [122]. Jak wspomniano, niektóre typy miRNA

mogą ulegać ekspresji w różnych typach komórek, stwierdzono, że rzezonowane mi R-320b jest również uwalniane przez komórki trzustki, keratynocyty czy komórki jajnika [140–142]. Fakt ten jest istotny przy projektowaniu badań ukierunkowanych na ocenę miRNA jako specyficznych biomarkerów. Dotychczas przedstawiono różną ekspresję szeregu miRNA i ich potencjalną korelację z wpływem na reaktywność płytek krwi, jednak ich specyficzna rola w fizjologii płytek krwi nie została jeszcze poznana (Rycina 6).



Ryc 6. Możliwy mechanizm działania miRNA w szlakach aktywacji płytek krwi [72].
Skróty: ASA, kwas acetylosalicylowy; ADAM9, domena 9 metalopeptydazy ADAM; ADP, difosforan adenozyne; ATP, trifosforan adenozyne; AA, kwas arachidonowy; COX, cyklooksyzgenaza; FCER1G, fragment Fc receptora IgE; GPIIb/IIIa, glikoproteina IIb/IIIa; miR, mikroRNA; MYLK, kinaza łańcucha lekkiego miozyny; PDGF, płytkowy czynnik wzrostu; PLXNB2, pleksyna-B2; PGG₂, prostaglandyna G₂; PGH₂, prostaglandyna H₂; PAR, receptor aktywowany przez proteazy; PRKCCQ, kinaza białkowa C theta; SRGN, serglycyna; SNARE, rozpuszczalny receptor białka mocującego NSF; SNARE, rozpuszczalny receptor białka mocującego NSF; TGF-B, transformujący czynnik wzrostu B; TSP-1, trombospondyna 1; TxA₂, tromboksan A₂; TP, receptor tromboksanu; VEGF, czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego; VAMP, białko błonowe związane z pęcherzykami; vWF, czynnik von Willebranda.

6. Założenia, cel pracy, hipotezy badawcze

W opublikowanych wcześniej przez nasz zespół badawczy analizach bioinformatycznych wykazaliśmy, że miRNA związane z płytkami krwi, w tym miR-106b-

5p, miR-16-5p, miR-15a-5p są zaangażowane zarówno w regulację reaktywności płytek krwi jak również mogą być istotne w patogenezie chorób towarzyszących, w tym chorób sercowo-naczyniowych i naczyniowo-mózgowych [17,72]. Wykazano także, że rodzina let-7e oraz miR-125a mają duży potencjał jako biomarkery dostępne do oceny we krwi obwodowej u pacjentów z udarem niedokrwiennym [143,144]. Opisane poniżej badanie miało na celu ocenę ekspresji wybranych krążących we krwi pełnej miRNA (miR-106b-5p, miR-16-5p, miR-15a-5p, let-7e oraz miR-125a-3p i -5p) i analizie ich przydatności diagnostycznej i prognostycznej u pacjentów z ostrym udarem niedokrwiennym. Hipoteza badawcza skupia się na zwiększonej aktywności płytek krwi w momencie dokonania udaru, prowadzącej do ich degranulacji i uwolnienia wielu mediatorów zapalnych, czynników wzrostu, krzepnięcia i fibrynolizy jak również miRNA. Porównanie ekspresji wybranych miRNA w ostrej fazie udaru ma na celu ocenę ich przydatności diagnostycznej, w krótkiej obserwacji można ocenić także przewidywaną wartość prognostyczną.

Do szczegółowych celów badania należały:

- ustalenie czy ekspresja wybranych miRNA określonych uprzednio w badaniach *in silico* jako związane z udarem niedokrwiennym oraz funkcją płytek krwi lub procesami krzepnięcia (miR-106b-5p, miR-16-5p, miR-15a-5p, let-7e oraz miR-125a-3p i -5p) jest zmieniona u chorych w ostrej fazie udaru niedokrwiennego w porównaniu z populacją bez udaru;
- ocena ekspresji miR-106b-5p, miR-16-5p, miR-15a-5p, let-7e oraz miR-125a-3p i -5p pod kątem przydatności klinicznej jako biomarkery diagnostyczne udaru niedokrwiennego;
- analiza ekspresji miR-106b-5p, miR-16-5p, miR-15a-5p, let-7e oraz miR-125a-3p i -5p pod kątem przydatności prognostycznej w krótkoterminowej, 7-dniowej obserwacji;

6.1. Materiał i metody

6.1.1. Ocena kliniczna pacjentów włączonych do badania

Protokół badania, zaprojektowany zgodnie z Deklaracją Helsińską oraz formularz świadomej zgody z informacją dla pacjenta zostały zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie. Świadomą pisemną zgodę uzyskano od wszystkich pacjentów zakwalifikowanych do badania. Populacja badana składała się z 60 chorych z rozpoznaniem ostrego udaru niedokrwiennego mózgu na

podstawie objawów klinicznych zgodnie z definicją Światowej Organizacji Zdrowia. Rozpoznanie wstępne postawione na podstawie badania podmiotowego i przedmiotowego internistycznego i neurologicznego było w każdym przypadku poparte badaniami obrazowymi mózgu (TK lub MRI) [145]. Na podstawie klasyfikacji TOAST włączyliśmy: (i) wszystkich pacjentów z udarem niedokrwiennym spowodowanym miażdżycą dużych naczyń oraz (ii) podgrupę pacjentów sklasyfikowanych jako osoby z udarem niedokrwiennym o nieznannej etiologii, pod warunkiem że mieli co najmniej 50% zwężenie tętnicy szyjnej ipsilateralnej w stosunku do strony zawału oraz brak rozpoznania lub wywiadu w kierunku migotania przedsionków. Takie podejście pozwoliło nie stracić przypadków udarów z leżącą u ich podłoża wyraźną miażdżycą tętnic szyjnych, która nie była na tyle istotna, aby uznać ją za jedyną przyczynę udaru (jak podaje się w TOAST) [24]. Rutynowo wykonywano obrazowanie Duplex Doppler tętnic szyjnych oraz 24-h monitorowanie EKG metodą Holtera. Oceny ciężkości udaru dokonano na podstawie skali NIHSS.

Z badania wykluczono pacjentów dodatnim wywiadem w kierunku udaru mózgu, okluzji tętnic obwodowych lub choroby nowotworowej.

Grupę kontrolną stanowiło 30 dobranych pod względem wieku i płci pacjentów wolnych od udaru mózgu z licznymi czynnikami ryzyka choroby sercowo- naczyniowej lub obecną chorobą wieńcową.

6.1.2. Pobieranie i opracowanie próbek

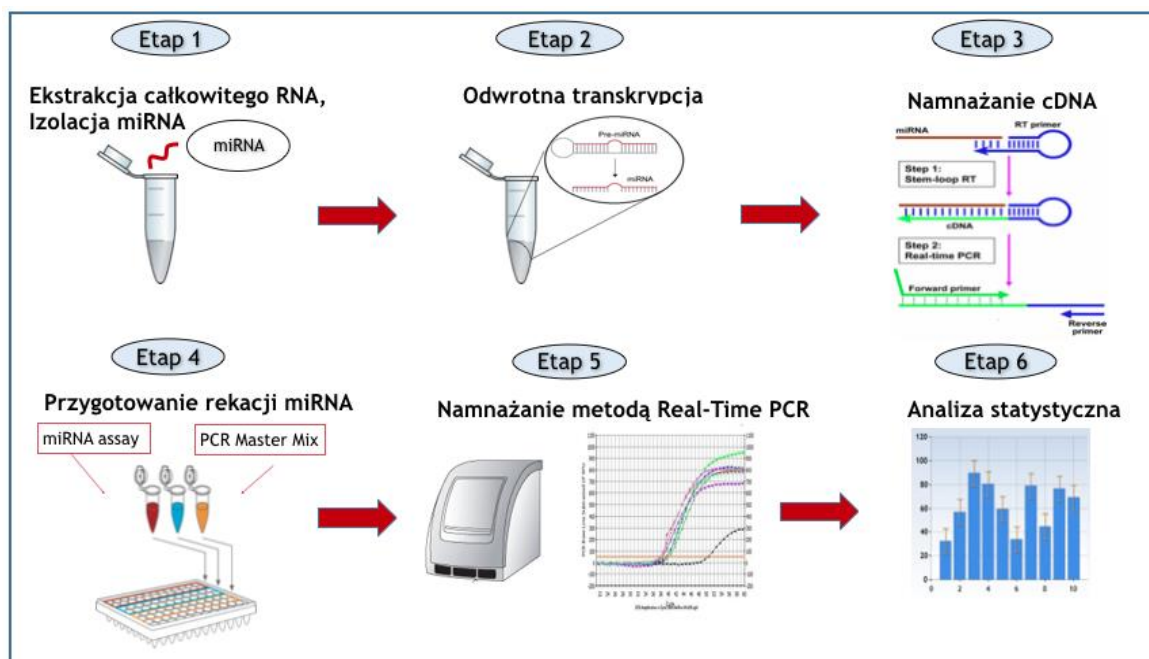
Pełna krew żylna została pobrana od pacjentów (a) w ciągu 24 godzin od początku objawów udaru niedokrwiennego (b) w 7. dobie hospitalizacji. Od każdego uczestnika pobrano około 5 ml próbek krwi żyłnej do probówek Tempus blood RNA (Thermofisher) i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu wykonania analiz laboratoryjnych. Próbkę krwi od pacjentów z udarem niedokrwiennym były pobierane w ciągu 12 h od przyjęcia do szpitala.

6.1.3. Metody molekularne

MiR-106b-5p, miR-16-5p, miR-15a-5 zostały wybrane na podstawie analizy bioinformatycznej, opublikowanej wcześniej przez nasz zespół [17,72]. Let-7e oraz miR-125a-3p i -5p zostały natomiast wybrane na podstawie wcześniejszych ważnych

publikacji [143,144]. RNA z krwi pełnej ekstrahowano za pomocą zestawu Tempus™ Spin RNA Isolation Kit (Thermofisher). Całkowite RNA otrzymane w sposób przedstawiony powyżej rozcieńczono dziesięciokrotnie. Rozcieńczone RNA (5 μ L) poddano odwrotnej transkrypcji przy użyciu zestawu TaqMan miRNA Reverse Transcription (ABI) zgodnie z instrukcjami producenta. Następnie 3 μ L produktu wykorzystano do wykrycia ekspresji miRNA metodą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy przy użyciu zestawów TaqMan miRNA Assay (ABI) dla odpowiednich miRNA na aparacie The CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad Inc. Hercules, California, USA). cel-miR-39 dodano jako kontrolę spike-in. Opis przebiegu metod molekularnych przedstawiono na Rycinie 7.

Reakcje prowadzono trzykrotnie, a do wszystkich analiz używano wartości średniej, aby kontrolować zmienność związaną z przyczynami metodologicznymi. Poziomy ekspresji miRNA były normalizowane do stężenia cel-miR-39 i obliczane przy użyciu równania $2^{-\Delta Ct}$, gdzie $\Delta Ct = \text{próg cyklu (Ct) (miRNA)} - \text{Ct (cel-miR-39)}$.



Ryc 7. Opis przebiegu metod molekularnych.

6.1.4. Analiza statystyczna

Wszystkie wyniki dla zmiennych kategoriycznych przedstawiono jako liczbę i procent. Zmienne ciągłe wyrażono jako średnią \pm odchylenie standardowe (SD) lub medianę i zakres międzykwartyłowy (IQR), w zależności od normalności rozkładu ocenianej

za pomocą testu Shapiro-Wilka. Pomiedzy danymi dychotomicznymi stosowano test Chi- kwadrat. Test t-Studenta lub test Manna-Whitneya dla próbek niesparowanych oraz test Wilcoxon dla próbek sparowanych, stosowano w zależności od normalności rozkładu. Testy Kruskala-Wallisa stosowano do porównania więcej niż dwóch grup. Przeprowadzono analizę ROC (Receiver Operating Characteristics) w celu oceny wartości diagnostycznej miR-125a-3p i -5p oraz wartości predykcyjnej miR-16-5p dla ciężkości udaru mózgu. W celu określenia zmiennych niezależnych wpływających na zwiększenie ciężkości udaru mózgu zastosowano wieloczynnikową analizę regresji logistycznej. W tym celu uwzględniono następujące zmienne: wysoka ekspresja miR-16-5p (>10,6 ekspresji na podstawie danych log-transformowanych), wiek (lata), płeć żeńska, palenie tytoniu, nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, MI, choroba wieńcowa. Wszystkie testy były dwustronne z poziomem istotności $p < 0,05$. Obliczenia wykonano przy użyciu programu SPSS w wersji 22.0 (IBM Corporation, Chicago, USA). Na podstawie ..% zwiększonego nasilenia udaru mózgu w grupie o wysokim wyjściowym miR-16-5p w porównaniu z ..% zwiększonego udaru mózgu w grupie o niskim wyjściowym miR-16-5p obliczono, że przy ... pacjentów nasza analiza miała 99% mocy przy dwustronnej wartości alfa $p < 0,05$.

6.2. Wyniki

6.2.1. Uczestnicy

Charakterystykę pacjentów przedstawiono w tabeli 1. Do chorób układu krążenia zaliczono chorobę wieńcową, zawał serca w wywiadzie oraz cukrzycę typu 2. Nie zaobserwowano różnic pomiędzy osobami zdrowymi a pacjentami z udarem niedokrwinnym mózgu w zakresie podstawowych danych demograficznych, w tym płci, wieku i wskaźnika masy ciała (BMI) (odpowiednio $p = 0,176$, $p = 0,724$, $p = 0,125$). Wśród 60 włączonych do badania pacjentów 6 (10%) osób, które zostały przyjęte na oddział intensywnej terapii (OIT), zmarło w ciągu mediany 3 dni.

Tabela 2. Charakterystyka uczestników

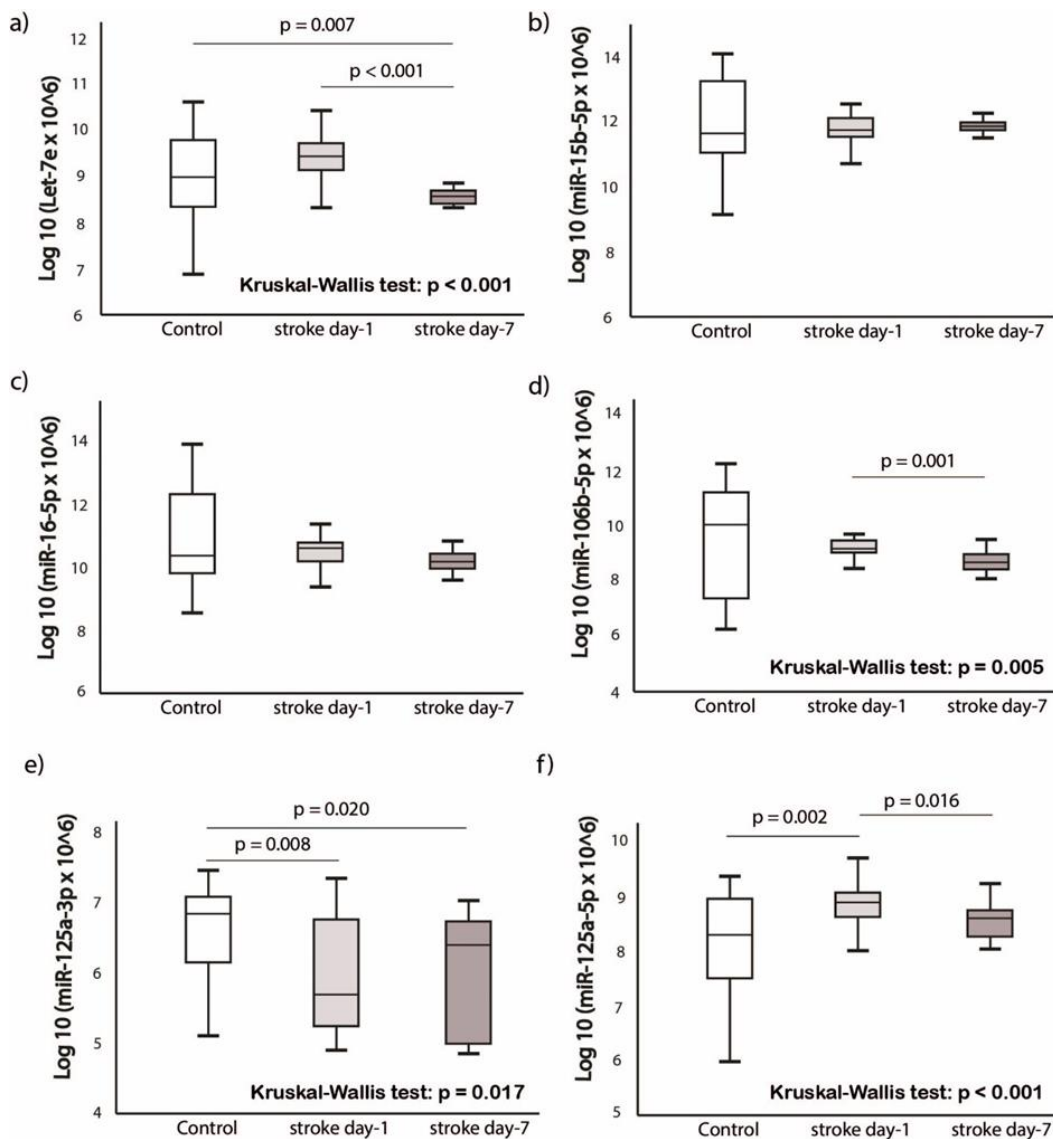
	Grupa kontrolna (n=30)	Grupa badana (n=60)	P
Płeć (męska)	14 (47%)	37 (62%)	0,176

Wiek	70,90 ± 8,6	71,72 ± 11,0	0,724
BMI	28,7 ± 4,1	27,4 ± 4,7	0,125
Nadciśnienie	19 (63,3%)	39 (65%)	0,876
Niewydolność serca	3 (10%)	7 (11,7%)	0,813
Choroba wieńcowa	4 (13%)	12 (20%)	0,436
Migotanie przedsionków	-	3 (5%)	-
Stan po zawale serca	3 (10%)	8 (13,3%)	0,649
Cukrzyca	11 (36%)	19 (32%)	0,635
Nikotynizm	4 (13%)	16 (30%)	0,093
Cholesterol całkowity	154,5 ± 31,2	173,5 ± 40	0,156
Triglicerydy	138,3 ± 57,1	124,7 ± 50,7	0,445
NIHSS przy przyjęciu	-	-	-
(1-4)		53 (88%)	
(5-15)		7 (12%)	
(16-25)		-	
NIHSS w 7. dobie	-	-	-
(1-4)		28 (47%)	
(5-15)		30 (50%)	
(16-25)		2 (3%)	

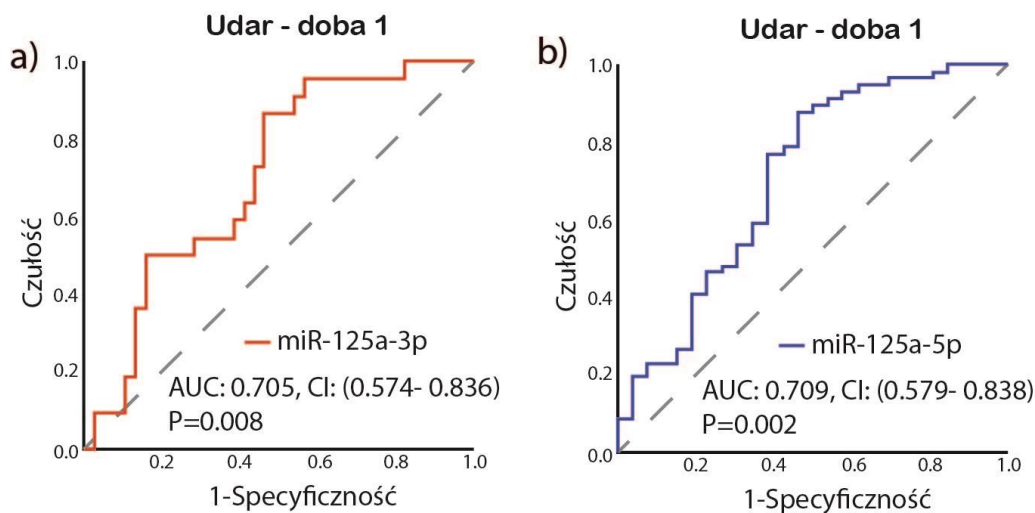
Dane przedstawiono w postaci liczby i procentu lub średniej i odchylenia standardowego. Stosowano odpowiednio test t-Studenta lub test Chi kwadrat.

6.2.2. Zmiana ekspresji krążących miRNA związanych z płytkami krwi oraz wartość diagnostyczna miR-125a-3p i -5p

Rycina 8. przedstawia porównanie względnej ekspresji krążących miRNA pomiędzy pacjentami z udarem niedokrwiennym mózgu a grupą kontrolną w dwóch różnych punktach czasowych (przy przyjęciu i w 7. dobie hospitalizacji). Poziom ekspresji miR-125a-3p u pacjentów z udarem był niższy zarówno przy przyjęciu do szpitala, jak i 7 dni po nim w porównaniu z osobami zdrowymi (odpowiednio $p=0,008$, $p=0,020$). Przeciwnie, ekspresja miR-125a-5p była wyższa u chorych przy przyjęciu w porównaniu z grupą kontrolną, jednak w trakcie hospitalizacji uległa istotnej redukcji, co zaobserwowano w 7. dobie w porównaniu z dniem przyjęcia (odpowiednio $p=0,002$, $p=0,016$). Ekspresja Let-7e była istotnie wyższa u osób zdrowych w porównaniu z pacjentami z udarem mózgu, zarówno w dniu przyjęcia do szpitala jak i w dniu 7. (odpowiednio $p=0,007$, $p<0,001$). Wartość diagnostyczną wyjściowych pomiarów ekspresji miR-125a-3p (ryc. 2a) i miR-125a-5p (ryc. 2b) oceniono za pomocą analizy krzywej operacyjnej (ROC). Pole pod krzywą ROC dla miR-125a-3p wynosiło 0,705 (95% CI, 0,57-0,84) $p=0,008$, natomiast dla miR-125a-5p - 0,709 (95% CI, 0,58-0,84) $p=0,002$. Analiza krzywej ROC nie wykazała potencjału diagnostycznego dla pozostałych badanych miRNA (dane nie pokazane).



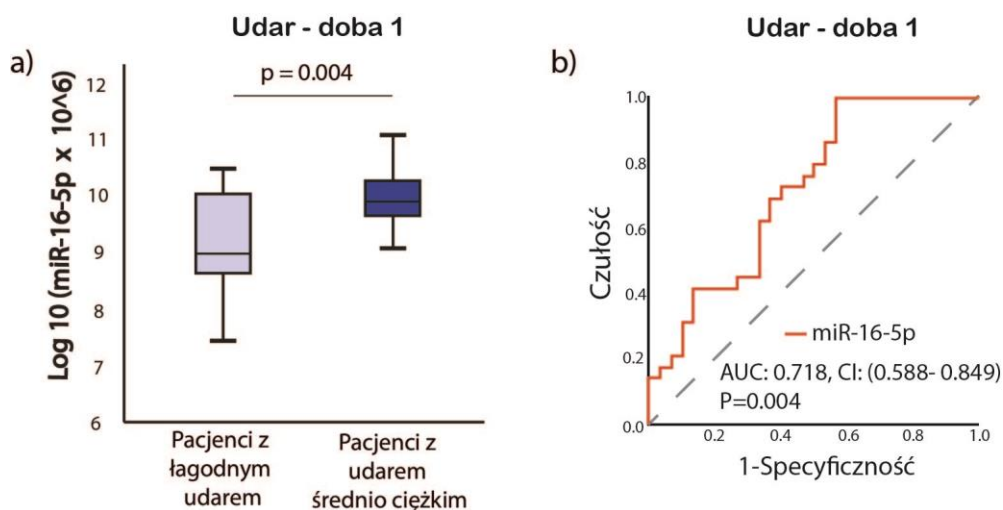
Ryc. 8. Zmiany ekspresji miRNA wśród grup (a) Let-7e; (b) miR-15b-5p; (c) miR-16-5p; (d) miR-106b-5p; (e) miR-125a-3p; (f) miR-125a-5p. Odpowiednio zastosowano test U Manna-Whitneya i test Wilcoxon. Test Kruskala-Wallisa pokazuje różnice pomiędzy trzema grupami. Pokazano tylko statystycznie istotne wartości pomiędzy grupami (tj. $p \leq 0,05$).



Rycina 9. Wartość diagnostyczna miRNA określona za pomocą analizy krzywej ROC. (a) miR-125a-3p w dniu udaru; (b) miR-125a-5p w dniu udaru.

6.2.3. Wysoka wyjściowa ekspresja miR-16-5p u pacjentów z udarem niedokrwiennym wiąże się z większą ciężkością udaru

W grupie pacjentów z udarem mózgu 30 osób (50%) prezentowało łagodny, a 29 osób (48%) umiarkowany udar w chwili przyjęcia do szpitala. W dniu, w którym wystąpił udar niedokrwienny, pacjenci z umiarkowanym udarem mieli istotnie podwyższony poziom ekspresji miR-16-5p w porównaniu z pacjentami z udarem łagodnym w dniu wystąpienia ostrego udaru niedokrwiennego. AUC w analizie krzywej ROC wynosiło 0,718, (95% CI, 0,59-0,85) $p = 0,004$ (ryc. 3). Grupę pacjentów z udarem niedokrwiennym podzielono na dwie podgrupy, stosując analizę krzywej ROC (na podstawie ciężkości udaru) dla miR-16-5p, tj. o niskiej lub wysokiej wartości (rycina 3 i tabela 2). Wartość odcięcia $\leq 10,6$ oznaczono jako niski poziom miR-16-5p (47% populacji). Czułość i specyficzność wynosiły dla tej wartości odcięcia odpowiednio 68% i 65%. Wszystkie pozostałe analizowane miRNA nie wykazywały statystycznie istotnej przydatności predykcyjnej dla zwiększenia ciężkości udaru mózgu na podstawie analizy krzywej ROC (dane nie pokazane). Według wieloczynnikowego modelu regresji logistycznej wysoka wyjściowa ekspresja miR-16-5p wraz z cukrzycą (DM) były niezależnymi predyktorami zwiększonej ciężkości udaru (OR: 4,34; 95% CI, 1,15-16,42; $p = 0,031$ i OR: 4,65; 95% CI, 1,07-20,19; $p = 0,040$, odpowiednio) (tab. 3).



Rycina 10. Różnica w ekspresji miR-16-5p na podstawie ciężkości udaru na linii podstawowej. (a) wykres pudełkowy miR-16-5p; (b) krzywa ROC miR-16-5p dla ciężkości udaru. Początkowa ciężkość udaru mierzona wg skali NIHSS przy przyjęciu. Niewielki udar: 1-4 (n = 30) i umiarkowany udar: 5-15 (n = 29).

Tabela 3. Szacunki statystyczne dotyczące przewidywania zwiększonej ciężkości udaru mózgu przez wyjściową ekspresję miR-16-5p.

miRNA	AUC (95% CI)	P	Cut-off	czułość	specyficzność	PPV	NPV	Prawdo podobieństwo testu pozytywnego
Wysoka wyjściowa ekspresja miR-16-5p vs niska miR-16-5p	0,718 (0,588-0,849)	0,004	10,5915*	68%	65%	63%	69%	1,88

* Do określenia wartości odcięcia użyto danych poddanych transformacji log10.

Tabela 4. Wieloczynnikowy model regresji logistycznej dla przewidywania zwiększonej ciężkości udaru mózgu przez wyjściowy wysoki poziom ekspresji miR-16-5p.

	OR	95% CI		P
		Górny	Dolny	
Wysoka wyjściowa ekspresja miR-16-5p	4,341	1,147	16,422	0,031
Płeć (żeńską)	0,600	0,139	2,596	0,494
Wiek (lata)	1,023	0,956	1,194	0,513
Nikotynizm	1,314	0,239	7,509	0,739
Cukrzyca	4,653	1,073	20,185	0,040
Zawał serca w wywiadzie	0,657	0,049	8,730	0,750
Nadciśnienie tętnicze	1,133	0,280	4,591	0,861
Choroba niedokrwienna serca	1,996	0,208	19,150	0,549

Pogrubioną czcionką zaznaczono wartości istotne statystycznie ($p < 0.05$).

6.3. Dyskusja

Jak pokazują przeprowadzone dotychczas badania, liczne rodzaje miRNA biorą udział w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych w organizmie człowieka. Opisano wiele różnych miRNA, wiadomo także że jeden jego typ może regulować jednocześnie ekspresję różnych genów na terenie różnych rodzajów komórek. Fakty te świadczą o ogromnym bogactwie biologicznej wiedzy, którą możemy zdobyć badając miRNA, a jednocześnie stanowią wielkie wyzwanie dla badaczy z uwagi na wielką ilość danych i zmiennych, które należy przeanalizować aby dojść do jednoznacznych wniosków. W dobie cyfryzacji pomocnym narzędziem okazują się analizy *in silico* wykorzystane również do zaprojektowania przedstawionego powyżej badania. Być może w niedalekiej przyszłości powszechne stanie się wykorzystanie sztucznej inteligencji o zdolnościach

analitycznych wielokrotnie większych niż niewielki zespół naukowców. Aby jednak rozwój wiedzy na temat niekodujących RNA, w tym miRNA był możliwy potrzebna jest walidacja wyników takich analiz w badaniach na żywych organizmach, a w przypadku potencjalnej przydatności w medycynie także wnikliwa ocena realnej użyteczności klinicznej. Jak wspomniano, liczne rodzaje miRNA mogą pełnić istotną rolę w procesach patofizjologicznych leżących u podstawy udaru niedokrwiennego mózgu. Co więcej, niektóre krążące miRNA już zostały zidentyfikowane jako potencjalne biomarkery chorób sercowo-naczyniowych i mózgowo-naczyniowych. Niniejsze badanie wykazało, że poziomy ekspresji krążących miR-16-5p, let-7e i miR-125a-5p były podwyższone, podczas gdy miR-106b-5p i miR-125a-3p były obniżone w ostrej fazie udaru niedokrwiennego. Badane miRNA były uprzednio wytypowane w analizach bioinformatycznych jako istotne dla udaru niedokrwiennego i związane z płytkami krwi i procesami krzepnięcia.

MikroRNA-16-5p oceniano wcześniej u pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu, u których wykazano jego potencjalną wartość diagnostyczną i prognostyczną [146–149]. W badaniu przeprowadzonym przez Wu i wsp. ekspresja krążącego miR-16 w pierwszym dniu po rozpoznaniu udaru niedokrwiennego mózgu była zwiększona ponad 8-krotnie w porównaniu z grupą kontrolną bez udaru. Ekspresja miR-16 w surowicy nie okazała się jednak czynnikiem niezależnym i wykazywała silną ujemną korelację ze stężeniem cholesterolu HDL i ApoA1 oraz dodatnią z wiekiem. Ta obserwacja może wskazywać na niską swoistość miR-16 jako samodzielnego biomarkera udaru niedokrwiennego. Występowanie wspomnianych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego jest powszechne nie tylko w populacji osób z udarem mózgu, ale także u innych pacjentów z chorobami układu krążenia. Autorzy badania sugerują, że poprawę swoistości można osiągnąć oceniając cały panel miRNA związanych z udarem, w skład którego wchodziłoby także miR-16 [146]. Tian i wsp. ujawnili, że stężenia miR-16 we krwi obwodowej w fazie nadostrej udaru są zależne od etiologii. Ich pomiar charakteryzował się największą czułością i specyficnością w wykrywaniu udaru związanego z miażdżycą dużych tętnic. W ogólnej populacji pacjentów z udarem niedokrwiennym wyższe poziomy ekspresji miR-16 w fazie nadostrej były związane z gorszym rokowaniem [147]. W innym badaniu wykazano, że miR-16 może być potencjalnie przydatny do różnicowania między udarem niedokrwiennym a krwotocznym, zwłaszcza w połączeniu z oceną miR-124-3p. U chorych z udarem niedokrwiennym mózgu ekspresja miR-16 była zwiększona, natomiast miR-124-3p zmniejszona. Odwrotna sytuacja miała miejsce w grupie pacjentów z udarem

krwotocznym [149]. Tak więc miR-16 może w przyszłości służyć jako biomarker diagnostyczny i prognostyczny, ale jak wynika z poprzednich badań, raczej jako część panelu złożonego z różnych miRNA niż indywidualnie. Rola miR-16-5p w patofizjologii udaru niedokrwiennego mózgu nadal pozostaje niejasna. Ujawniono, że może ono być związane z ekspresją receptora adiponektyny 2 (AdipoR2) obficie występującego w tkance nerwowej i uczestniczyć w aktywacji receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów γ (PPAR γ) [150]. PPAR γ modyfikuje procesy zapalne, a jego nadekspresja tłumiała stan zapalny uszkodzonej tkanki nerwowej u szczurów z niedokrwieniem mózgu [151]. Huang i wsp. opisali circ_0000831 - nowy rodzaj krążącego RNA wytypowany w badaniu metodą sekwencjonowania. Wykazali także, że RNA circ_0000831 obniża stężenie miR-16-5p oraz zmniejsza nasilenie stanu zapalnego i hamuje apoptozę mikrogleju poddanego OGD/R. Oś circ_0000831/miR-16-5p/AdipoR2 może być zatem ważnym szlakiem sygnałowym w patofizjologii udaru niedokrwiennego [150]. Co więcej miR-16-5p i miR-125-5p były zawarte w pochodzących z astrocytów pęcherzykach pozakomórkowych uwalnianych w odpowiedzi na cytokiny prozapalne IL-1 i TNF α . Wykazano, że oba miRNA mogą hamować transkrypcję genów zaangażowanych w szlak sygnałowy neurotrofin, a mianowicie NTKR3 i Bcl2. Zahamowanie NTKR3/Bcl2 w neuronach wiązało się ze spowolnieniem wzrostu i zmniejszeniem złożoności dendrytów oraz osłabieniem ich pobudliwości [152]. Ponadto, NTRK3 może aktywować czynnik transkrypcyjny CREB i w ten sposób regulować ekspresję genów promujących przeżycie i różnicowanie neuronów [153]. Tak więc miR-16-5p może być wydzielany w pęcherzykach pozakomórkowych w odpowiedzi na uszkodzenie tkanki nerwowej i jest zaangażowany w ochronę neuronów po uszkodzeniu. Zmienioną ekspresję miR-16 zaobserwowano również w innych chorobach związanych z degradacją neuronów, np. w stwardnieniu zanikowym bocznym [154], chorobie Alzheimer'a [155] i chorobie Creutzfeldta-Jakoba [156]. Zgodnie z naszymi wcześniejszymi wynikami miR-16-5p znajduje się w czołówce miRNA związanych z reaktywnością płytek krwi [17]. Ponieważ aktywacja układu krzepnięcia jest jednym z głównych mechanizmów prowadzących do okluzji naczyń mózgowych i niedokrwienia, rola płytek krwi powinna być dokładnie zbadana, zwłaszcza że po aktywacji mogą one wydzielać cząsteczki, takie jak miRNA, które są internalizowane przez komórki i wpływają na ekspresję genów na ich terenie, a przez to na zmianę ich funkcji [72].

Mimo że w prezentowanym badaniu nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji miR-106b-5p między grupą pacjentów z udarem a grupą kontrolną, zaobserwowano niewielkiej spadek w trakcie ostrej fazy udaru. Znaczenie tej obserwacji pozostaje niejasne. Przegląd systematyczny skoncentrowany na miRNA jako biomarkerach wskazuje na istotność zmian ekspresji miR-106b-5p w ostrej fazie udaru mózgu, ale szczegółowe wyniki włączonych do przeglądu prac są sprzeczne [157]. Niezależnie od tego, wyciszenie miR-106b-5p zmniejszyło objętość zawału i zredukowało deficyty neurologiczne w szczurzym modelu udaru niedokrwiennego, wskazując na jego istotny udział w patofizjologii udaru [158].

MikroRNA-125a-5p było wcześniej badane jako obiecujący biomarker udaru niedokrwiennego dostępny do oceny we krwi obwodowej. Wykazano, że krążące miR-125a-5p miało wysoką specyficzność i czułość w odróżnianiu pacjentów z udarem niedokrwiennym od grupy kontrolnej. W połączeniu z dwoma innymi miRNA związanymi z udarem, czułość była większa niż w multimodalnej tomografii komputerowej. Źródłem miR-125a-5p nie jest jednak tkanka nerwowa, lecz płytki krwi, dlatego na jego ekspresję mogą wpływać zmiany liczby płytek krwi i terapia przeciwplatekowa [145]. W eksperymentalnym modelu bariery krew-mózg nadekspresja miR-125a-5p w komórkach śródbłonna była związana z obecnością grubszych i bardziej stabilnych kompleksów łączących śródbłonną kadherynę i zona occludens-1, czyli tworzeniem się bardziej stabilnej bariery [159]. Jednocześnie podane doguzowo miR-125a-5p może ograniczać patologiczną angiogenezę nowotworową przez hamowanie translacji śródbłonnej kadheryny [160]. Badania wykazały, że ekspresja miR-125-5p jest zwiększona w komórkach mikrogleju po deprywacji/reoksygenacji tlenowo-glukozowej *in vitro*, jak również w osoczu szczurów z udarem niedokrwiennym wywołanym przez okluzję tętnicy środkowej mózgu. Ponadto, zahamowanie miR-125-5p powodowało zmniejszenie nasilenia apoptozy mikrogleju poprzez ukierunkowanie na białko wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu 3 (IGFBP3) [161]. Rola miR-125a-3p w patofizjologii udaru niedokrwiennego mózgu nie została dotychczas opisana. Jednak w modelu zwierzęcym wykazano, że ekspresja miR-125a-3p w ostrej fazie udaru zwiększa się w pierwszej dobie po podaniu rekombinowanego tkankowego aktywatora plazminogenu, który jest standardowym sposobem leczenia udaru niedokrwiennego [162].

Jak wspomniano, ogromna liczba rodzajów miRNA i mnogość stanów fizjologicznych i patologicznych, w których mogą one pełnić istotną rolę poprzez regulację transkrypcji genów jest wyzwaniem dla badaczy. Dlatego tak trudna jest jednoznaczna ocena czy w rzeczywistości klinicznej istnieje miejsce dla miRNA jako biomarkerów udaru niedokrwiennego i innych chorób neurologicznych, onkologicznych itd. Z pewnością spełniają one podstawowe cechy umożliwiające wykorzystanie w praktyce – są łatwo dostępne, można je oceniać wykorzystując próbki krwi obwodowej będącej chyba najbardziej powszechnym materiałem diagnostycznym. Charakteryzują się wysoką stabilnością, w odpowiednich warunkach mogą być transportowane i przechowywane przez długi czas. MiRNA wykazują się zmienioną ekspresją w różnych stanach chorobowych, a po lepszym poznaniu dokładnej funkcji konkretnych rodzajów miRNA prawdopodobnie mogą służyć do bardzo dokładnej oceny patomechanizmu zmian chorobowych u konkretnego pacjenta. W tej chwili wyzwaniem stanowi jednak brak wystandaryzowanych testów i brak znajomości parametrów ekspresji miRNA w zdrowej populacji. Zdobywanie takiej wiedzy wymagałoby przeprowadzenia dużych badań na grupach osób zdrowych w celu określenia zakresu stężeń wybranych miRNA w warunkach fizjologicznych. Wartości te posłużyłyby dopiero do porównania wyników uzyskanych z próbek pobranych od pacjentów. Ponadto, obecnie do oceny ekspresji miRNA wykorzystuje się szereg metod opartych na różnych odczynnikach i różnym sprzęcie od różnych producentów., co sprawia, że wyniki uzyskiwane w różnych ośrodkach mogą być między sobą nieporównywalne. Dla wiarygodnej analizy porównawczej metody te powinny zostać wystandaryzowane, tak aby zminimalizować ryzyko wpływu zastosowanego sposobu analizy laboratoryjnej na ostateczny wynik [163,164].

W niniejszej pracy badano potencjał wybranych miRNA jako biomarkerów diagnostycznych w udarze niedokrwinnym. Zdecydowanie największą trudnością do pokonania w procesie tworzenia metod diagnostycznych w tym schorzeniu jest czas, w którym powinno dojść do rozpoznania. Fakt, że w realiach klinicznych na rozpoznanie udaru i rozpoczęcie leczenia mamy często kilkadziesiąt minut, rzadziej 2 lub 3 godziny praktycznie eliminuje miRNA z takiego wykorzystania [164]. Przy zastosowaniu obecnych metod laboratoryjnych przeprowadzenie analizy próbek od niewielkiej grupy pacjentów opisanych powyżej zajęło kilka dni. Wykorzystanie większej liczby urządzeń automatycznych albo przeprowadzenie prac laboratoryjnych przez większą grupę pracowników mogłoby skrócić ten czas realnie do około doby. Niestety wciąż jest

to niewystarczające, aby skutecznie diagnozować pacjentów z udarem niedokrwienym dając im szansę na leczenie. Wydaje się jednak, że przy obecnym postępie technik związanych z badaniem i obróbką materiału genetycznego, przyspieszonym dodatkowo podczas pandemii COVID-19 możemy liczyć na rozwój nowych, o wiele szybszych metod. Już dziś dostępne są przyłóżkowe testy genetyczne wykrywające niektóre mutacje, być może pewnego dnia powstaną także testy zdolne do szybkiego wykrywania wybranych miRNA [165].

Oprócz trudności związanych z czasochłonnymi technikami laboratoryjnymi poważnym ograniczeniem jest wielość miRNA i znaczna ilość regulowanych przez nie reakcji fizjologicznych i patologicznych. Wykazano, że jeden rodzaj miRNA może być regulatorem transkrypcji kilku genów i przez to brać udział w różnych procesach. Dobrym przykładem może być wspomniane już wcześniej miR-223 regulujące transkrypcję co najmniej kilkunastu genów istotnych dla rozwoju odpowiedzi zapalnej oraz biorących udział w kancerogenezie [129]. W związku z tym próba wytypowania jednego rodzaju miRNA będącego dobrym biomarkerem udaru niedokrwienego wydaje się być bezcelowa. Dużo skuteczniejsze mogłoby być stworzenie panelu różnych miRNA, być może wzbogaconego o inne rodzaje ncRNA i inne cząsteczki o wzorcu ekspresji charakterystycznym dla udaru niedokrwienego. Do powstania takiego złożonego testu potrzebny jest w pierwszej kolejności szereg badań podobnych do przedstawionego powyżej – opartych na analizach literatury bądź *in silico* z walidacją w grupach pacjentów. Kolejnym etapem byłoby przeprowadzenie większych badań z zastosowaniem panelu wybranych eksperymentalnie cząsteczek a następnie określenie norm populacyjnych [72,165].

Nieco łatwiejsze wydaje się wykorzystanie miRNA jako biomarkera prognostycznego do oceny krótko- i długoterminowego rokowania. W tym przypadku nie istnieją tak restrykcyjne ramy czasowe, dlatego możliwe byłoby wykorzystanie znanych i szeroko dostępnych metod laboratoryjnych. Wciąż jednak, aby w pełni ocenić przydatność miRNA w tym celu konieczne jest wykonanie dużo bardziej rozległych badań. Niezmiernie ciekawym wydaje się wykorzystanie miRNA jako celu terapeutycznego, a wyniki badań na zwierzętach w tym zakresie wydają się obiecujące. Jest to jednak „pieśnią przyszłości” ponieważ zgromadzenie pełnych danych dotyczących konkretnego rodzaju miRNA i wszystkich genów regulowanych przez niego zajmie wiele lat.

7. Wnioski

- Zgodnie z hipotezą badawczą wysnutą na podstawie przeprowadzonych wcześniej analiz *in silico* u pacjentów w ostrej fazie udaru niedokrwiennego zaobserwowano różnice w ekspresji miR-16-5p, let-7e, miR-106b-5p, miR-125a-3p i 5p w porównaniu z populacją bez udaru. Wskazuje to na ich związek z patofizjologią udaru niedokrwiennego.
- Spośród badanych miRNA różnica ekspresji miR-125a-3p i miR-125a-5p była istotna statystycznie, ale obecnie nie jest możliwe określenie czy mogą być one biomarkerami diagnostycznymi z uwagi na brak obserwacji dynamiki ekspresji w ciągu pierwszych kilku godzin od wystąpienia epizodu niedokrwiennego.
- Ekspresja miR-16-5p wykazała istotną korelację z ciężkością udaru niedokrwiennego w krótkoterminowej obserwacji, co wskazuje na jego szczególną wartość prognostyczną, której weryfikacja powinna nastąpić w kolejnych, odpowiednich liczebnie i długoterminowych obserwacjach.

Badane miRNA związane z aktywnością płytek krwi, a także funkcją śródbłonna biorą udział w patogenezie udaru niedokrwiennego najprawdopodobniej jako element komunikacji międzykomórkowej. Dokładniejsze poznanie mechanizmu działania badanych cząsteczek może w przyszłości pomóc określić ich ewentualną wartość terapeutyczną.

8. Bibliografia

1. Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, Adeoye OM, Bambakidis NC, Becker K, et al. Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: 2019 Update to the 2018 Guidelines for the Early Management of Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2019;50: e344–e418.
2. Herpich F, Rincon F. Management of Acute Ischemic Stroke. *Crit Care Med*. 2020;48: 1654–1663.
3. El-Koussy M, Schroth G, Brekenfeld C, Arnold M. Imaging of acute ischemic stroke. *Eur Neurol*. 2014;72: 309–316.
4. Kamtchum-Tatuene J, Jickling GC. Blood Biomarkers for Stroke Diagnosis and Management. *Neuromolecular Med*. 2019;21: 344–368.
5. Wang S-W, Liu Z, Shi Z-S. Non-Coding RNA in Acute Ischemic Stroke: Mechanisms, Biomarkers and Therapeutic Targets. *Cell Transplant*. 2018;27: 1763–1777.
6. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116: 281–297.
7. Ma H, Wu Y, Yang H, Liu J, Dan H, Zeng X, et al. MicroRNAs in oral lichen planus and potential miRNA–mRNA pathogenesis with essential cytokines: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2016;122: 164–173.
8. Eyileten C, Wicik Z, De Rosa S, Mirowska-Guzel D, Soplinska A, Indolfi C, et al. MicroRNAs as Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Ischemic Stroke-A Comprehensive Review and Bioinformatic Analysis. *Cells*. 2018;7. doi:10.3390/cells7120249
9. Ge Q, Zhou Y, Lu J, Bai Y, Xie X, Lu Z. miRNA in plasma exosome is stable under different storage conditions. *Molecules*. 2014;19: 1568–1575.
10. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange

- between cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9: 654–659.
11. Cun Y, Jin Y, Wu D, Zhou L, Zhang C, Zhang S, et al. Exosome in Crosstalk between Inflammation and Angiogenesis: A Potential Therapeutic Strategy for Stroke. *Mediators Inflamm.* 2022;2022: 7006281.
 12. Sabour S. The Diagnostic Value of Serum miRNA-221-3p, miRNA-382-5p, and miRNA-4271 in Ischemic Stroke: Methodological Issue to Avoid Misinterpretation. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases.* 2017. p. 1161. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.02.008
 13. Chen Y, Song Y, Huang J, Qu M, Zhang Y, Geng J, et al. Increased Circulating Exosomal miRNA-223 Is Associated with Acute Ischemic Stroke. *Front Neurol.* 2017;8: 57.
 14. Aili Y, Maimaitiming N, Mahemuti Y, Qin H, Wang Y, Wang Z. The Role of Exosomal miRNAs in Glioma: Biological Function and Clinical Application. *Front Oncol.* 2021;11: 686369.
 15. Denorme F, Rustad JL, Campbell RA. Brothers in arms: platelets and neutrophils in ischemic stroke. *Curr Opin Hematol.* 2021;28: 301–307.
 16. Burkard P, Vögtle T, Nieswandt B. Platelets in Thrombo-Inflammation: Concepts, Mechanisms, and Therapeutic Strategies for Ischemic Stroke. *Hamostaseologie.* 2020;40: 153–164.
 17. Wicik Z, Czajka P, Eyileten C, Fitas A, Wolska M, Jakubik D, et al. The role of miRNAs in regulation of platelet activity and related diseases - a bioinformatic analysis. *Platelets.* 2022;33: 1052–1064.
 18. Saini V, Guada L, Yavagal DR. Global Epidemiology of Stroke and Access to Acute Ischemic Stroke Interventions. *Neurology.* 2021;97: S6–S16.
 19. Boursin P, Paternotte S, Dercy B, Sabben C, Maïer B. [Semantics, epidemiology and semiology of stroke]. *Soins.* 2018;63: 24–27.
 20. GBD 2019 Stroke Collaborators. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease

Study 2019. *Lancet Neurol.* 2021;20: 795–820.

21. Navis A, Garcia-Santibanez R, Skliut M. Epidemiology and Outcomes of Ischemic Stroke and Transient Ischemic Attack in the Adult and Geriatric Population. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2019;28: 84–89.
22. Feske SK. Ischemic Stroke. *Am J Med.* 2021;134: 1457–1464.
23. Zhao Y, Zhang X, Chen X, Wei Y. Neuronal injuries in cerebral infarction and ischemic stroke: From mechanisms to treatment (Review). *Int J Mol Med.* 2022;49. doi:10.3892/ijmm.2021.5070
24. Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke.* 1993;24: 35–41.
25. Berkman SA, Song SS. Ischemic Stroke in the Young. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2021;27: 10760296211002274.
26. Anrather J, Iadecola C. Inflammation and Stroke: An Overview. *Neurotherapeutics.* 2016;13: 661–670.
27. Todorov V, Dimitrova M. Stroke and the immune system: A review of the new strategies. *Folia Med .* 2020;62: 431–437.
28. Chamorro Á, Meisel A, Planas AM, Urra X, van de Beek D, Veltkamp R. The immunology of acute stroke. *Nat Rev Neurol.* 2012;8: 401–410.
29. Chamorro Á, Dirnagl U, Urra X, Planas AM. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. *Lancet Neurol.* 2016;15: 869–881.
30. Kumar V. Toll-like receptors in the pathogenesis of neuroinflammation. *J Neuroimmunol.* 2019;332: 16–30.
31. Lee M. Neurotransmitters and microglial-mediated neuroinflammation. *Curr Protein Pept Sci.* 2013;14: 21–32.

32. Jayaraj RL, Azimullah S, Beiram R, Jalal FY, Rosenberg GA. Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke. *J Neuroinflammation*. 2019;16: 142.
33. Rayes J, Jenne CN. Platelets: bridging thrombosis and inflammation. *Platelets*. 2021;32: 293–294.
34. Walter K. What Is Acute Ischemic Stroke? *JAMA*. 2022;327: 885.
35. Graham C, Bailey D, Hart S, Hutchison A, Sandercock P, Doubal F, et al. Clinical diagnosis of TIA or minor stroke and prognosis in patients with neurological symptoms: A rapid access clinic cohort. *PLoS One*. 2019;14: e0210452.
36. Coutts SB. Diagnosis and Management of Transient Ischemic Attack. *Continuum* . 2017;23: 82–92.
37. Uchiyama S. The concept of acute cerebrovascular syndrome. *Front Neurol Neurosci*. 2014;33: 11–18.
38. Kwah LK, Diong J. National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS). *J Physiother*. 2014;60: 61.
39. Runde D. Calculated decisions: NIH Stroke Scale/Score (NIHSS). *Emerg Med Pract*. 2021;23: CD3–CD5.
40. Bodien YG, Barra A, Temkin NR, Barber J, Foreman B, Vassar M, et al. Diagnosing Level of Consciousness: The Limits of the Glasgow Coma Scale Total Score. *J Neurotrauma*. 2021;38: 3295–3305.
41. Sternbach GL. The Glasgow coma scale. *J Emerg Med*. 2000;19: 67–71.
42. Gur AY, Lampl Y, Gross B, Royter V, Shopin L, Bornstein NM. A new scale for assessing patients with vertebrobasilar stroke-the Israeli Vertebrobasilar Stroke Scale (IVBSS): inter-rater reliability and concurrent validity. *Clin Neurol Neurosurg*. 2007;109: 317–322.
43. Wijdicks EFM, Bamlet WR, Maramattom BV, Manno EM, McClelland RL. Validation of a new coma scale: The FOUR score. *Ann Neurol*. 2005;58: 585–593.
44. Książkiewicz B, Nowaczewska M, Wicherska B, Rajewski P, Princ R, Puchowska-

- Florek M, et al. Kliniczne monitorowanie udaru mózgu. *Udar Mózgu Problemy Interdyscyplinarne*. 2007;9: 89–96.
45. Haggag H, Hodgson C. Clinimetrics: Modified Rankin Scale (mRS). *J Physiother*. 2022;68: 281.
 46. Collin C, Wade DT, Davies S, Horne V. The Barthel ADL Index: a reliability study. *Int Disabil Stud*. 1988;10: 61–63.
 47. Mendelson SJ, Prabhakaran S. Diagnosis and Management of Transient Ischemic Attack and Acute Ischemic Stroke: A Review. *JAMA*. 2021;325: 1088–1098.
 48. Diener H-C, Hankey GJ. Primary and Secondary Prevention of Ischemic Stroke and Cerebral Hemorrhage: JACC Focus Seminar. *J Am Coll Cardiol*. 2020;75: 1804–1818.
 49. Sabayan B. Primary Prevention of Ischemic Stroke. *Semin Neurol*. 2022;42: 571–582.
 50. Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int*. 2010;78: 838–848.
 51. Zhang Z, Zou X, Zhang R, Xie Y, Feng Z, Li F, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomal miR-146a-5p reduces microglial-mediated neuroinflammation via suppression of the IRAK1/TRAF6 signaling pathway after ischemic stroke. *Aging* . 2021;13: 3060–3079.
 52. Yang J, Cao L-L, Wang X-P, Guo W, Guo R-B, Sun Y-Q, et al. Neuronal extracellular vesicle derived miR-98 prevents salvageable neurons from microglial phagocytosis in acute ischemic stroke. *Cell Death Dis*. 2021;12: 23.
 53. Hougaard KD, Hjort N, Zeidler D, Sørensen L, Nørgaard A, Hansen TM, et al. Remote ischemic preconditioning as an adjunct therapy to thrombolysis in patients with acute ischemic stroke: a randomized trial. *Stroke*. 2014;45: 159–167.
 54. Cui J, Liu N, Chang Z, Gao Y, Bao M, Xie Y, et al. Exosomal MicroRNA-126 from RIP3 Serum Is Involved in Hypoxia Tolerance in SH-SY5Y Cells by Downregulating DNMT3B. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2020;20: 649–660.

55. Geng W, Tang H, Luo S, Lv Y, Liang D, Kang X, et al. Exosomes from miRNA-126-modified ADSCs promotes functional recovery after stroke in rats by improving neurogenesis and suppressing microglia activation. *Am J Transl Res.* 2019;11: 780–792.
56. Lv H, Li J, Che Y. miR-31 from adipose stem cell-derived extracellular vesicles promotes recovery of neurological function after ischemic stroke by inhibiting TRAF6 and IRF5. *Exp Neurol.* 2021;342: 113611.
57. Zhang Y, Liu J, Su M, Wang X, Xie C. Exosomal microRNA-22-3p alleviates cerebral ischemic injury by modulating KDM6B/BMP2/BMF axis. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12: 111.
58. Yu Y, Zhou H, Xiong Y, Liu J. Exosomal miR-199a-5p derived from endothelial cells attenuates apoptosis and inflammation in neural cells by inhibiting endoplasmic reticulum stress. *Brain Res.* 2020;1726: 146515.
59. Ling X, Zhang G, Xia Y, Zhu Q, Zhang J, Li Q, et al. Exosomes from human urine-derived stem cells enhanced neurogenesis via miR-26a/HDAC6 axis after ischaemic stroke. *J Cell Mol Med.* 2020;24: 640–654.
60. Shan Y, Hu J, Lv H, Cui X, Di W. miR-221 Exerts Neuroprotective Effects in Ischemic Stroke by Inhibiting the Proinflammatory Response. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2021;30: 105489.
61. Chen Q, Liu Y, Ding X, Li Q, Qiu F, Wang M, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-secreted exosomes carrying microRNA-125b protect against myocardial ischemia reperfusion injury via targeting SIRT7. *Mol Cell Biochem.* 2020;465: 103–114.
62. Jia L, Hao F, Wang W, Qu Y. Circulating miR-145 is associated with plasma high-sensitivity C-reactive protein in acute ischemic stroke patients. *Cell Biochem Funct.* 2015;33: 314–319.
63. Lin H, Cheng C-F. Activating transcription factor 3, an early cellular adaptive responder in ischemia/reperfusion-induced injury. *Ci Ji Yi Xue Za Zhi.* 2018;30: 61–65.
64. Ai Z, Cheng C, Zhou L, Yin S, Wang L, Liu Y. Bone marrow mesenchymal stem

cells-derived extracellular vesicles carrying microRNA-221-3p protect against ischemic stroke via ATF3. *Brain Res Bull.* 2021;172: 220–228.

65. Hu H, Hu X, Li L, Fang Y, Yang Y, Gu J, et al. Exosomes Derived from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Promote Angiogenesis in Ischemic Stroke Mice via Upregulation of MiR-21-5p. *Biomolecules.* 2022;12. doi:10.3390/biom12070883
66. Tian T, Cao L, He C, Ye Q, Liang R, You W, et al. Targeted delivery of neural progenitor cell-derived extracellular vesicles for anti-inflammation after cerebral ischemia. *Theranostics.* 2021;11: 6507–6521.
67. Luo H, Ye G, Liu Y, Huang D, Luo Q, Chen W, et al. miR-150-3p enhances neuroprotective effects of neural stem cell exosomes after hypoxic-ischemic brain injury by targeting CASP2. *Neurosci Lett.* 2022;779: 136635.
68. Aimaletdinov AM, Gomzikova MO. Tracking of Extracellular Vesicles' Biodistribution: New Methods and Approaches. *Int J Mol Sci.* 2022;23. doi:10.3390/ijms231911312
69. You D, Qiao Q, Ono K, Wei M, Tan W, Wang C, et al. miR-223-3p inhibits the progression of atherosclerosis via down-regulating the activation of MEK1/ERK1/2 in macrophages. *Aging .* 2022;14: 1865–1878.
70. Eyileten C, Wicik Z, Keshwani D, Aziz F, Aberer F, Pferschy PN, et al. Alteration of circulating platelet-related and diabetes-related microRNAs in individuals with type 2 diabetes mellitus: a stepwise hypoglycaemic clamp study. *Cardiovasc Diabetol.* 2022;21: 79.
71. Li X, Yao Q, Cui H, Yang J, Wu N, Liu Y, et al. MiR-223 or miR-126 predicts resistance to dual antiplatelet therapy in patients with ST-elevation myocardial infarction. *J Int Med Res.* 2021;49: 3000605211016209.
72. Czajka P, Fitas A, Jakubik D, Eyileten C, Gasecka A, Wicik Z, et al. MicroRNA as Potential Biomarkers of Platelet Function on Antiplatelet Therapy: A Review. *Front Physiol.* 2021;12: 652579.
73. Zhou J, Chen L, Chen B, Huang S, Zeng C, Wu H, et al. Increased serum exosomal miR-134 expression in the acute ischemic stroke patients. *BMC Neurol.* 2018;18: 198.

74. Jiang M, Wang H, Jin M, Yang X, Ji H, Jiang Y, et al. Exosomes from MiR-30d-5p-ADSCs Reverse Acute Ischemic Stroke-Induced, Autophagy-Mediated Brain Injury by Promoting M2 Microglial/Macrophage Polarization. *Cell Physiol Biochem*. 2018;47: 864–878.
75. Li D-B, Liu J-L, Wang W, Li R-Y, Yu D-J, Lan X-Y, et al. Plasma Exosomal miR-422a and miR-125b-2-3p Serve as Biomarkers for Ischemic Stroke. *Curr Neurovasc Res*. 2017;14: 330–337.
76. Zhang H, Chen G, Qiu W, Pan Q, Chen Y, Chen Y, et al. Plasma endothelial microvesicles and their carrying miRNA-155 serve as biomarkers for ischemic stroke. *J Neurosci Res*. 2020;98: 2290–2301.
77. Song P, Sun H, Chen H, Wang Y, Zhang Q. Decreased Serum Exosomal miR-152-3p Contributes to the Progression of Acute Ischemic Stroke. *Clin Lab*. 2020;66. doi:10.7754/Clin.Lab.2020.200106
78. Zhang A, Qian Y, Qian J. MicroRNA-152-3p protects neurons from oxygen-glucose-deprivation/reoxygenation-induced injury through upregulation of Nrf2/ARE antioxidant signaling by targeting PSD-93. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;517: 69–76.
79. Huang W, Liu X, Cao J, Meng F, Li M, Chen B, et al. miR-134 regulates ischemia/reperfusion injury-induced neuronal cell death by regulating CREB signaling. *J Mol Neurosci*. 2015;55: 821–829.
80. Eyileten C, Jakubik D, Shahzadi A, Gasecka A, van der Pol E, De Rosa S, et al. Diagnostic Performance of Circulating miRNAs and Extracellular Vesicles in Acute Ischemic Stroke. *Int J Mol Sci*. 2022;23. doi:10.3390/ijms23094530
81. Gao L, Zhang Y, Sterling K, Song W. Brain-derived neurotrophic factor in Alzheimer's disease and its pharmaceutical potential. *Transl Neurodegener*. 2022;11: 4.
82. Eyileten C, Kaplon-Cieslicka A, Mirowska-Guzel D, Malek L, Postula M. Antidiabetic Effect of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Its Association with Inflammation in Type 2 Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res*. 2017;2017: 2823671.

83. Eyileten C, Sharif L, Wicik Z, Jakubik D, Jarosz-Popek J, Soplinska A, et al. The Relation of the Brain-Derived Neurotrophic Factor with MicroRNAs in Neurodegenerative Diseases and Ischemic Stroke. *Mol Neurobiol*. 2021;58: 329–347.
84. Wang W, Li D-B, Li R-Y, Zhou X, Yu D-J, Lan X-Y, et al. Diagnosis of Hyperacute and Acute Ischaemic Stroke: The Potential Utility of Exosomal MicroRNA-21-5p and MicroRNA-30a-5p. *Cerebrovasc Dis*. 2018;45: 204–212.
85. Tsai P-C, Liao Y-C, Wang Y-S, Lin H-F, Lin R-T, Juo S-HH. Serum microRNA-21 and microRNA-221 as Potential Biomarkers for Cerebrovascular Disease. *Journal of Vascular Research*. 2013. pp. 346–354. doi:10.1159/000351767
86. Zhou J, Zhang J. Identification of miRNA-21 and miRNA-24 in plasma as potential early stage markers of acute cerebral infarction. *Mol Med Rep*. 2014;10: 971–976.
87. Fu L-L, Wen X, Bao J-K, Liu B. MicroRNA-modulated autophagic signaling networks in cancer. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44: 733–736.
88. Long G, Wang F, Li H, Yin Z, Sandip C, Lou Y, et al. Circulating miR-30a, miR-126 and let-7b as biomarker for ischemic stroke in humans. *BMC Neurol*. 2013;13: 178.
89. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2006;6: 508–519.
90. Vemuganti R. All's well that transcribes well: non-coding RNAs and post-stroke brain damage. *Neurochem Int*. 2013;63: 438–449.
91. Chaudhuri AA, So AY-L, Sinha N, Gibson WSJ, Taganov KD, O'Connell RM, et al. MicroRNA-125b potentiates macrophage activation. *J Immunol*. 2011;187: 5062–5068.
92. Bidzhekov K, Gan L, Denecke B, Rostalsky A, Hristov M, Koepfel TA, et al. microRNA expression signatures and parallels between monocyte subsets and atherosclerotic plaque in humans. *Thromb Haemost*. 2012;107: 619–625.
93. Ståhl A-L, Johansson K, Mossberg M, Kahn R, Karpman D. Exosomes and microvesicles in normal physiology, pathophysiology, and renal diseases. *Pediatr Nephrol*. 2019;34: 11–30.

94. Liu Y, Pan Q, Zhao Y, He C, Bi K, Chen Y, et al. MicroRNA-155 Regulates ROS Production, NO Generation, Apoptosis and Multiple Functions of Human Brain Microvessel Endothelial Cells Under Physiological and Pathological Conditions. *J Cell Biochem.* 2015;116: 2870–2881.
95. Liu D, Zhao D, Zhao Y, Wang Y, Zhao Y, Wen C. Inhibition of microRNA-155 Alleviates Cognitive Impairment in Alzheimer's Disease and Involvement of Neuroinflammation. *Curr Alzheimer Res.* 2019;16: 473–482.
96. El-Khazragy N, Noshi MA, Abdel-Malak C, Zahran RF, Swellam M. miRNA-155 and miRNA-181a as prognostic biomarkers for pediatric acute lymphoblastic leukemia. *J Cell Biochem.* 2019;120: 6315–6321.
97. Karam RA, Abd Elrahman DM. Differential expression of miR-155 and Let-7a in the plasma of childhood asthma: Potential biomarkers for diagnosis and severity. *Clin Biochem.* 2019;68: 30–36.
98. Gao F, Chang J, Wang H, Zhang G. Potential diagnostic value of miR-155 in serum from lung adenocarcinoma patients. *Oncol Rep.* 2014;31: 351–357.
99. Kalani MYS, Alsop E, Meechoovet B, Beecroft T, Agrawal K, Whitsett TG, et al. Extracellular microRNAs in blood differentiate between ischaemic and haemorrhagic stroke subtypes. *J Extracell Vesicles.* 2020;9: 1713540.
100. Davì G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med.* 2007;357: 2482–2494.
101. Pordzik J, Pisarz K, De Rosa S, Jones AD, Eyileten C, Indolfi C, et al. The Potential Role of Platelet-Related microRNAs in the Development of Cardiovascular Events in High-Risk Populations, Including Diabetic Patients: A Review. *Front Endocrinol .* 2018;9: 74.
102. Paniccia R, Priora R, Liotta AA, Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Health Risk Manag.* 2015;11: 133–148.
103. Provost P. The clinical significance of platelet microparticle-associated microRNAs. *Clin Chem Lab Med.* 2017;55: 657–666.

104. Wiśniewski A, Kozera G. Leki przeciwplatekcyjne w leczeniu i profilaktyce udaru niedokrwiennego mózgu. *Forum Medycyny Rodzinnej*. 2019;13: 159–169.
105. Bładowski M, Gawrys J, Gajecki D, Szahidewicz-Krupska E, Sawicz-Bładowska A, Doroszko A. Role of the Platelets and Nitric Oxide Biotransformation in Ischemic Stroke: A Translative Review from Bench to Bedside. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020: 2979260.
106. Deppermann C. Platelets and vascular integrity. *Platelets*. 2018;29: 549–555.
107. Lim ST, Tobin WO, Murphy S, Kinsella JA, Smith DR, Lim SY, et al. Profile of reticulated platelets in the early, subacute and late phases after transient ischemic attack or ischemic stroke. *Platelets*. 2022;33: 89–97.
108. Koupenova M, Clancy L, Corkrey HA, Freedman JE. Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation, and Thrombosis. *Circ Res*. 2018;122: 337–351.
109. Thomas MR, Storey RF. The role of platelets in inflammation. *Thromb Haemost*. 2015;114: 449–458.
110. Huilcaman R, Venturini W, Fuenzalida L, Cayo A, Segovia R, Valenzuela C, et al. Platelets, a Key Cell in Inflammation and Atherosclerosis Progression. *Cells*. 2022;11. doi:10.3390/cells11061014
111. Momi S, Falcinelli E, Petito E, Ciarrocca Taranta G, Ossoli A, Gresele P. Matrix metalloproteinase-2 on activated platelets triggers endothelial PAR-1 initiating atherosclerosis. *Eur Heart J*. 2022;43: 504–514.
112. Czajka P, Przybyłkowski A, Nowak A, Postula M, Wolska M, Mirowska-Guzel D, et al. Antiplatelet drugs and liver fibrosis. *Platelets*. 2021; 1–10.
113. Elgheznawy A, Shi L, Hu J, Wittig I, Laban H, Pircher J, et al. Dicer cleavage by calpain determines platelet microRNA levels and function in diabetes. *Circ Res*. 2015;117: 157–165.
114. Pordzik J, Jakubik D, Jarosz-Popek J, Wicik Z, Eyileten C, De Rosa S, et al. Significance of circulating microRNAs in diabetes mellitus type 2 and platelet reactivity: bioinformatic analysis and review. *Cardiovasc Diabetol*. 2019;18: 113.

115. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*. 2010;56: 1733–1741.
116. Sabatino J, Wicik Z, De Rosa S, Eyileten C, Jakubik D, Spaccarotella C, et al. MicroRNAs fingerprint of bicuspid aortic valve. *J Mol Cell Cardiol*. 2019;134: 98–106.
117. Zhao C, Sun X, Li L. Biogenesis and function of extracellular miRNAs. *ExRNA*. 2019;1: 38.
118. van der Meijden PEJ, Heemskerk JWM. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nat Rev Cardiol*. 2019;16: 166–179.
119. Osman A, Fälker K. Characterization of human platelet microRNA by quantitative PCR coupled with an annotation network for predicted target genes. *Platelets*. 2011;22: 433–441.
120. Kaudewitz D, Skroblin P, Bender LH, Barwari T, Willeit P, Pechlaner R, et al. Association of MicroRNAs and YRNAs With Platelet Function. *Circulation Research*. 2016. pp. 420–432. doi:10.1161/circresaha.114.305663
121. Liu WW, Wang H, Chen XH, Fu SW, Liu ML. miR-34b-3p May Promote Antiplatelet Efficiency of Aspirin by Inhibiting Thromboxane Synthase Expression. *Thromb Haemost*. 2019;119: 1451–1460.
122. Gidlöf O, van der Brug M, Ohman J, Gilje P, Olde B, Wahlestedt C, et al. Platelets activated during myocardial infarction release functional miRNA, which can be taken up by endothelial cells and regulate ICAM1 expression. *Blood*. 2013;121: 3908–17, S1–26.
123. Laffont B, Corduan A, Plé H, Duchez A-C, Cloutier N, Boilard E, et al. Activated platelets can deliver mRNA regulatory Ago2•microRNA complexes to endothelial cells via microparticles. *Blood*. 2013;122: 253–261.
124. Singh S, de Ronde MWJ, Creemers EE, Van der Made I, Meijering R, Chan MY, et al. Low miR-19b-1-5p Expression Is Related to Aspirin Resistance and Major Adverse Cardio- Cerebrovascular Events in Patients With Acute Coronary Syndrome. *J Am Heart Assoc*. 2021;10: e017120.

125. Wobst J, Kessler T, Dang TA, Erdmann J, Schunkert H. Role of sGC-dependent NO signalling and myocardial infarction risk. *J Mol Med* . 2015;93: 383–394.
126. Kessler T, Wobst J, Wolf B, Eckhold J, Vilne B, Hollstein R, et al. Functional Characterization of the GUCY1A3 Coronary Artery Disease Risk Locus. *Circulation*. 2017;136: 476–489.
127. Landry P, Plante I, Ouellet DL, Perron MP, Rousseau G, Provost P. Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets. *Nat Struct Mol Biol*. 2009;16: 961–966.
128. Ramkissoon SH, Mainwaring LA, Ogasawara Y, Keyvanfar K, McCoy JP Jr, Sloand EM, et al. Hematopoietic-specific microRNA expression in human cells. *Leuk Res*. 2006;30: 643–647.
129. Haneklaus M, Gerlic M, O’Neill LAJ, Masters SL. miR-223: infection, inflammation and cancer. *J Intern Med*. 2013;274: 215–226.
130. Shi L, Fisslthaler B, Zippel N, Frömel T, Hu J, Elgheznawy A, et al. MicroRNA-223 antagonizes angiogenesis by targeting β 1 integrin and preventing growth factor signaling in endothelial cells. *Circ Res*. 2013;113: 1320–1330.
131. Zhou M, Gao M, Luo Y, Gui R, Ji H. Long non-coding RNA metallothionein 1 pseudogene 3 promotes p2y12 expression by sponging miR-126 to activate platelet in diabetic animal model. *Platelets*. 2019;30: 452–459.
132. Cominetti MR, Martin ACBM, Ribeiro JU, Djaafri I, Fauvel-Lafève F, Crépin M, et al. Inhibition of platelets and tumor cell adhesion by the disintegrin domain of human ADAM9 to collagen I under dynamic flow conditions. *Biochimie*. 2009;91: 1045–1052.
133. Garcia A, Dunoyer-Geindre S, Zapilko V, Nolli S, Reny J-L, Fontana P. Functional Validation of microRNA-126-3p as a Platelet Reactivity Regulator Using Human Haematopoietic Stem Cells. *Thromb Haemost*. 2019;119: 254–263.
134. Zapilko V, Fish RJ, Garcia A, Reny J-L, Dunoyer-Geindre S, Lecompte T, et al. MicroRNA-126 is a regulator of platelet-supported thrombin generation. *Platelets*. 2020;31: 746–755.

135. Edelstein LC, Simon LM, Montoya RT, Holinstat M, Chen ES, Bergeron A, et al. Racial differences in human platelet PAR4 reactivity reflect expression of PCTP and miR-376c. *Nat Med.* 2013;19: 1609–1616.
136. Kondkar AA, Bray MS, Leal SM, Nagalla S, Liu DJ, Jin Y, et al. VAMP8/endobrevin is overexpressed in hyperreactive human platelets: suggested role for platelet microRNA. *J Thromb Haemost.* 2010;8: 369–378.
137. Aslan JE, Tormoen GW, Loren CP, Pang J, McCarty OJT. S6K1 and mTOR regulate Rac1-driven platelet activation and aggregation. *Blood.* 2011;118: 3129–3136.
138. Basak I, Bhatlekar S, Manne BK, Stoller M, Hugo S, Kong X, et al. miR-15a-5p regulates expression of multiple proteins in the megakaryocyte GPVI signaling pathway. *J Thromb Haemost.* 2019;17: 511–524.
139. Miao X, Rahman MF-U, Jiang L, Min Y, Tan S, Xie H, et al. Thrombin-reduced miR-27b attenuates platelet angiogenic activities in vitro via enhancing platelet synthesis of anti-angiogenic thrombospondin-1. *J Thromb Haemost.* 2018;16: 791–801.
140. Machtinger R, Rodosthenous RS, Adir M, Mansour A, Racowsky C, Baccarelli AA, et al. Extracellular microRNAs in follicular fluid and their potential association with oocyte fertilization and embryo quality: an exploratory study. *J Assist Reprod Genet.* 2017;34: 525–533.
141. Wang Y, Yu X, Wang L, Ma W, Sun Q. miR-320b Is Down-Regulated in Psoriasis and Modulates Keratinocyte Proliferation by Targeting AKT3. *Inflammation.* 2018;41: 2160–2170.
142. Jingyang Z, Jinhui C, Lu X, Weizhong Y, Yunjiu L, Haihong W, et al. Mir-320b inhibits pancreatic cancer cell proliferation by targeting FOXM1. *Curr Pharm Biotechnol.* 2020. doi:10.2174/1389201021999200917144704
143. Huang S, Lv Z, Guo Y, Li L, Zhang Y, Zhou L, et al. Identification of Blood Let-7e-5p as a Biomarker for Ischemic Stroke. *PLoS One.* 2016;11: e0163951.
144. Tiedt S, Prestel M, Malik R, Schieferdecker N, Duering M, Kautzky V, et al. RNA-

Seq Identifies Circulating miR-125a-5p, miR-125b-5p, and miR-143-3p as Potential Biomarkers for Acute Ischemic Stroke. *Circ Res.* 2017;121: 970–980.

145. Stroke--1989. Recommendations on stroke prevention, diagnosis, and therapy. Report of the WHO Task Force on Stroke and other Cerebrovascular Disorders. *Stroke.* 1989;20: 1407–1431.
146. Wu J, Du K, Lu X. Elevated expressions of serum miR-15a, miR-16, and miR-17-5p are associated with acute ischemic stroke. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8: 21071–21079.
147. Tian C, Li Z, Yang Z, Huang Q, Liu J, Hong B. Plasma MicroRNA-16 Is a Biomarker for Diagnosis, Stratification, and Prognosis of Hyperacute Cerebral Infarction. *PLoS One.* 2016;11: e0166688.
148. Yang X, Tang X, Sun P, Shi Y, Liu K, Hassan SH, et al. MicroRNA-15a/16-1 Antagomir Ameliorates Ischemic Brain Injury in Experimental Stroke. *Stroke.* 2017;48: 1941–1947.
149. Leung LY, Chan CPY, Leung YK, Jiang HL, Abrigo JM, Wang DF, et al. Comparison of miR-124-3p and miR-16 for early diagnosis of hemorrhagic and ischemic stroke. *Clin Chim Acta.* 2014;433: 139–144.
150. Huang R, Zhang W, Li W, Gao Y, Zheng D, Bi G. Overexpressing circ_0000831 is sufficient to inhibit neuroinflammation and vertigo in cerebral ischemia through a miR-16-5p-dependent mechanism. *Exp Neurol.* 2022;353: 114047.
151. Li Q, Tian Z, Wang M, Kou J, Wang C, Rong X, et al. Luteoloside attenuates neuroinflammation in focal cerebral ischemia in rats via regulation of the PPAR γ /Nrf2/NF- κ B signaling pathway. *Int Immunopharmacol.* 2019;66: 309–316.
152. Chaudhuri AD, Dastgheyb RM, Yoo S-W, Trout A, Talbot CC Jr, Hao H, et al. TNF α and IL-1 β modify the miRNA cargo of astrocyte shed extracellular vesicles to regulate neurotrophic signaling in neurons. *Cell Death Dis.* 2018;9: 363.
153. Riccio A, Ahn S, Davenport CM, Blendy JA, Ginty DD. Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science.* 1999;286: 2358–2361.

154. Joilin G, Gray E, Thompson AG, Bobeva Y, Talbot K, Weishaupt J, et al. Identification of a potential non-coding RNA biomarker signature for amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Commun.* 2020;2: fcaa053.
155. Sandau US, McFarland TJ, Smith SJ, Galasko DR, Quinn JF, Saugstad JA. Differential Effects of APOE Genotype on MicroRNA Cargo of Cerebrospinal Fluid Extracellular Vesicles in Females With Alzheimer's Disease Compared to Males. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10: 864022.
156. Norsworthy PJ, Thompson AGB, Mok TH, Guntoro F, Dabin LC, Nihat A, et al. A blood miRNA signature associates with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease diagnosis. *Nat Commun.* 2020;11: 3960.
157. Dewdney B, Trollope A, Moxon J, Thomas Manapurathe D, Biros E, Golledge J. Circulating MicroRNAs as Biomarkers for Acute Ischemic Stroke: A Systematic Review. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2018;27: 522–530.
158. Li P, Shen M, Gao F, Wu J, Zhang J, Teng F, et al. An Antagomir to MicroRNA-106b-5p Ameliorates Cerebral Ischemia and Reperfusion Injury in Rats Via Inhibiting Apoptosis and Oxidative Stress. *Mol Neurobiol.* 2017;54: 2901–2921.
159. Reijerkerk A, Lopez-Ramirez MA, van Het Hof B, Drexhage JAR, Kamphuis WW, Kooij G, et al. MicroRNAs regulate human brain endothelial cell-barrier function in inflammation: implications for multiple sclerosis. *J Neurosci.* 2013;33: 6857–6863.
160. Muramatsu F, Kidoya H, Naito H, Sakimoto S, Takakura N. microRNA-125b inhibits tube formation of blood vessels through translational suppression of VE-cadherin. *Oncogene.* 2013;32: 414–421.
161. Song B, Xu J, Zhong P, Fang L. MiR-125a-5p silencing inhibits cerebral ischemia-induced injury through targeting IGFBP3. *Folia Neuropathol.* 2021;59: 121–130.
162. Zhao YY, Wang WA, Hu H. Treatment with recombinant tissue plasminogen activator alters the microRNA expression profiles in mouse brain after acute ischemic stroke. *Neurol Sci.* 2015;36: 1463–1470.
163. Zhou S-S, Jin J-P, Wang J-Q, Zhang Z-G, Freedman JH, Zheng Y, et al. miRNAs in cardiovascular diseases: potential biomarkers, therapeutic targets and challenges.

Acta Pharmacol Sin. 2018;39: 1073–1084.

164. Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Ghaffari SH. Why have microRNA biomarkers not been translated from bench to clinic? *Future Oncol.* 2019;15: 801–803.
165. de Gonzalo-Calvo D, Pérez-Boza J, Curado J, Devaux Y, EU-CardioRNA COST Action CA17129. Challenges of microRNA-based biomarkers in clinical application for cardiovascular diseases. *Clin Transl Med.* 2022;12: e585.

9. Spis tabel

Tabela 1. MikroRNA dla których wykazano potencjalną przydatność jako biomarkerów udaru niedokrwiennego w badaniach przeprowadzonych na grupach pacjentów

Tabela 2. Charakterystyka uczestników

Tabela 3. Szacunki statystyczne dotyczące przewidywania zwiększonej ciężkości udaru mózgu przez wyjściową ekspresję miR-16-5p.

Tabela 4. Wieloczynnikowy model regresji logistycznej dla przewidywania zwiększonej ciężkości udaru mózgu przez wyjściowy wysoki poziom ekspresji miR-16-5p.

10. Spis rycin

Ryc. 1. Skala Udarowa Narodowego Instytutu Zdrowia (NIHSS)

Ryc. 2. Wskaźnik Barthela

Ryc. 3. Skala Rankina

Ryc. 4. Możliwe mechanizmy neuroprotekcynego działania miRNA po epizodzie niedokrwienia tkanki nerwowej

Ryc 5. Znaczenie płytek krwi i w procesie aktywacji kaskady krzepnięcia.

Ryc 6. Możliwy mechanizm działania miRNA w szlakach aktywacji płytek krwi.

Ryc 7. Opis przebiegu metod molekularnych.

Ryc. 8. Zmiany ekspresji miRNA wśród grup (a) Let-7e; (b) miR-15b-5p; (c) miR-16-5p; (d) miR-106b-5p; (e) miR-125a-3p; (f) miR-125a-5p.

Rycina 9. Wartość diagnostyczna miRNA określona za pomocą analizy krzywej ROC. (a) miR-125a-3p w dniu udaru; (b) miR-125a-5p w dniu udaru.

Rycina 10. Różnica w ekspresji miR-16-5p na podstawie ciężkości udaru na linii podstawowej. (a) wykres pudełkowy dla miR-16-5p; (b) krzywa ROC miR-16-5p dla ciężkości udaru. Początkowa ciężkość udaru mierzona wg skali NIHSS przy przyjęciu. Niewielki udar: 1-4 (n = 30) i umiarkowany udar: 5-15 (n = 29).



Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym

Tel.: 022/ 57 - 20 -303
Fax: 022/ 57 - 20 -165

ul. Żwirki i Wigury nr 61
02-091 Warszawa

e-mail: komisja.bioetyczna@wum.edu.pl
www.komisja-bioetyczna.wum.edu.pl

KB/...148.../2017

Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym
w dniu 04 lipca 2017 r. po zapoznaniu się z wnioskiem:

Dr hab. med. Marek Postuła
Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej,
ul. Banacha 1b, 02-097 Warszawa

dotyczącym: wyrażenia opinii w sprawie badania pt : „ Analiza zmiany w czasie reaktywności płytek krwi, związku ze stężeniem płytkowych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz profilem mikroRNA u pacjentów w ostrej fazie udaru niedokrwienego mózgu na podłożu choroby dużych naczyń .”

**wyraża następującą
opinię**

- stwierdza, że jest ono dopuszczalne i zgodne z zasadami naukowo-etycznymi*.
- ~~—stwierdza, że jest ono niedopuszczalne i niezgodne z zasadami naukowo-etycznymi.*~~

Uwagi Komisji – verte

Komisja działa na podstawie art.29 ustawy z dnia 5.12.1996r. o zawodzie lekarza /Dz.U.nr 28/97 poz.152 wraz z późn.zm./, zarządzenia MZiOS z dn.11.05.1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych /Dz.U.nr 47 poz.480/, Ustawy prawo farmaceutyczne z dnia 6 września 2001r. (Dz.U.Nr 126, poz. 1381 z późn. zm.) oraz Zarządzenie nr 56/2007 z dnia 15 października 2007r. w sprawie działania Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym /Regulamin Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym/.

Komisja działa zgodnie z zasadami GCP .

W załączeniu: skład komisji oraz lista obecności

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Prof. dr hab. n. med. Zbigniew Wierzbicki

*niepotrzebne skreślić

strona podpisowa do uchwały Komisji Bioetycznej przy Warszawskim
Uniwersytecie Medycznym nr KB/.....¹⁴⁸..... z dnia 04 lipca 2017r.

1. Prof. dr hab. med. Zbigniew WIERZBICKI

.....^{Zwi.}.....

2. Prof. dr hab. Barbara GAJKOWSKA

.....^{BG}.....

3. Prof. dr hab. med. Jadwiga KOMENDER

.....^{J. Komender}.....

4. Prof. dr hab. med. Bożenna WOCIAL

.....^{Bożenna}.....

5. Prof. nadzw. dr hab. med. Andrzej KAŃSKI

.....^{A. Kański}.....

6. Prof. dr hab. med. Jadwiga DWILEWICZ-TROJACZEK

.....^{J. Dwilewicz-Trojaczek}.....

7. Prof. dr hab. med. Krzysztof J. FILIPIAK

.....^{K. Filipiak}.....

8. Dr n. med. Zygmunt JAMROZIK

.....^{Z. Jamrozik}.....

9. Dr hab. n. med. Mariusz JASIK

.....^{M. Jasiak}.....

10. Dr hab. n. med. Andrea HORVATH-STOLARCZYK

.....^{A. Horvath-Stolarczyk}.....

11. Dr Agnieszka PIECHAL

.....^{A. Piechal}.....

12. Mec. Ryszard PŁACZKOWSKI

.....^{R. Placzkowski}.....

13. Prof. dr hab. Joanna GÓRNICKA-KALINOWSKA

.....^{J. Górnicka-Kalinowska}.....

14. Alicja JAWORSKA

.....^{A. Jaworska}.....

15. Ksiądz Władysław GRĘDOWSKI

.....^{W. Grędowski}.....