I biomarcatori di ictus: progressi e sfide nella diagnosi, prognosi, differenziazione e trattamento

Amy K. Saenger[1], Robert H. Christenson[2]
[1]Department of Laboratory Medicine and Pathology, Mayo Clinic, Rochester, USA
[2]Department of Pathology, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, USA

Traduzione a cura di Alberto Dolci

ABSTRACT

Stroke biomarkers: progress and challenges for diagnosis, prognosis, differentiation, and treatment. Stroke is a devastating condition encompassing a wide range of pathophysiological entities that include thrombosis, hemorrhage, and embolism. Current diagnosis of stroke relies on physician clinical examination and is further supplemented with various neuroimaging techniques. A single set or multiple sets of blood biomarkers that could be used in an acute setting to diagnosis stroke, differentiate between stroke types, or even predict an initial/reoccurring stroke would be extremely valuable. We discuss the current classification, diagnosis, and treatment of stroke, focusing on use of novel biomarkers (either solitary markers or multiple markers within a panel) that have been studied in a variety of clinical settings. The current diagnosis of stroke remains hampered and delayed due to lack of a suitable mechanism for rapid (ideally point-of-care), accurate, and analytically sensitive biomarker-based testing. There is a clear need for further development and translational research in this area. Potential biomarkers identified need to be transitioned quickly into clinical validation testing for further evaluation in an acute stroke setting; to do so would impact and improve patient outcomes and quality of life.

L'ictus è la terza causa di morbilità e mortalità nel mondo occidentale, dopo la cardiopatia ischemica e il cancro. Globalmente ci sono più di 50 milioni di persone sopravvissute a un ictus e a un attacco ischemico transitorio (TIA). Più di uno su 5 dei superstiti soffrirà di un ulteriore ictus nei 5 anni successivi (1), inducendo un onere enorme per l'infrastruttura economica e di assistenza sanitaria. Stime recenti suggeriscono che l'impatto economico dell'ictus a livello mondiale sia approssimativamente di 68,9 miliardi di dollari, includendo costi diretti e indiretti (1). Si stima che, soltanto negli Stati Uniti, ci siano 5–6 milioni di sopravvissuti a un ictus, ma al costo di un'elevata disabilità. Tra il 15% e il 30% dei sopravvissuti all'ictus soffre di disabilità permanente e il 20% delle vittime necessita di assistenza medica presso istituti specializzati entro 3 mesi dall'evento acuto (1, 2).

Varie popolazioni sono a rischio di ictus e questa patologia non dovrebbe più essere considerata solamente tipica dell'età geriatrica, perchè un terzo delle vittime di ictus ha un'età inferiore a 65 anni. La popolazione di colore ha un rischio di ictus doppio rispetto ai bianchi e le donne sono a maggior rischio di ictus degli uomini. Nel 2005 le donne hanno rappresentato il 60,6% dei morti per ictus negli Stati Uniti; l'aumento dell'incidenza è principalmente dovuto all'aumento dell'aspettativa di vita (1). Tuttavia, chiunque è a rischio di ictus se ha fattori di rischio infiammatorio o vascolari, coesistenti o pregressi, compreso infarto del miocardio, coagulopatie, vasculopatia periferica, ipertensione, fibrillazione atriale o diabete mellito.

CLASSIFICAZIONE DELL'ICTUS

Il termine ictus ricomprende una vasta gamma di entità fisiopatologiche che include trombosi, embolia ed emorragia. In senso lato, l'ictus è classificato di tipo ischemico o emorragico, con l'ictus ischemico che rappresenta circa l'85% del numero totale di casi (1, 3). L'ictus ischemico è essenzialmente causato da una trombosi intracranica o da un'embolia extracranica. La trombosi intracranica è prevalentemente causata dall'aterosclerosi, mentre l'embolia extracranica in genere origina dalle arterie extracraniche o dal miocardio a causa di eventi concomitanti come infarto miocardico, stenosi

**Questo articolo è stato tradotto con il permesso dell'American Association for Clinical Chemistry (AACC). AACC non è responsabile della correttezza della traduzione. Le opinioni presentate sono esclusivamente quelle degli Autori e non necessariamente quelle dell'AACC o di Clinical Chemistry. Tradotto da Clin Chem 2010;56:21-33 su permesso dell'Editore.*
Copyright originale © 2010 American Association for Clinical Chemistry, Inc. In caso di citazione dell'articolo, riferirsi alla pubblicazione originale in Clinical Chemistry.

mitrale, endocardite, fibrillazione atriale, cardiomiopatia dilatativa o scompenso cardiaco congestizio. L'ictus emorragico può essere classificato come emorragia intracerebrale (ICH) o emorragia subaracnoidea (SAH). L'ICH origina dai vasi cerebrali, indeboliti da processi patologici [che indeboliscono la resistenza meccanica delle pareti, NdT], che si rompono e formano un ematoma localizzato all'interno del parenchima cerebrale. Nella SAH l'emorragia avviene all'esterno del cervello e si riversa nel liquido cefalo-rachidiano (CSF). Le cause più frequenti di ICH e SAH sono le medesime e comprendono ipertensione, traumi, uso di farmaci o droghe e malformazioni vascolari.

Il TIA, conosciuto anche come "mini-ictus", provoca deficit neurologici focali simili a un ictus ischemico, ma, storicamente, è stato definito di durata <24 ore (4). Tuttavia, è ben noto che la maggior parte dei TIA si risolve entro 1 ora (5) e il 90% si conclude dopo 4 ore (6). Pertanto, la "American Heart Association" ha raccommandato di definire un TIA basandosi sull'evidenza di un episodio transitorio di ischemia cerebrale senza infarto e non semplicemente sulla base di un arbitrario limite temporale (4). Questa definizione è controversa, ma assegna una valenza elevata alla diagnosi rapida e accurata di TIA, in quanto il TIA è un forte predittore di rischio a breve termine di ictus ischemico completo, di eventi cardiovascolari e di morte. Questo rischio può essere ridotto attraverso la somministrazione precoce di terapie trombolitiche. La diagnosi di TIA e la discussione sulla stratificazione del rischio non saranno affrontate in questa rassegna, ma possono essere reperite altrove (4, 7).

Infine, si utilizza il termine "simil-ictus" per comprendere una varietà di anomalie che simulano i segni e i sintomi dell'ictus (Tabella 1). Le più comuni condizioni cliniche che simulano l'ictus includono ipoglicemia e convulsioni, due condizioni frequentemente riscontrate in un contesto clinico di emergenza. Le condizioni che simulano l'ictus possono interferire con la rapidità di diagnosi e di trattamento necessarie per una prognosi ottimale nelle vittime di ictus.

FISIOPATOLOGIA DELL'ICTUS

La complessità insita nei meccanismi fisiopatologici dell'ictus è notevole, sebbene vi siano molte similitudini e molte differenze tra ictus ischemico ed emorragico. L'ictus ischemico innesca una serie generalizzata di eventi, coincidenti con l'insorgenza dell'ischemia cerebrale, noti come "cascata ischemica" (Figura 1). La durata e il momento preciso di ciascun evento sono variabili e dipendono da molti fattori quali estensione dell'infarto, insorgenza e durata dell'ischemia ed efficacia della riperfusione. Gli eventi ischemici cominciano con una graduale o improvvisa ipoperfusione cerebrale e comprendono insufficienza bioenergetica cellulare, eccitotossici-

Tabella 1
Condizioni cliniche che possono simulare l'ictus [Adams et al. (7)]

Convulsioni
Ipoglicemia
Sovradosaggio di farmaci o droghe
Iponatriemia
Emicrania
Tumore cerebrale
Ematoma subdurale

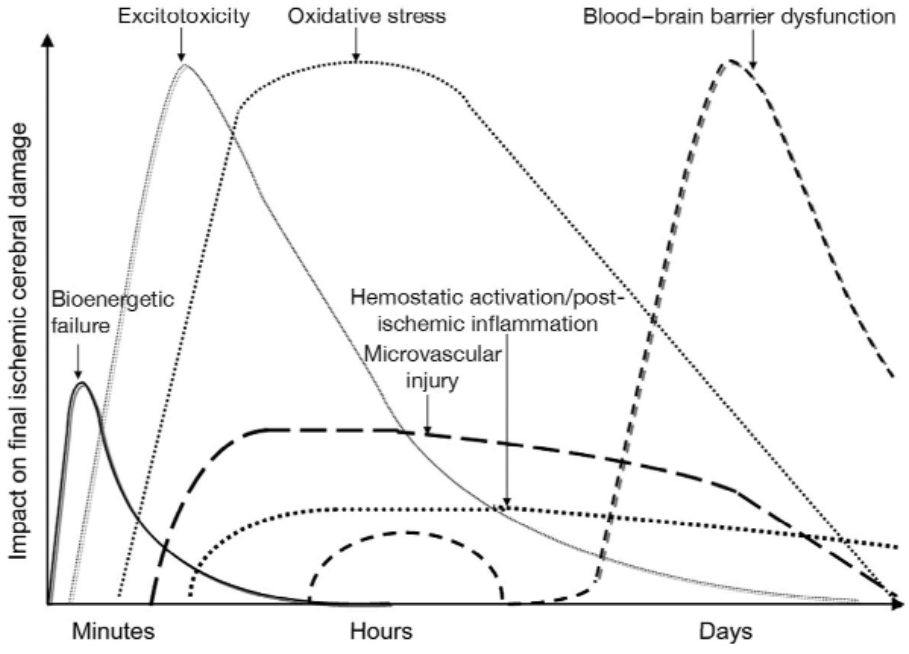


Figura 1
Successione temporale degli eventi nella cascata ischemica. Modificata da Brouns e De Deyn (8).

tà, stress ossidativo, disfunzione della barriera emato-encefalica, danno microvascolare, attivazione dell'emostasi, infiammazione ed eventuale necrosi di cellule neuronali, gliali ed endoteliali (8). La perdita di integrità della barriera emato-encefalica nell'ictus ischemico sembra essere un evento bifasico e dipende dall'aggressività della terapia e dalla risposta alla riperfusione. Nelle prime 24 ore di un ictus ischemico c'è solo un'aumentata permeabilità della barriera emato-encefalica e l'ulteriore danno avviene 48–72 ore dopo l'infarto.

La causa principale di ictus emorragico intracerebrale è da attribuire all'ipertensione cronica che determina un indebolimento della parete dei vasi sanguigni e, nonostante qualche parere controverso, non ci sono stati sostanziali incrementi nella prevalenza dell'ICH a fronte dell'aumento di utilizzo della terapia anticoagulante. Anche nell'ICH l'insorgenza dei sintomi può essere rapida o graduale e gli esiti clinici dipendono soprattutto dal volume e dall'espansione dell'ematoma. Entro le primissime ore dall'ICH, si verifica un edema, di grado variabile, che esita nella retrazione del coagulo e nel rilascio di proteine osmoticamente attive nei tessuti circostanti (9, 10). Dopo 2-3 giorni segue l'attivazione della cascata coagulativa in abbinamento alla sintesi di trombina e alla risposta infiammatoria sistemica. Infine, vi sono tossicità neuronale da emoglobina e lisi eritrocitaria che avvengono parecchi giorni dopo l'evento iniziale dell'ICH. Sulla strada verso la scoperta di un marcatore di ictus, tra gli aspetti da definire vi è, per l'ictus emorragico, la ritardata perdita di integrità della barriera emato-encefalica, che per le grandi molecole rimane integra per parecchie ore dopo l'emorragia. Solo dopo un aumento piuttosto consistente del volume dell'ematoma (in media dopo 8–12 ore), la permeabilità della barriera emato-encefalica diventerà sufficiente per poter rilevare in circolo le proteine specifiche del tessuto cerebrale.

La complessità dei differenti tipi di tessuto cerebrale, combinata con la mancanza di conoscenze definitive sulla fisiologia cerebrale, contribuisce all'attuale carenza di biomarcatori specifici di ictus.

DIAGNOSI CLINICA DELL'ICTUS

La diagnosi, la differenziazione e la gestione clinica dell'ictus si basano sull'esecuzione di un'accurata anamnesi e di un minuzioso esame obiettivo del paziente. L'insorgenza improvvisa di difficoltà a parlare e di debolezza focale sono sintomi caratteristici sia dell'ictus ischemico che emorragico. E' stato dimostrato che l'accuratezza diagnostica per l'ictus raggiunge una sensibilità del 92% nei medici di medicina generale abituati a valutare vittime di sospetto ictus (11), ma è meno affidabile nei medici con minore esperienza o sicurezza (12). L'inquadramento rapido delle vittime di ictus acuto è critico per definirne l'eligibilità alla terapia trombolitica, in quanto la finestra temporale a disposizione per garantire l'efficacia della terapia nell'ictus è molto stretta, solo poche ore, rispetto all'infarto del miocardio. Per supportare l'uniformità diagnostica tra medici, è stata sviluppata la "National Institutes of Health Stroke Scale" (NIHSS) a 42 punti, strutturata per essere completata in 5-8 min (7, 13). La NIHSS quantifica i deficit neurologici nei pazienti con ictus e ha un valore prognostico nel predire la progressione delle complicanze. L'impiego della NIHSS non ha tuttavia dimostrato un miglioramento indipendente della prognosi del paziente.

Le tecniche di diagnostica per immagini neurologica rimangono l'unico strumento disponibile per differenziare ictus ischemico e ICH, in quanto i sintomi delle due condizioni mostrano una sostanziale sovrapposizione. I soggetti con SAH spesso si presentano senza segni focali o sintomi perché l'emorragia è extracerebrale; tuttavia, i pazienti con ICH spesso riferiscono di avere un intenso mal di testa ad insorgenza improvvisa. I criteri diagnostici per l'ictus non utilizzano specifici biomarcatori ematici, ma si basano esclusivamente sull'inquadramento clinico e l'interpretazione dei riscontri radiologici (Tabella 2).

TECNICHE DI DIAGNOSTICA PER IMMAGINI

Numerose tecniche di diagnostica per immagini sono attualmente disponibili e l'avvento di nuove scoperte ha

Tabella 2
Esami diagnostici utilizzati nella valutazione in acuto dell'ictus [Adams et al. (7)]

Tutti i pazienti	Pazienti selezionati
Diagnostica per immagini neurologica (NCCT o MRI)	Radiografia del torace
Elettrocardiogramma	Profilo di funzionalità e danno epatico
Marcatori cardiaci (troponina)	Emogasanalisi arteriosa
Esame emocromocitometrico e conta piastrine	Esame chimico-fisico del liquor
Elettroliti	Profilo lipidico
Glicemia	Indagine tossicologica
Esami della coagulazione (PT/INR, aPTT)	β-hCG
Esami di funzionalità renale	Alcolemia
Saturazione dell'ossigeno	Elettroencefalogramma

NCCT, tomografia computerizzata senza mezzo di contrasto; MRI, risonanza magnetica; PT, tempo di protrombina; INR, "international normalized ratio"; aPTT, tempo di tromboplastina parziale attivata; β-hCG, subunità β della gonadotropina corionica umana.

creato i presupposti per più precoci opportunità di intervento terapeutico nei pazienti con ictus. L'obiettivo prioritario delle indagini iniziali di diagnostica per immagini neurologica è di differenziare in modo tempestivo tra ictus emorragico e ictus ischemico o di escludere le situazioni cliniche che simulano l'ictus. Molti importanti aspetti ricavati dalla diagnostica per immagini cerebrale, che comprendono la rilevazione precoce dell'infarto, la definizione della sede e del grado di infarto e la distribuzione vascolare delle lesioni responsabili dell'ictus, aiutano definitivamente a guidare le decisioni o le opzioni terapeutiche. La tomografia computerizzata (CT) e la risonanza magnetica (MRI) sono comunemente utilizzate per l'inquadramento acuto iniziale delle vittime di ictus.

I principali vantaggi della CT sono la sua ampia disponibilità e la tempestività con la quale l'esame può essere eseguito. La CT senza mezzo di contrasto (NCCT) è ampiamente accettata come la tecnica standard di neurodiagnostica per immagini nella fase iperacuta ed è tipicamente eseguita in tutti i pazienti con sospetto ictus, dopo la stabilizzazione medica, per rilevare lesioni cerebrali o emorragia acuta (7). Tecniche multimodali più recenti (NCCT abbinata a diagnostica per immagini di perfusione cerebrale e ad angiografia) vengono utilizzate per compensare alcuni limiti della NCCT, che non è abbastanza sensibile per diagnosticare accuratamente l'ictus ischemico a causa dell'impossibilità di visualizzare interamente l'occlusione vascolare e il grado di circolazione collaterale e della mancanza di sensibilità diagnostica per l'ischemia precoce (14).

Nuove modalità di diagnostica per immagini hanno messo in discussione l'utilizzo abituale della CT multimodale. Nell'ambito dell'ictus acuto, la MRI con contrasto pesato in diffusione (DWI) ha la capacità di differenziare i pazienti nei vari sottogruppi di ictus ed ha chiaramente dimostrato una sensibilità superiore nelle prime ore dopo l'ictus rispetto alla NCCT (95%–100% contro 42%–75%, rispettivamente) (15, 16). E' stato dimostrato che la MRI rileva circa la metà di tutti i casi di TIA (17). Le tecniche di MRI-DWI inoltre possono fornire informazioni aggiuntive nei pazienti con ictus che ritardano a sottoporsi al trattamento. Schulz et al. (18) hanno condotto uno studio prospettico osservazionale su 300 pazienti con sospetto ictus o TIA e una mediana di 17 giorni dall'insorgenza dei sintomi. In questa coorte l'uso della MRI-DWI ha fornito un chiarimento riguardo alla diagnosi o al territorio vascolare interessato che ha permesso di modificare la gestione di 42 (14%) pazienti. La MRI-DWI era di aiuto anche nella valutazione dell'ictus acuto ischemico e la presenza di lesioni multiple, evidenziate in DWI sul reperto basale di MRI, era associata con un aumentato rischio di recidiva precoce della lesione (19-21). La presenza di lesioni multiple alla MRI-DWI, indipendentemente dall'epoca della lesione, è risultato un predittore indipendente di eventi ischemici futuri (22).

Sebbene con le tecniche basate sulla MRI la risoluzione sia aumentata, esistono alcuni ostacoli alla sua implementazione ordinaria, quali la limitata disponibilità e gli elevati costi di questi tomografi. Le raccomandazioni correnti suggeriscono l'uso della MRI nei pazienti eligibili per la terapia trombolitica solo se le valutazioni possono essere completate nello stesso lasso di tempo delle valutazioni ottenute con la NCCT (7). La riduzione del tempo di esecuzione della MRI è un'area di ricerca attiva e sono stati sviluppati protocolli che riducono il tempo di acquisizione da 15–20 min fino a 5 min (23, 24).

Nonostante i progressi nel campo della neurodiagnostica per immagini, esistono delle limitazioni intrinseche alla CT e alla MRI. Dal punto di vista logistico è significativo che la diagnostica per immagini generalmente richieda un tempo considerevole per l'esecuzione e l'interpretazione clinica. Inoltre, la valutazione delle immagini radiologiche è soggetta a variabilità intraindividuale (25-27). A differenza dei biomarcatori, la strumentazione richiesta per eseguire esami di CT o MRI non sarà verosimilmente mai disponibile sul campo, dove questa informazione sarebbe di importanza capitale.

INTERVENTI TERAPEUTICI NELL'ICTUS

Una terapia trombolitica efficace deve essere iniziata rapidamente per salvare la maggior quantità possibile di tessuto cerebrale. La somministrazione per via endovenosa dell'attivatore del plasminogeno tissutale ricombinante (rtPA) ha rivoluzionato la terapia dell'ictus acuto fin dalla sua approvazione da parte della "Food and Drug Administration" (FDA) americana nel 1996 ed è stata costantemente utilizzata per la trombolisi nell'ictus acuto. La finestra terapeutica dei trombolitici è di 4,5 ore dall'insorgenza dei sintomi (28), e quindi il tempo di diagnosi è critico. Inoltre, esiste un'ampia lista di controindicazioni alla somministrazione di rtPA, particolarmente nei pazienti che hanno avuto ictus, trauma cranico o infarto del miocardio nei 3 mesi precedenti, convulsioni, ipertensione, ipoglicemia, sintomi di SAH o evidenza di ICH sui reperti di diagnostica per immagini, oppure piastrinopenia.

Negli Stati Uniti il 22% dei pazienti con ictus ischemico si presenta al Pronto Soccorso entro 3 ore, ma solo 8% di questi soggetti soddisfa tutti i criteri di eligibilità alla terapia con rtPA (29-31). Si raccomanda che il trattamento con rtPA nei pazienti eligibili non venga ritardato, ma sia eseguito prima delle indagini radiologiche, in quanto è stato dimostrato che i benefici di questo approccio sono maggiori dei rischi (7). Se l'ictus fosse diagnosticato più precocemente o con maggiore certezza, le opzioni terapeutiche potrebbero essere notevolmente aumentate. Inoltre, l'intervento terapeutico rimane un ambito per il quale riveste una grande importanza la differenziazione assolutamente certa tra ictus ischemico e ICH, poiché la misclassificazione di un'ICH come ictus ischemico potrebbe risultare letale, se a causa dell'errore diagnostico si somministrassero farmaci trombolitici.

LA NECESSITÀ DI BIOMARCATORI DI ICTUS

I biomarcatori di infarto cerebrale potrebbero poten-

zialmente modificare e accelerare la diagnosi differenziale e predire l'ictus, particolarmente nei casi dubbi dove i riscontri neuroradiologici appaiono normali o ambigui. Le difficoltà nella ricerca di biomarcatori ruotano intorno al lento rilascio di proteine gliali e neuronali attraverso la barriera emato-encefalica dopo un ictus o una lesione traumatica. Inoltre, i marcatori di ischemia cerebrale possono mancare di specificità diagnostica e sono aumentati in numerose situazioni cliniche che simulano l'ictus. Il marcatore ideale di ictus dovrebbe mostrare caratteristiche quali specificità e sensibilità diagnostica per l'infarto, capacità di differenziare tra ictus emorragico e ischemico, un precoce e stabile rilascio subito dopo l'infarto, una "clearance" plasmatica prevedibile, la potenzialità di definire il rischio e di guidare le scelte terapeutiche e la caratteristica di essere misurato quantitativamente e rapidamente con tecniche dal rapporto costo-beneficio ottimale.

Il miglioramento prognostico dei pazienti nell'ambito dell'ictus acuto richiede una rapida e accurata diagnosi di ictus, ed è evidente che biomarcatori di ictus potrebbero essere potenzialmente di aiuto sia per predire il rischio di ictus che per diagnosticarlo. Qui di seguito valutiamo alcuni dei biomarcatori proposti sulla base dei risultati positivi e negativi di studi di ricerca sperimentali e di sperimentazioni cliniche.

BIOMARCATORI DI RISCHIO E DIAGNOSI DI ICTUS

Fosfolipasi A2 associata alle lipoproteine

La fosfolipasi A2 associata alle lipoproteine (Lp-PLA2) è una serin-lipasi calcio-indipendente di 50 kDa che idrolizza i fosfolipidi ossidati per rilasciare lisofosfatidilcolina proinfiammatoria e acidi grassi ossidati (32). Lp-PLA2 lega le LDL e circola legata ad esse, particolarmente alle LDL piccole e dense. In funzione del suo grado di glicosilazione, Lp-PLA2 può anche legare le HDL piccole e dense, contribuendo ad un meccanismo anti-aterogeno. Lp-PLA2 è prodotta ed espressa nelle lesione aterosclerotiche ricche di macrofagi ed è marcatamente sovraregolata nelle lesioni coronariche avanzate. La FDA ha autorizzato l'utilizzo del dosaggio di Lp-PLA2 per la definizione del rischio a lungo termine di malattia coronarica e di ictus; un suo aumento conferisce un aumento del rischio di insorgenza di ictus di circa 2 volte (33) e di recidiva di ictus con un tasso di rischio (HR) corretto per altri fattori di 2,54 (95% intervallo di confidenza (CI): 1,01–6,39) (34). Sulla base degli esiti di numerosi e ampi studi clinici, Lp-PLA2 è emersa come marcatore infiammatorio indipendente di rischio cardiovascolare e predittore di eventi di ictus ischemico.

Un'associazione positiva tra concentrazione plasmatica di Lp-PLA2 e rischio di ictus ischemico è stata dimostrata nello studio clinico Rotterdam, uno studio retrospettivo-prospettico su quasi 8000 uomini e donne di età superiore a 55 anni. In questa coorte, durante il monitoraggio (mediana, 6,4 anni) a 110 soggetti era diagnosticato un ictus ischemico e l'HR, corretto per età e sesso, era pari a 2,0 tra il primo e il quarto quartile di Lp-PLA2 misurata come attività (35). I parametri lipidici (colesterolo totale e non-HDL) erano identici nei pazienti con ictus rispetto ai controlli. Lo studio "Atherosclerosis Risk in Communities" (ARIC), strutturato in maniera simile, ha identificato, in un "follow-up" di 6 anni, 194 casi di ictus ischemico e rilevato differenze significative tra la concentrazione plasmatica basale media di Lp-PLA2 dei pazienti con ictus e quella del gruppo di controllo (443 e 374 µg/L, rispettivamente, P <0,001) (36). In questo studio, le concentrazioni di Lp-PLA2 e proteina C reattiva (CRP) sono risultate complementari nell'identificare il rischio di ictus; i soggetti con Lp-PLA2 nel terzo terzile (≥422 µg/L) e CRP >3 mg/L hanno mostrato un rischio di ictus ischemico più di 11 volte maggiore rispetto a quelli con Lp-PLA2 nel primo terzile (<310 µg/L) e CRP <1 mg/L (36). A prescindere dalla concentrazione di colesterolo LDL, Lp-PLA2 è risultata un predittore indipendente di ictus (HR 2,08; 95% CI: 1,20–3,62), suggerendo che nonostante Lp-PLA2 sia trasportata dalle LDL, la sua presenza può indurre un rischio differente rispetto alle sole LDL.

Lo studio clinico "Women's Health Initiative" (WHI) ha valutato in 40 differenti centri clinici degli Stati Uniti il rischio prospettico di ictus ischemico in donne in postmenopausa a basso rischio, ottenendo risultati meno entusiasmanti (37). In questa popolazione, il rischio di un ictus incidentale è stato significativamente maggiore nelle partecipanti allo studio con Lp-PLA2 aumentata rispetto ai controlli (38). Tuttavia, il rischio relativo, espresso per DS di aumento del rischio di ictus ischemico, è risultato pari a 1,07 (95% CI: 1,01–1,14), con la significatività dovuta alla maggiore incidenza di ictus dei grandi, ma non dei piccoli vasi. Ancora, in contrasto con altri studi, non c'era associazione tra rischio di ictus e aumento delle concentrazioni di CRP.

I metodi per la Lp-PLA2 possono misurarne sia la massa proteica che l'attività e c'è poca corrispondenza relativamente al tipo di saggio, utilizzato tra uno studio e l'altro. Attualmente, un solo saggio per la determinazione di massa della Lp-PLA2 è autorizzato dalla FDA (metodo PLAC, diaDexus), mentre tutti i saggi di attività sono disponibili unicamente a scopo di ricerca. Le determinazioni di massa e di attività della Lp-PLA2 non sono ben correlate, verosimilmente a causa della diversità del substrato utilizzato nei saggi di attività. I risultati dei saggi di attività dipendono dal substrato e non è chiaro come le altre fosfolipasi plasmatiche interagiscano con il substrato utilizzato; questa fonte di potenziale variabilità analitica non è stata ben caratterizzata. È da notare che il dosaggio di massa della Lp-PLA2 può avere a sua volta dei limiti analitici: gli studi che hanno utilizzato la determinazione di massa hanno ottenuto conclusioni diverse, forse imputabili alla instabilità, ancora in discussione, degli attuali saggi di terza generazione (39). Se le strategie di riduzione della concentrazione di Lp-PLA2 mediante inibitori specifici, come il darapladib, assunti per os, dimostreranno di apportare un beneficio nella riduzione del rischio cardiovascolare e di ictus, divente-

rà critico che si raggiunga la standardizzazione dei saggi di massa e attività. Sebbene una completa caratterizzazione analitica sia necessaria per portare la Lp-PLA2 ad un utilizzo clinico ottimale, le evidenze disponibili indicano che essa è un marcatore potenzialmente importante per la definizione del rischio di ictus.

Dimetilarginina asimmetrica

Le metilarginine sono sintetizzate dalla metilazione post-traduzionale della L-arginina e, dopo proteolisi, sono rilasciate come dimetilarginine libere. La dimetilarginina asimmetrica (ADMA) e la dimetilarginina simmetrica (SDMA) sono rilevabili nel sangue, nelle urine e nel CSF. Mentre la SDMA è inattiva, l'ADMA è un potente inibitore della ossido nitrico sintasi, che funge da mediatore per la disfunzione endoteliale diffusa. Quindi si ipotizza che l'aumento della concentrazione plasmatica di ADMA sia un marcatore per predire il rischio di ictus ed è stato associato con altri tradizionali fattori di rischio cardiovascolari come ipertensione (40-42), diabete (43, 44), iperomocisteinemia (45-47), ipertrofia ventricolare sinistra (43, 48) e ipercolesterolemia (49-51). ADMA è quantificata accuratamente in ELISA o HPLC/cromatografia liquida–spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS), metodi che raggiungono la precisione necessaria e sono in grado di separare ADMA dagli altri isomeri di struttura.

In numerosi studi clinici è stato dimostrato che l'ADMA plasmatica correla con il rischio di ictus. Yoo e Lee (52) hanno arruolato 52 pazienti con ictus e 36 controlli sani e hanno dimostrato che le concentrazioni di ADMA erano significativamente differenti tra i pazienti con ictus recidivante (media 2,28 µmol/L), ictus iniziale (media 1,46 µmol/L) e i controlli (media 0,93 µmol/L) (P=0,0001). Incrementi oltre il 90° percentile di distribuzione del gruppo di controllo (≥1,43 µmol/L) aumentavano il rischio totale di ictus nella popolazione anziana studiata ["odds ratio" (OR) 6,05, 95% CI: 2,77–13,3, P=0,02]. Il "Population Study of Women in Gothenberg" ha valutato l'ADMA in 880 donne e ha dimostrato che piccoli aumenti (0,15 µmol/L) di ADMA lungo un periodo di 24 anni si associavano ad un aumento del 30% di ictus e infarti del miocardio e che le concentrazioni di ADMA nel quintile più alto (≥0,71 µmol/L) conferivano il rischio relativo (RR) più elevato (1,75, 95% CI: 1,18–2,59) (53). Ancora, lo studio "Framingham Offspring" ha valutato le concentrazioni plasmatiche di ADMA in 2013 soggetti dei quali erano contemporaneamente disponibili le valutazione di neurodiagnostica per immagini (54). ADMA è stata indipendemente associata (OR tra il quartile 1 e i quartili 2–4: 1,43, 95% CI: 1,00–2,04) all'aumentata prevalenza di alterazioni strutturali e lesioni ischemiche silenti alla MRI, che è un significativo fattore di rischio per l'ictus.

In generale, ADMA sembra essere un nuovo biomarcatore correlato a mortalità cardiovascolare generale, disfunzione endoteliale e rischio di ictus, ma ulteriori studi sono chiaramente necessari per validarne l'utilità clinica.

Metalloproteinasi di matrice 9 (MMP-9)

Le metalloproteinasi di matrice (MMPs) sono una famiglia di endopeptidasi zinco- e calcio-dipendenti responsabili del ricambio e della degradazione delle proteine della matrice extracellulare. La regolazione dell'attività delle MMPs è importante per il rimodellamento tissutale, l'infiammazione, l'angiogenesi e la metastatizzazione delle cellule tumorali (55, 56). Secrete come zimogeni (pro-MMPs), le MMPs sono attivate da differenti proteinasi e la loro attività è largamente regolata dalla interazione con gli inibitori tissutali delle metalloproteinasi (TIMPs) e dalla α_2-macroglobulina. L'espressione della MMP-9 nel tessuto cerebrale è fisiologicamente molto ridotta o non rilevabile, ma aumenti di MMP-9 sono stati dimostrati nel cervello ischemico (57, 58). Si ipotizza che la sovraregolazione di MMP-9, che avviene nel cervello in risposta ad una lesione, rivesta un ruolo patologico centrale nell'ictus attraverso la degradazione delle proteine della matrice extracellulare che sono essenziali per mantenere l'omeostasi. Dopo l'insorgenza dell'ictus, l'incontrollata espressione e l'attività delle MMP fungono da mediatori della proteolisi e causano la perdita di integrità della barriera emato-encefalica e la necrosi cellulare (59-62).

La cinetica di rilascio della MMP-9 non è ben caratterizzata, ma incrementi si osservano già alla presentazione al Pronto Soccorso sia in pazienti con ictus ischemico che emorragico rispetto ai soggetti sani, il che depone per un periodo di tempo relativamente breve (ore) intercorrente dal rilascio alla rilevazione in circolo (63, 64). Le concentrazioni di MMP-9 in fase acuta sono state anche correlate con la dimensione dell'infarto, la prognosi neurologica sfavorevole e le complicazioni da trasformazione emorragica (63, 65, 66). Le concentrazioni di MMP-9, valutate all'ingresso in ospedale, sono state identificate come predittive della dimensione dell'infarto misurato con la MRI con tecnica di contrasto pesato in diffusione (67) e il biomarcatore ulteriormente correlato alla crescita della lesione da ictus, anche in concomitanza con l'applicazione efficace della terapia trombolitica (68). Inoltre, uno studio iniziale ha suggerito che le concentrazioni di MMP-9 sono aumentate in pazienti trattati con rtPA rispetto ad altri trattamenti come l'ipotermia, suggerendo un possibile fenomeno di "washout" (69). Uno studio più recente ha confermato che le concentrazioni circolanti di MMP-9 in pazienti trattati con rtPA erano significativamente più alte di quelle di pazienti non trattati (70). In accordo con l'ipotesi di effetti deleteri delle MMP durante l'ictus ischemico, le concentrazioni circolanti di MMP-9 in fase iperacuta si sono dimostrate predittive di ulteriori complicazioni emorragiche dopo somministrazione di rtPA (67). Dal punto di vista tecnico, tutti i metodi per la determinazione di MMP-9 sono immunodosaggi enzimatici, che non sono standardizzati; quindi, i livelli decisionali e le caratteristiche analitiche dei saggi non possono essere confrontate tra uno studio e l'altro.

MMP-9 verosimilmente svolge un doppio ruolo nella patogenesi dell'ictus, che comprende da un lato la perdita di integrità della barriera emato-encefalica, la morte

dei neuroni e l'emorragia successiva all'ictus, e dall'altro un ruolo riparativo durante la rigenerazione cerebrale e il rimodellamento neurovascolare nella successiva fase di riparazione tissutale. I dati sperimentali e clinici sulle MMPs sono promettenti in quanto la maggior parte degli studi dimostra una chiara correlazione tra MMPs e MRI e gli esiti neurologici nell'ictus.

Proteina S100 β

La S100 β (S100B) è una proteina gliale a basso PM (~10 kDa) che appartiene alla famiglia multigenica delle proteine che hanno il calcio come mediatore (proteine S100), così chiamate per la loro solubilità in ammonio solfato al 100% (71). Varie combinazioni di subunità (α e β) formano la famiglia delle proteine S100, che differiscono in forme etero- e omodimeriche delle subunità α–α, α–β e β–β. S100B comprende le forme β–β e α–β, è altamente specifica per il tessuto nervoso e si trova in abbondanza nel compartimento astrogliale cerebrale, nelle cellule di Schwann che rivestono le fibre nervose periferiche e, al di fuori del sistema nervoso, in melanociti, adipociti e condrociti (72). Si ipotizza che S100B sia un marcatore generico di disfunzione della barriera emato-encefalica piuttosto che un marcatore specifico di danno gliale in considerazione della sua ampia localizzazione in vari tipi cellulari (73). S100B è rilasciata nel CSF in seguito a un danno strutturale delle cellule neuronali, ma il meccanismo che sta alla base del passaggio attraverso la barriera emato-encefalica non è stato chiaramente delucidato. La concentrazione di S100B è 40 volte più alta nel CSF che nel siero. Il biomarcatore non è influenzato dall'emolisi e ha una eccezionale stabilità (74), caratteristiche che lo rendono interessante per l'utilizzo come biomarcatore clinico.

Molti studi hanno dimostrato che le concentrazioni nel siero di S100B sono aumentate significativamente in seguito ad ictus (75-82), con la secrezione di S100B che aumenta fino a 48 ore dopo l'insorgenza dei sintomi e il picco di concentrazione che viene raggiunto entro le prime 24 ore dopo l'infarto cerebrale. Elting et al. (78) hanno segnalato che i pazienti che mostravano un TIA o tessuto cerebrale nella norma alla CT eseguita alla presentazione, avevano concentrazioni di S100B significativamente più basse, con minime variazioni nel tempo, in confronto a soggetti che avevano deficit neurologici maggiori e alla diagnostica per immagini mostravano un infarto delle grandi arterie corticali. L'ovvia limitazione all'utilizzo diffuso della S100B nelle situazioni acute dipende dal suo rilascio nel sangue, apparentemente ritardato e protratto nel tempo. Al momento, la mancanza di sensibilità diagnostica della S100B sierica preclude il suo impiego diagnostico nelle situazioni di ictus acuto.

Correlazioni significative tra le concentrazioni circolanti di S100B e la dimensione dell'area infartuale sono state dimostrate in vari studi clinici o sperimentali sull'ischemia focale. Jonsson et al. (83) hanno dimostrato che l'area della lesione era strettamente correlata con le concentrazioni di S100B misurate 48 ore dopo un intervento cardiochirurgico, nei casi con ischemia focale come complicazione secondaria. Qualche studio ha riportato una correlazione diretta tra la gravità dell'ictus e le concentrazioni di S100B. Jauch et al. (80) hanno scoperto che concentrazioni più elevate di S100B sono associate in maniera statisticamente significativa (r^2=0,263, P <0,0001) con punteggi basali più alti di indice NIHSS. Hill et al. (84) hanno anche dimostrato che le concentrazioni al picco di S100B erano significativamente correlate con i punteggi NIHSS all'ammissione.

Un aumento di S100B nel sangue non è specifico di infarto cerebrale, in quanto si registrano aumenti anche in altre patologie neurologiche, come il danno cerebrale traumatico e tumori extracranici, che possono quindi portare ad una interpretazione distorta dei risultati (72, 85, 86). Complessivamente, la prestazione clinica di S100B non è brillante nella diagnosi e nella differenziazione tra ictus ischemico, ictus emorragico e patologie che simulano l'ictus. Quindi, non sembra che S100B potrà essere un biomarcatore utile nel contesto clinico dell'ictus e la sua determinazione può essere riservata alla valutazione di lesione e di trauma cerebrale.

Peptidi recettori dell'acido N-metil-D-aspartico e loro anticorpi

I recettori dell'acido N-metil-D-aspartico (NMDA) legano il neurotrasmettitore glutammato e sono, strutturalmente eterogenei, presenti sui neuroni di ogni parte del cervello. I recettori del NMDA tipicamente contengono 4 subunità, 2 NR1 e 2 NR2, e si ritiene che, nel contesto di ischemia o neurotossicità cerebrale, avvenga la frammentazione di NR2 in NR2A e NR2B. La produzione di anticorpi anti-recettore del NMDA (NR2Abs) è mediata dal sistema immunitario in seguito ad eventi ischemici e sia questi anticorpi che gli stessi frammenti del peptide NR2 possono essere quantificati nel CSF e nel sangue.

Qualche studio clinico ha esaminato il ruolo dei NR2Abs e dei peptidi derivati da NR2 come marcatori di ictus. Utilizzando un saggio ELISA, Dambinova et al. (87) hanno misurato gli autoanticorpi contro i frammenti NR2A e 2B in 105 pazienti con ictus o TIA e in 255 controlli. Gli NR2Abs sono stati rilevati in quantità significativamente più alta nei pazienti con ictus ischemico e TIA rispetto ai controlli (P <0,0001), ma le concentrazioni di anticorpo non erano in grado di differenziare l'ictus ischemico dal TIA. Gli NR2Abs non erano aumentati nei pazienti con ICH o nel gruppo di controllo, suggerendo che un risultato negativo di NR2Abs non esclude un'ICH. In questo caso, la diagnostica per immagini rimarrebbe quindi la procedura diagnostica raccomandata. Al livello decisionale ≥2,0 µg/L è stata rilevata un'elevata sensibilità (97%) e specificità (98%) per la diagnosi di ictus ischemico o TIA entro 3 ore dall'esordio della sintomatologia. Il valore predittivo positivo è stato 86% per l'ictus ischemico e 91% per il TIA e il valore predittivo negativo di 98% per entrambe le patologie. Concentrazioni aumentate di autoanticorpi si sono osservate in soggetti ipertesi e in soggetti con anamnesi positiva per ictus o aterosclerosi. Poiché questi ultimi fattori sono predittivi di

rischio di ictus, non era tuttavia chiaro se la concentrazione aumentata di autoanticorpi riflettesse gli attuali episodi di ictus in atto o fosse un potenziale fattore predittivo di futuri eventi cerebrovascolari. In uno studio clinico prospettico multicentrico, le concentrazioni di NR2Abs sono state valutate per la capacità di predire complicazioni neurologiche avverse in 557 pazienti sottoposti a chirurgia coronarica (88). Solo 25 pazienti avevano una concentrazione preoperatoria di NR2Abs ≥2,0 µg/L, ma 24 su 25 avevano sviluppato complicazioni neurologiche entro 48 ore dall'intervento (RR 17,9; 95% CI: 11,6–27,6). Pertanto, gli NR2Abs possono risultare utili per predire eventi neurologici in soggetti ad alto rischio.

In vivo la produzione di autoanticorpi richiede intrinsecamente un certo lasso di tempo, limitando potenzialmente l'utilità della determinazione degli NR2Ab nel siero immediatamente dopo l'insorgenza dei sintomi di ictus. Perciò, i frammenti del peptide NR2 potrebbero dimostrarsi un marcatore più adatto da determinare, in quanto si formano verosimilmente subito dopo l'evento ischemico. La determinazione del recettore del NMDA promette di essere un potenziale biomarcatore di ictus, ma è necessario replicare i risultati in più ampi studi clinici multicentrici per eliminare ogni potenziale errore sistematico di valutazione.

Proteina acidica fibrillare gliale

La proteina acidica fibrillare gliale (GFAP) è una proteina filamentosa monomerica specifica degli astrociti del cervello (89). Benché l'esatto ruolo della GFAP sia sconosciuto, essa è coinvolta in vari processi cellulari dei neuroni ed è in parte responsabile delle funzioni neurologiche all'interno della barriera emato-encefalica. Iniziali studi clinici sulla GFAP hanno dimostrato che le sue concentrazioni nel siero sono aumentate nei pazienti con ictus ischemico rispetto ai controlli, con il picco di concentrazione che si registra 2-4 giorni dopo l'insorgenza della sintomatologia (90-92). Il rilascio prolungato e la specificità di GFAP hanno condotto a ipotizzare un suo impiego nella differenziazione dell'ictus, in quanto l'insorgenza di ICH è tipicamente rapida e ogni danno parenchimale può esitare in una fuoriuscita di GFAP dalle cellule astrogliali.

Uno studio prospettico di Foerch et al. (93) ha coinvolto 135 pazienti ricoverati in ospedale entro 6 ore dall'esordio dei sintomi di ictus. I campioni di sangue sono stati prelevati immediatamente dopo il ricovero e ai pazienti è stato diagnosticato un ictus emorragico o ischemico sulla base dei risultati della CT o della MRI. Utilizzando un immunodosaggio enzimatico automatizzato, la GFAP è stata rilevata nel siero del 81% dei pazienti con ICH, rispetto a solamente il 5% dei pazienti con ictus ischemico. Inoltre, le concentrazioni di GFAP sierica sono risultate molto più alte nei pazienti con ICH, con un valore medio rilevato di 111,6 ng/L rispetto a 0,4 ng/L nei pazienti con ictus ischemico (P <0,001). Al livello decisionale di 2,9 ng/L, la sensibilità diagnostica della GFAP era del 79% e la specificità nella diagnosi differenziale tra ICH e ictus ischemico era del 98% (P <0,001). In uno studio successivo dello stesso gruppo, è stato stabilito che, per distinguere tra ICH e ictus ischemico, la finestra diagnostica della GFAP era compresa tra 2 e 6 ore dall'insorgenza della sintomatologia dell'ictus (94). L'accuratezza diagnostica all'interno di questa finestra era compresa tra 83% e 88%. La GFAP dimostrava una bassa sensibilità diagnostica nelle prime due ore dall'esordio dei sintomi, sebbene solo una piccola percentuale di pazienti sia stata valutata clinicamente o ricoverata in ospedale entro questo intervallo di tempo.

Una valutazione multicentrica di S100B, enolasi neuron-specifica (NSE), GFAP e del complesso proteina C attivata–proteina C inibitore (APC-PCI) ha dimostrato, in una coorte di 97 pazienti con ictus, una significativa capacità della GFAP di distinguere tra ICH e ictus ischemico (P=0,005), un risultato non rilevato per S100B (P=0,13), NSE (P=0,67) o APC-PCI (P=0,84) (95). Inoltre, la combinazione di GFAP e APC-PCI con il punteggio NIHSS ha prodotto una sensibilità diagnostica e un valore predittivo negativo del 100%, permettendo una rapida diagnosi di esclusione di ICH e un potenziale più precoce inizio della terapia con rtPA.

Gli unici metodi disponibili per la determinazione di GFAP sono immunodosaggi enzimatici che attualmente non sono standardizzati. La GFAP ha dimostrato interessanti riscontri clinici preliminari e sembra essere un promettente marcatore nell'ictus emorragico, con le potenzialità per un ulteriore utilizzo all'interno di pannelli multimarcatore.

PARK7

La proteina PARK7 (conosciuta anche come DJ-1) è stata inizialmente scoperta come un oncogene (96) e successivamente riconosciuta come un gene autosomico recessivo correlato alla malattia di Parkinson (97). La complessità dei meccanismi biologici di PARK7 non è conosciuta, ma le ipotesi correnti ruotano intorno al suo ruolo riparativo del danno neurologico nei processi di stress ossidativo. Lescuyer et al. (98) hanno identificato PARK7 a partire da un gruppo di proteine che sono aumentate nel CSF dopo la morte in confronto alla loro concentrazione prima della morte. Ulteriori analisi delle concentrazioni plasmatiche di PARK7, determinate utilizzando un saggio ELISA, hanno dimostrato aumenti significativi nei pazienti con ictus rispetto ai controlli (P <0,001), con l'aumento delle concentrazioni che avveniva comunque tra 30 min e 3 ore dopo l'insorgenza della sintomatologia (99). Utilizzando un livello decisionale di 14,1 µg/L, PARK7 ha raggiunto una sensibilità diagnostica del 54% e una specificità del 90%. Aumenti di PARK7 non hanno accuratamente differenziato il tipo di ictus (ischemico, emorragico o TIA); quindi, un risultato elevato non permetterebbe di instaurare rapidamente la terapia con rtPA, senza ulteriori indagini di diagnostica per immagini per escludere l'ICH. Ulteriori studi sono necessari per analizzare e ottimizzare le prestazioni diagnostiche di PARK7 nell'ambito clinico dell'emergenza.

Nucleoside difosfato chinasi A

Le chinasi A del nucleoside difosfato (NDKA) sono

enzimi che catalizzano lo scambio di gruppi fosfato tra i vari nucleosidi difosfati. NDKA è espressa nei neuroni e si ritiene che sia coinvolta nella cascata ischemica che segue l'ictus. NDKA è stata identificata e studiata insieme a PARK7 dallo stesso gruppo di ricerca mediante un metodo ELISA (98, 99). Come per PARK7, le concentrazioni plasmatiche di NDKA sono aumentate precocemente dopo l'esordio dei sintomi. La sensibilità diagnostica riportata per NDKA è leggermente migliore (67%) rispetto a PARK7, con una specificità comparabile (90%). Analogamente ad altri biomarcatori menzionati, la complessiva mancanza di sensibilità diagnostica preclude l'impiego abituale di NDKA nell'ictus; tuttavia, l'eccellente specificità di NDKA può giustificare ulteriori studi che la valutino all'interno di un pannello di più marcatori.

Altri biomarcatori

La Tabella 3 elenca altri biomarcatori che sono stati investigati, da soli o in combinazione, nel contesto dell'ictus. In generale, i biomarcatori elencati nella Tabella sono piuttosto aspecifici per ictus e, di fatto, anche per altri processi fisiologici. Benché non esistano né un'ampia letteratura a supporto, né dati relativi alle caratteristiche di questi marcatori in termini di prestazione analitica e diagnostica, essi potrebbero in futuro rivestire un ruolo nella diagnosi, prognosi e trattamento dell'ictus.

RUOLO DELLA STRATEGIA MULTIMARCATORE

Attualmente non esiste alcun singolo biomarcatore

Tabella 3
Miscellanea di biomarcatori proposti per la diagnosi di ictus

Meccanismo e biomarcatore	Funzione fisiologica	Riferimenti bibliografici
Infiammazione		
CRP	Proteina di fase acuta, parte della risposta immunitaria innata	Andersson et al. (110), Kaplan et al. (111)
VCAM-1	Lega i monociti e i linfociti	Lynch et al. (101)
MCP-1	Potente chemoattrattore delle cellule mononucleate prodotto dalle cellule endoteliali e muscolari lisce	Reynolds et al. (100)
Dislipidemia/danno endoteliale		
Apo C-I	Associata a LDL e VLDL; coinvolta nel rimodellamento delle lipoproteine plasmatiche; inibisce CETP	Allard et al. (112)
Apo C-III	Associata a VLDL, HDL e LDL; inibisce l'idrolisi dei trigliceridi per mezzo della lipasi lipoproteica/epatica; interferisce con la funzione endoteliale fisiologica	Allard et al. (112)
BNP	Polipeptide secreto dal miocardio con attività natriuretica, diuretica e vasodilatativa	Makikallio et al. (113), Montaner et al. (114)
FABP	Proteina citoplasmatica che modula la cascata di "signaling" lipidico; coinvolta nell'ossidazione degli acidi grassi	Wunderlich et al. (115), Pelsers et al. (116)
Fattori di crescita		
BDNF	Responsabile della sopravvivenza e del mantenimento dei neuroni maturi	Reynolds et al. (100)
Danno endoteliale		
MBP	Principale proteolipide costituente della mielina, prodotto dalle cellule della oligodendroglia	Jauch et al. (80), Hill et al. (84)
NSE	Isoenzima glicolitico dimerico presente nel citoplasma dei neuroni e delle cellule neuroendocrine	Unden et al. (95), Anand e Stead (117)
Coagulazione/fibrinolisi		
D-dimero	Prodotto di degradazione della fibrina, riflette un'attivazione globale della coagulazione e della fibrinolisi	Laskowitz et al. (103), Barber et al. (118)
Fattore di von Willebrand	Glicoproteina di adesione multimerica importante per le interazioni emostatiche delle piastrine	Barber et al. (119), Folsom et al. (120)

CRP, proteina C reattiva; VCAM, molecola di adesione cellulare vascolare; MCP, proteina chemiotattica dei monociti; Apo, apolipoproteina; CETP, proteina che trasferisce gli esteri del colesterolo; BNP, peptide natriuretico di tipo B; FABP, proteina legante gli acidi grassi; BDNF, fattore neurotrofico derivato dal cervello; MBP, proteina basica della mielina; NSE, enolasi neurone specifica.

che possa essere selezionato per un impiego ordinario nell'ambito della diagnosi, differenziazione e predizione del rischio di ictus acuto. Pannelli di più marcatori sono stati sviluppati e investigati nel tentativo di aumentare la sensibilità e la specificità diagnostica. Affinchè una strategia multimarcatore abbia successo, essa dovrebbe fornire informazioni aggiuntive alla diagnosi clinica e produrre risultati rapidi, con strumentazione facile da usare e buon rapporto costo/beneficio.

Reynolds et al. (100) hanno esaminato una coorte di 223 pazienti con ictus usando un pannello di marcatori che includeva S100B, fattore neurotrofico di crescita di tipo-B, fattore di von Willebrand, MMP-9 e proteina 1 chemiotattica dei monociti. Gli Autori hanno anche reclutato 214 controlli sani e misurato nel siero 50 biomarcatori. La combinazione dei 5 marcatori ha raggiunto sui campioni ottenuti nelle prime 12 ore dall'insorgenza dei sintomi una sensibilità (91%) e una specificità (97%) per la diagnosi di ictus ischemico acuto più elevate in confronto all'utilizzo isolato di ogni marcatore. Un secondo studio ha esaminato un pannello di 26 marcatori in una coorte di 65 pazienti con sospetto ictus ischemico e 157 controlli (101). Una sensibilità e una specificità diagnostiche del 90% nel predire l'ictus erano riportate combinando S100B, MMP-9, molecola di adesione cellulare vascolare e fattore di von Willebrand. In entrambi gli studi, la maggior parte dei controlli erano soggetti appaiati per età, ma senza nessun sintomo neurologico e questo ne rappresentava una limitazione.

Laskowitz et al. (102) hanno esaminato un pannello di marcatori che includeva D-dimero, CRP, peptide natriuretico di tipo B (BNP), MMP-9 e S100B su 130 pazienti. La coorte era caratterizzata dalla presentazione entro 6 ore dall'insorgenza dei sintomi e includeva soggetti con sospetto ictus acuto e con patologie che simulano l'ictus. Gli Autori hanno riportato una sensibilità (81%) e una specificità (70%) nel diagnosticare l'ictus ischemico più basse di quelle dei due studi precedenti. Lo stesso gruppo ha condotto uno studio prospettico multicentrico che ha valutato l'efficacia diagnostica dello stesso pannello di marcatori, esclusa la CRP, utilizzando il kit denominato "Triage Stroke Panel" sul sistema "point-of-care" Triage (Biosite Inc.) in più di 1100 pazienti con sospetto di ictus alla presentazione in ospedale (103). Il tempo trascorso dall'insorgenza dei sintomi era <24 ore. La sensibilità (86%) e la specificità (37%) diagnostiche del solo pannello nel distinguere tra ictus e sindromi che simulano l'ictus, anche se non ottimali, potrebbero permettere un intervento clinico precoce in alcuni pazienti. I livelli decisionali di ciascun marcatore utilizzati nel pannello per calcolare la probabilità di ictus non sono noti.

Due eccellenti revisioni sistematiche sui biomarcatori di ictus nella prognosi e nella diagnosi di ictus ischemico sono state recentemente pubblicate da Whiteley et al. (104, 105); in particolare, la revisione relativa alla diagnosi ha esaminato 21 studi che hanno valutato 58 biomarcatori singoli e sette pannelli di più marcatori. Una sensibilità o una specificità diagnostica elevate sono state dimostrate per la maggior parte dei biomarcatori quando utilizzati da soli; tuttavia, il disegno degli studi e la presentazione dei dati mostravano limiti rilevanti, che hanno impedito di raccomandare uno specifico marcatore per l'impiego clinico. I difetti comuni agli studi, indicati nella revisione, comprendevano piccole dimensioni, scarsa attenzione alla scelta dei criteri clinici utilizzati come "gold standard" e alla selezione della popolazione di controllo, livelli decisionali per la diagnosi non chiari e una complessiva mancanza di definizione delle caratteristiche analitiche e di validazione clinica dei biomarcatori proposti (104). Nessuno degli studi sui pannelli a più marcatori ha fornito equazioni di regressione per determinare la probabilità di ictus e vari livelli decisionali sono stati utilizzati per lo stesso marcatore. Inoltre, i tempi di prelievo sono spesso caduti al di fuori della finestra terapeutica. Sono stati investigati numerosi biomarcatori, da soli o all'interno di un pannello, ma non sono disponibili una sufficiente quantità di letteratura a supporto, né dati relativi alle caratteristiche di prestazione di questi marcatori (Tabella 3).

Un gruppo di biomarcatori efficaci, utilizzati all'interno di una strategia multimarcatore, avrebbe enormi potenzialità di migliorare il processo di inquadramento iniziale dell'ictus e modificarne positivamente gli esiti clinici, economici e gestionali. Tuttavia, non ci sono ancora stati studi che abbiano valutato o simulato, in maniera esauriente, gli aspetti economici confrontando una strategia a singolo marcatore con una a più marcatori nell'ambito dell'ictus. La determinazione dei marcatori cardiaci in "point-of-care" per la diagnosi di infarto acuto del miocardio ha dimostrato vantaggi economici e gestionali in numerosi studi (106-108), ma deve essere ancora dimostrato un impatto sull'esito clinico dei pazienti (109). Una quantificazione accurata del potenziale impatto e del beneficio degli esami di laboratorio risulta difficile in quasi tutte le situazioni cliniche a causa della complessità del sistema di assistenza sanitaria e dell'inevitabile intreccio di potenziali variabili nelle equazioni finanziarie.

CONCLUSIONI

Questa rassegna illustra lo state dell'arte della diagnosi di ictus ed esamina numerosi potenziali marcatori utilizzabili per stratificare il rischio, predire e diagnosticare l'ictus. E' evidente che è necessario ancora molto lavoro prima che i biomarcatori candidati più promettenti possano essere introdotti nella pratica del laboratorio clinico. Poiché la chiave è che i risultati apportino un vantaggio clinico, l'obiettivo principale per i nuovi marcatori di ictus dovrebbe essere la loro disponibilià il più vicino possibile al paziente. In teoria, lo sviluppo di metodi "point-of-care" ha l'impatto potenzialmente maggiore sul trattamento e la gestione dell'ictus e dovrebbe rappresentare una priorità nello sviluppo dei marcatori. Si dovrebbe dimostrare che ogni nuovo biomarcatore aggiunga un'informazione indipendente alla valutazione clinica e alla diagnostica per immagini.

I futuri studi di valutazione di nuovi marcatori di ictus dovrebbero rispondere alle domande che indirizzano il loro esclusivo contributo clinico per la diagnosi, la gestio-

ne e la definizione del rischio di ictus: il paziente ha avuto un ictus? L'ictus ha un'eziologia ischemica o emorragica? I sintomi suggeriscono una valutazione intensiva aggiuntiva o il ricorso alla terapia trombolitica? Il paziente è a rischio di ictus o di recidiva di eventi cardiovascolari? La moderna diagnosi di ictus rimane fortemente dipendente dalla valutazione clinica e ulteriori sforzi nella ricerca di trasferimento, rivolti alla scoperta di biomarcatori di ictus, potrebbero notevolmente migliorare la storia clinica dei pazienti e la qualità delle cure.

BIBLIOGRAFIA

1. Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, et al. Heart disease and stroke statistics-2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Circulation 2009;119:e21-181.
2. Asplund K, Stegmayr B, Peltonen M. From the twentieth to the twenty-first century: a public health perspective on stroke. In: Ginsberg MD Bogousslavsky J, eds. Cerebrovascular disease pathophysiology, diagnosis, and management. Malden, MA: Blackwell Science, 1998.
3. Adams HPJ, Bendixen BH, Kappelle LJ, 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.
4. Easton JD, Saver JL, Albers GW, et al. Definition and evaluation of transient ischemic attack: a scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council; Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Cardiovascular Nursing; and the Interdisciplinary Council on Peripheral Vascular Disease: the American Academy of Neurology affirms the value of this statement as an educational tool for neurologists. Stroke 2009;40:2276-93.
5. Albers GW, Caplan LR, Easton JD, et al. Transient ischemic attack — proposal for a new definition. N Engl J Med 2002;347:1713-6.
6. Levy DE. How transient are transient ischemic attacks? Neurology 1988;38:674-7.
7. Adams HP Jr, Del Zoppo GJ, Alberts MJ, et al. Guidelines for the early management of adults with ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, and the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease and Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Groups: the American Academy of Neurology affirms the value of this guideline as an educational tool for neurologists. Circulation 2007;115:e478-534.
8. Brouns R, De Deyn PP. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. Clin Neurol Neurosurg 2009;111:483-95.
9. Testai FD, Aiyagari V. Acute hemorrhagic stroke pathophysiology and medical interventions: blood pressure control, management of anticoagulant-associated brain hemorrhage and general management principles. Neurol Clin 2008;26:963-85.
10. Xi G, Keep RF, Hoff JT. Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage. Lancet Neurol 2006;5:53-63.
11. Morgenstern LB, Lisabeth LD, Mecozzi AC, et al. A population-based study of acute stroke and TIA diagnosis. Neurology 2004;62:895-900.
12. Hand PJ, Kwan J, Lindley RI, et al. Distinguishing between stroke and mimic at the bedside: the brain attack study. Stroke 2006;37:769-75.
13. Goldstein LB, Samsa GP. Reliability of the National Institutes of Health Stroke Scale: extension to non-neurologists in the context of a clinical trial. Stroke 1997;28:307-10.
14. Tan JC, Dillon WP, Liu S, et al. Systematic comparison of perfusion-CT and CT-angiography in acute stroke patients. Ann Neurol 2007;61:533-43.
15. Kohrmann M, Schellinger PD. Acute stroke triage to intravenous thrombolysis and other therapies with advanced CT or MR imaging: pro MR imaging. Radiology 2009;251:627-33.
16. Gonzalez RG, Schaefer PW, Buonanno FS, et al. Diffusion-weighted MR imaging: diagnostic accuracy in patients imaged within 6 hours of stroke symptom onset. Radiology 1999;210:155-62.
17. Schaefer PW, Grant PE, Gonzalez RG. Diffusion-weighted MR imaging of the brain. Radiology 2000;217:331-45.
18. Schulz UG, Briley D, Meagher T, et al. Diffusion-weighted MRI in 300 patients presenting late with subacute transient ischemic attack or minor stroke. Stroke 2004;35:2459-65.
19. Kang DW, Latour LL, Chalela JA, et al. Early ischemic lesion recurrence within a week after acute ischemic stroke. Ann Neurol 2003;54:66-74.
20. Wen HM, Lam WW, Rainer T, et al. Multiple acute cerebral infarcts on diffusion-weighted imaging and risk of recurrent stroke. Neurology 2004;63:1317-9.
21. Coutts SB, Hill MD, Simon JE, et al. Silent ischemia in minor stroke and TIA patients identified on MR imaging. Neurology 2005;65:513-7.
22. Sylaja PN, Coutts SB, Subramaniam S, et al. Acute ischemic lesions of varying ages predict risk of ischemic events in stroke/TIA patients. Neurology 2007;68:415-9.
23. Ringelstein EB. Ultrafast magnetic resonance imaging protocols in stroke. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2005;76:905.
24. U-King-Im JM, Trivedi RA, Graves MJ, et al. Utility of an ultrafast magnetic resonance imaging protocol in recent and semi-recent strokes. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2005;76:1002-5.
25. Grotta JC, Chiu D, Lu M, et al. Agreement and variability in the interpretation of early CT changes in stroke patients qualifying for intravenous rtPA therapy. Stroke 1999;30:1528-33.
26. Kalafut M, Schriger DL, Saver JL, et al. Detection of early CT signs of >1/3 middle cerebral artery infarctions: interrater reliability and sensitivity of CT interpretation by physicians involved in acute stroke care. Stroke 2000;31:1667-71.
27. Schriger DL, Kalafut M, Starkman S, et al. Cranial computed tomography interpretation in acute stroke: physician accuracy in determining eligibility for thrombolytic therapy. JAMA 1998;279:1293-7.
28. Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. N Engl J Med 2008;359:1317-29.
29. Katzan IL, Hammer MD, Hixson ED, et al. Utilization of intravenous tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. Arch Neurol 2004;61:346-50.
30. Wang DZ, Rose JA, Honings DS, et al. Treating acute stroke patients with intravenous tPA. The OSF Stroke Network experience. Stroke 2000;56:1015-20.
31. Kleindorfer D, Kissela B, Schneider A, et al. Eligibility for

recombinant tissue plasminogen activator in acute ischemic stroke: a population-based study. Stroke 2004;35:e27-9.
32. Davidson MH, Corson MA, Alberts MJ, et al. Consensus panel recommendation for incorporating lipoprotein-associated phospholipase A2 testing into cardiovascular disease risk assessment guidelines. Am J Cardiol 2008;101: 51F-7F.
33. Gorelick PB. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and risk of stroke. Am J Cardiol 2008;101:34F-40F.
34. Elkind MS, Tai W, Coates K, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity and risk of recurrent stroke. Cerebrovasc Dis 2009;27:42-50.
35. Oei H-H, van der Meer IM, Hofman A, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is associated with risk of coronary heart disease and ischemic stroke: the Rotterdam Study. Circulation 2005;111:570-5.
36. Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Bang H, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2, high-sensitivity C-reactive protein, and risk for incident coronary heart disease in middle-aged men and women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. Arch Intern Med 2005;165:2479-84.
37. Wassertheil-Smoller S, Hendrix SL, Limacher M, et al. Effect of estrogen plus progestin on stroke in postmenopausal women: the Women's Health Initiative: a randomized trial. JAMA 2003;289:2673-84.
38. Wassertheil-Smoller S, Kooperberg C, McGinn AP, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2, hormone use, and the risk of ischemic stroke in postmenopausal women. Hypertension 2008;51:1115-22.
39. McConnell JP, Jaffe AS. Variability of lipoprotein-associated phospholipase A2 measurements. Clin Chem 2008;54:932-3.
40. Achan V, Broadhead M, Malaki M, et al. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003;23:1455-9.
41. Dayoub H, Achan V, Adimoolam S, et al. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. Circulation 2003;108:3042-7.
42. Kielstein JT, Bode-Boger SM, Frolich JC, et al. Asymmetric dimethylarginine, blood pressure, and renal perfusion in elderly subjects. Circulation 2003;107:1891-5.
43. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, et al. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. Circulation 1999;99:1141-6.
44. Masuda H, Goto M, Tamaoki S, et al. Accelerated intimal hyperplasia and increased endogenous inhibitors for NO synthesis in rabbits with alloxan-induced hyperglycaemia. Br J Pharmacol 1999;126:211-8.
45. Stuhlinger MC, Oka RK, Graf EE, et al. Endothelial dysfunction induced by hyperhomocysteinemia: role of asymmetric dimethylarginine. Circulation 2003;108:933-8.
46. Boger RH, Lentz SR, Bode-Boger SM, et al. Elevation of asymmetrical dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocysteinemia in humans. Clin Sci (Lond) 2001;100:161-7.
47. Boger RH, Bode-Boger SM, Sydow K, et al. Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e)inemia or hypercholesterolemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000;20:1557-64.
48. Zoccali C, Mallamaci F, Maas R, et al. Left ventricular hypertrophy, cardiac remodeling and asymmetric dimethylarginine (ADMA) in hemodialysis patients. Kidney Int 2002;62:339-45.
49. Bode-Boger SM, Boger RH, Kienke S, et al. Elevated L-arginine/dimethylarginine ratio contributes to enhanced systemic NO production by dietary L-arginine in hypercholesterolemic rabbits. Biochem Biophys Res Commun 1996;219:598-603.
50. Yu X, Li Y, Xiong Y. Increase of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in serum of high cholesterol fed rabbits. Life Sci 1994;54:753-8.
51. Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. Circulation 1998;98:1842-7.
52. Yoo J-H, Lee S-C. Elevated levels of plasma homocyst(e)ine and asymmetric dimethylarginine in elderly patients with stroke. Atherosclerosis 2001;158:425-30.
53. Leong T, Zylberstein D, Graham I, et al. Asymmetric dimethylarginine independently predicts fatal and nonfatal myocardial infarction and stroke in women: 24-year follow-up of the population study of women in Gothenberg. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008;28:961-7.
54. Pikula A, Boger RH, Beiser AS, et al. Association of plasma ADMA levels with MRI markers of vascular brain injury. Stroke 2009;40:2959-64.
55. Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. Nat Rev Immunol 2004;4:617-29.
56. Yong VW. Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. Nat Rev Neurosci 2005;6:931-44.
57. Clark AW, Krekoski CA, Bou SS, et al. Increased gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9) activities in human brain after focal ischemia. Neurosci Lett 1997;238:53-6.
58. Anthony DC, Ferguson B, Matyzak MK, et al. Differential matrix metalloproteinases expression in cases of multiple sclerosis and stroke. Neuropathol Appl Neurobiol 1997;23:406-15.
59. Lo EH, Wang X, Cuzner ML. Extracellular proteolysis in brain injury and inflammation: role for plasminogen activators and matrix metalloproteinases. J Neurosci Res 2002;69:1-9.
60. Rosenberg GA, Navrati LM, Barone F, et al. Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. J Cereb Blood Flow Metab 1996;16:360-6.
61. del Zoppo GJ. Stroke and neurovascular protection. N Engl J Med 2006;354:553-5.
62. Lo EH, Broderick JP, Moskowitz MA. tPA and proteolysis in the neurovascular unit. Stroke 2004;35:354-6.
63. Montaner J, Alvarez-Sabín J, Molina C, et al. Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke: temporal profile and relation to neurological impairment. Stroke 2001;32:1759-66.
64. Alvarez-Sabín J, Delgado P, Abilleira S, et al. Temporal profile of matrix metalloproteinases and their inhibitors after spontaneous intracerebral hemorrhage: relationship to clinical and radiological outcome. Stroke 2004;35:1316-22.
65. Vukasovic I, Tesija-Kuna A, Topic E, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in different acute stroke subtypes. Clin Chem Lab Med 2006;44:428-34.
66. Montaner J, Alvarez-Sabín J, Molina CA, et al. Matrix metalloproteinase expression is related to hemorrhagic transformation after cardioembolic stroke. Stroke 2001;32:2762-7.
67. Montaner J, Molina CA, Monasterio J, et al. Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. Circulation 2003;107:598-603.

68. Rosell A, Alvarez-Sabín J, Arenillas JF, et al. A matrix metalloproteinase protein array reveals a strong relation between MMP-9 and MMP-13 with diffusion-weighted image lesion increase in human stroke. Stroke 2005;36:1415-20.
69. Horstmann S, Kalb P, Koziol J, et al. Profiles of matrix metalloproteinases and their inhibitors, and laminin in stroke patients: influence of different therapies. Stroke 2003;34:2165-70.
70. Ning M, Furie KL, Koroshetz WJ, et al. Association between tPA therapy and raised early matrix metalloproteinase-9 in acute stroke. Neurology 2006;66:1550-5.
71. Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. Biochem Biophys Res Commun 1965;19:739-44.
72. Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. Int J Biochem Cell Biol 2001;33:637-68.
73. Kapural M, Krizanac-Bengez L, Barnett G, et al. Serum S-100beta as a possible marker of blood–brain barrier disruption. Brain Res 2002;940:102-4.
74. Kanner AA, Marchi N, Fazio V, et al. Serum S100beta: a noninvasive marker of blood-brain barrier function and brain lesions. Cancer 2003;97:2806-13.
75. Persson L, Hardemark HG, Gustafsson J, et al. S-100 protein and neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and serum: markers of cell damage in human central nervous system. Stroke 1987;18:911-8.
76. Abraha HD, Butterworth RJ, Bath PM, et al. Serum S-100 protein, relationship to clinical outcome in acute stroke. Ann Clin Biochem 1997;34:366-70.
77. Buttner T, Weyers S, Postert T, et al. S-100 protein: serum marker of focal brain damage after ischemic territorial MCA infarction. Stroke 1997;28:1961-5.
78. Elting JW, de Jager AE, Teelken AW, et al. Comparison of serum S-100 protein levels following stroke and traumatic brain injury. J Neurol Sci 2000;181:104-10.
79. Wunderlich MT, Wallesch CW, Goertler M. Release of neurobiochemical markers if brain damage is related to the neurovascular status on admission and the site of arterial occlusion in acute ischemic stroke. J Neurol Sci 2004;227:49-53.
80. Jauch EC, Lindsell C, Broderick J, et al. NINDS rt-PA Stroke Study Group. Association of serial biochemical markers with acute ischemic stroke: the National Institute of Neurological Disorders and Stroke recombinant tissue plasminogen activator Stroke Study. Stroke 2006;37:2508-13.
81. Foerch C, Du Mesnil de Rochemont R, Singer O, et al. S100B as a surrogate marker for successful clot lysis in hyperacute middle cerebral artery occlusion. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2003;74:322-5.
82. Foerch C, Singer OC, Neumann-Haefelin T, et al. Evaluation of serum S100B as a surrogate marker for long-term outcome and infarct volume in acute middle cerebral artery infarction. Arch Neurol 2005;62:1130-4.
83. Jonsson H, Johnsson P, Birch-Iensen M, et al. S100B as a predictor of size and outcome of stroke after cardiac surgery. Ann Thorac Surg 2001;71:1433-7.
84. Hill MD, Jackowski G, Bayer N, et al. Biochemical markers in acute ischemic stroke. CMAJ 2000;162:1139-40.
85. Ishiguro Y, Kato K, Ito T, et al. Determination of three enolase isozymes and S-100 protein in various tumors in children. Cancer Res 1983;43:6080-4.
86. Raabe A, Grolms C, Keller M, et al. Correlation of computed tomography findings and serum brain damage markers following severe head injury. Acta Neurochir 1998;140:791-2.
87. Dambinova SA, Khounteev GA, Izykenova GA, et al. Blood test detecting autoantibodies to N-methyl-D-aspartate neuroreceptors for evaluation of patients with transient ischemic attack and stroke. Clin Chem 2003;49:1752-62.
88. Bokesch PM, Izykenova GA, Justice JB, et al. NMDA receptor antibodies predict adverse neurological outcome after cardiac surgery in high-risk patients. Stroke 2006;37:1432-6.
89. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP thirty-one years (1969–2000). Neurochem Res 2000;25:1439-51.
90. Niebrój-Dobosz I, Rafalowska J, Lukasiuk M, et al. Immunochemical analysis of some proteins in cerebrospinal fluid and serum of patients with ischemic strokes. Folia Neuropathol 1994;32:129-37.
91. Herrmann M, Vos P, Wunderlich MT, et al. Release of glial tissue-specific proteins after acute stroke: a comparative analysis of serum concentrations of protein S-100B and glial fibrillary acidic protein. Stroke 2000;31:2670-7.
92. Foerch C, Singer O, Neumann-Haefelin T, et al. Utility of serum GFAP in monitoring acute MCA territorial infarction. Cerebrovasc Dis 2003;16:45.
93. Foerch C, Curdt I, Yan B, et al. Serum glial fibrillary acidic protein as a biomarker for intracerebral haemorrhage in patients with acute stroke. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2006;77:181-4.
94. Dvorak F, Haberer I, Sitzer M, et al. Characterisation of the diagnostic window of serum glial fibrillary acidic protein for the differentiation of intracerebral haemorrhage and ischaemic stroke. Cerebrovasc Dis 2009;27:37-41.
95. Unden J, Strandberg K, Malm J, et al. Explorative investigation of biomarkers of brain damage and coagulation system activation in clinical stroke differentiation. J Neurol 2009;256:72-7.
96. Nagakubo D, Taira T, Kitaura H, et al. DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras. Biochem Biophys Res Commun 1997;231:509-13.
97. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. Science 2003;299:256-9.
98. Lescuyer P, Allard L, Zimmermann-Ivol CG, et al. Identification of post-mortem cerebrospinal fluid proteins as potential biomarkers of ischemia and neurodegeneration. Proteomics 2004;4:2234-41.
99. Allard L, Burkhard PR, Lescuyer P, et al. PARK7 and nucleoside diphosphate kinase A as plasma markers for the early diagnosis of stroke. Clin Chem 2005;51:2043-51.
100. Reynolds MA, Kirchick HJ, Dahlen JR, et al. Early biomarkers of stroke. Clin Chem 2003;49:1733-9.
101. Lynch JR, Blessing R, White WD, et al. Novel diagnostic test for acute stroke. Stroke 2004;35:57-63.
102. Laskowitz DT, Blessing R, Floyd J, et al. Panel of biomarkers predicts stroke. Ann N Y Acad Sci 2005;1053:30.
103. Laskowitz DT, Kasner SE, Saver J, et al. Clinical usefulness of a biomarker-based diagnostic test for acute stroke: the biomarker rapid assessment in ischemic injury (BRAIN) study. Stroke 2009;40:77-85.
104. Whiteley W, Tseng M-C, Sandercock P. Blood biomarkers in the diagnosis of ischemic stroke: a systematic review. Stroke 2008;39:2902-9.
105. Whiteley W, Chong WL, Sengupta A, et al. Blood markers for the prognosis of ischemic stroke: a systematic review. Stroke 2009;40:e380-9.
106. Apple FS, Chung AY, Kogut ME, et al. Decreased patient charges following implementation of point-of-care cardiac troponin monitoring in acute coronary syndrome patients in a community hospital cardiology unit. Clin Chim Acta 2006;370:191-5.

107. Singer AJ, Ardise J, Gulla J, et al. Point-of-care testing reduces length of stay in emergency department chest pain patients. Ann Emerg Med 2005;45:587-91.
108. Ryan RJ, Lindsell CJ, Hollander JE, et al. A multicenter randomized controlled trial comparing central laboratory and point-of-care cardiac marker testing strategies: the Disposition Impacted by Serial Point of Care Markers in Acute Coronary Syndromes (DISPO-ACS) trial. Ann Emerg Med 2008;53:321-8.
109. Storrow AB, Lyon JA, Porter MW, et al. A systematic review of emergency department point-of-care cardiac markers and efficiency measures. Point Care 2009;8:121-5.
110. Andersson J, Johansson L, Ladenvall P, et al. C-reactive protein is a determinant of first-ever stroke: prospective nested case-referent study. Cerebrovasc Dis 2009;27:544-51.
111. Kaplan RC, McGinn AP, Baird AE, et al. Inflammation and hemostasis biomarkers for predicting stroke in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Observational Study. J Stroke Cerebrovasc Dis 2008;17:344-55.
112. Allard L, Lescuyer P, Burgess J, et al. ApoC-I and ApoC-III as potential plasmatic markers to distinguish between ischemic and hemorrhagic stroke. Proteomics 2004;4:2242-51.
113. Makikallio AM, Makikallio TH, Korpelainen JT, et al. Natriuretic peptides and mortality after stroke. Stroke 2005;36:1016-20.
114. Montaner J, Perea-Gainza M, Delgado P, et al. Etiologic diagnosis of ischemic stroke subtypes with plasma biomarkers. Stroke 2008;39:2280-7.
115. Wunderlich MT, Hanhoff T, Goertler M, et al Release of brain-type and heart-type fatty acid-binding proteins in serum after acute ischaemic stroke. J Neurol 2005;252:718-24.
116. Pelsers MMAL, Hanhoff T, Van der Voort D, et al. Brain-type and heart-type fatty acid-binding proteins in the brain; tissue distribution and clinical utility. Clin Chem 2004;50:1568-75.
117. Anand N, Stead LG. Neuron-specific enolase as a marker for acute ischemic stroke: a systematic review. Cerebrovasc Dis 2005;20:213-9.
118. Barber M, Langhorne P, Rumley A, et al. D-dimer predicts early clinical progression in ischemic stroke: confirmation using routine clinical assays. Stroke 2006;37:1113-5.
119. Barber M, Langhorne P, Rumley A, et al. Hemostatic function and progressing ischemic stroke: D-dimer predicts early clinical progression. Stroke 2004;35:1421-5.
120. Folsom AR, Rosamond WD, Shahar E, et al. Prospective study of markers of hemostatic function with risk of ischemic stroke. Circulation 1999;100:736-42.