

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN METODOLOGIE DI RICERCA NELLE
MALATTIE VASCOLARI**

CICLO: XXV

Settore Concorsuale di afferenza: 06/E1

Settore Scientifico disciplinare: MED 22

**VALUTAZIONE DEI DISTURBI COGNITIVI NEI PAZIENTI SOTTOPOSTI A
RIVASCOLARIZZAZIONE CAROTIDEA (ENDOARTERECTOMIA VS
STENTING) MEDIANTE IL DOSAGGIO DI MARKER DI DANNO NEURONALE,
MINI MENTAL STATE EXAMINATION E RISONANZA MAGNETICA.**

Presentata da: Massimo Ruggiero

Coordinatore Dottorato

Prof. Andrea Stella

Relatore

Prof. Francesco Speziale

Direttore della Scuola di Specializzazione

in Chirurgia Vascolare

“Sapienza” Università di Roma

INTRODUZIONE

Nei Paesi industrializzati l'ictus cerebrale rappresenta la terza causa di morte ed una condizione fortemente invalidante per quelli che ne rimangono colpiti¹. Spesso la fisiopatologia dell'ictus cerebrali ischemico risiede nella tromboembolia carotidea. Tale lesione può essere diagnosticata con un esame di primo livello, e corretta con un intervento chirurgico preventivo (Figura 1). La rivascolarizzazione carotidea per la prevenzione ed il trattamento dell'ictus ischemico viene oggi effettuata con due tecniche riconosciute a livello internazionale, l'endarterectomia carotidea (CEA; Figura 2) e lo stenting (CAS; Figura 3). Mentre la prima è una procedura eseguita ormai da molti anni e rappresenta quindi la tecnica chirurgica tradizionale, il trattamento endovascolare si è sviluppato a partire dagli anni novanta ed ha conosciuto la sua massima diffusione nell'ultimo decennio, rimanendo di continuo sotto esame per quanto riguarda i risultati in termini di complicanze neurologiche perioperatorie e a lungo termine.

Figura 1. Placca carotidea.

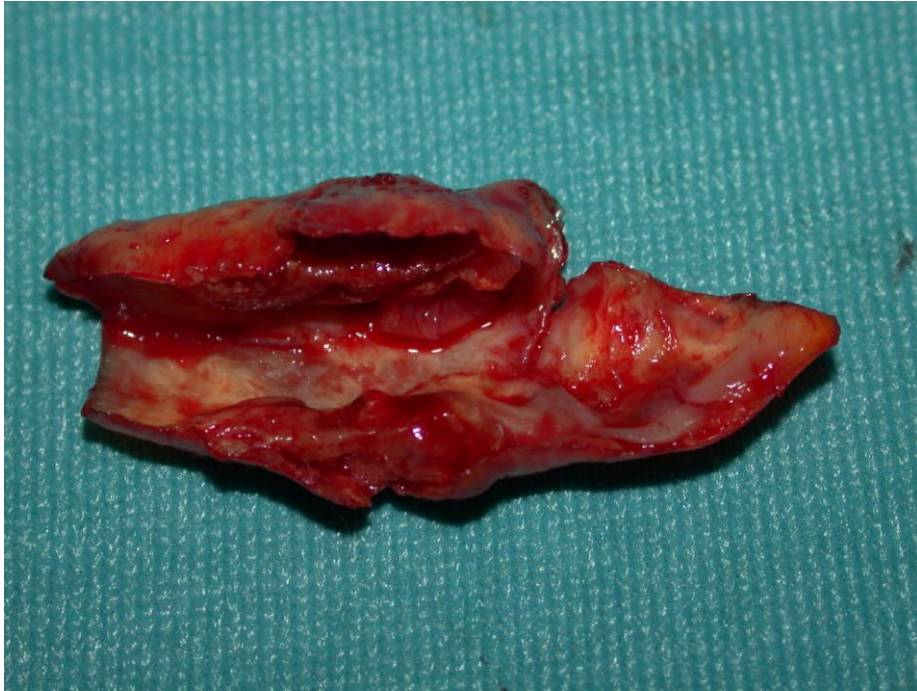


Figura 2. Endoarterectomia carotidea (CEA).

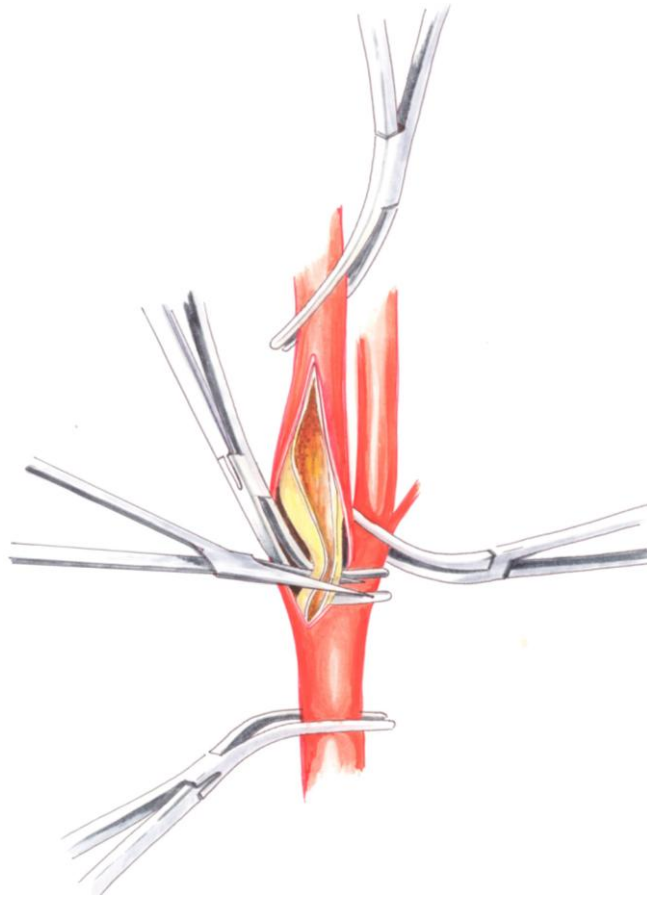
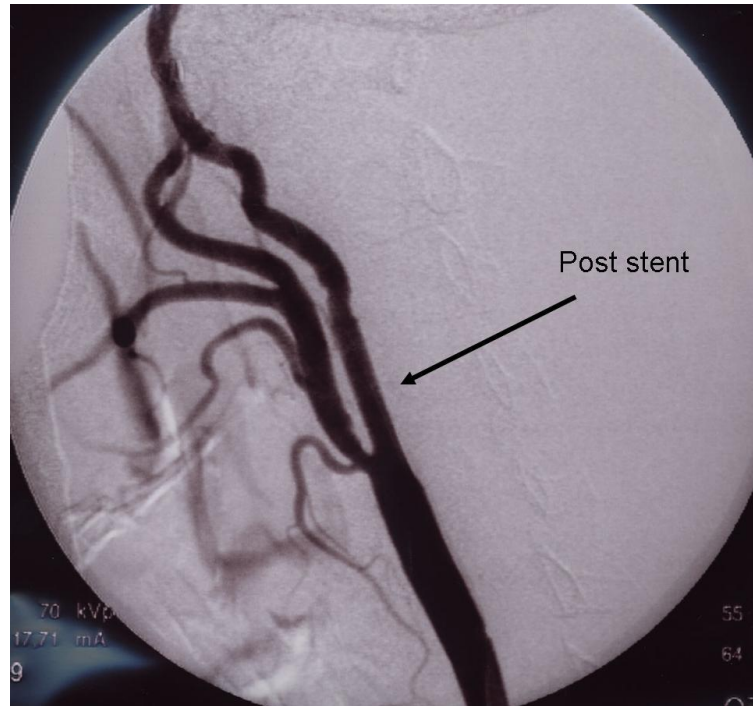


Figura 3. Trattamento endovascolare (CAS).



Numerosi studi, infatti, hanno comparato le due tecniche, valutando il tasso di complicanze post-rivascolarizzazione in popolazioni di pazienti sia sintomatici (con un pregresso episodio ischemico cerebrale) che asintomatici ²⁻⁵.

Nella maggior parte degli studi le differenze tra le due tecniche vengono confrontate solo in termini di complicanze neurologiche maggiori, ovvero ictus o TIA (attacco ischemico transitorio), tralasciando l'analisi di complicanze minori, se pur riportate in sporadici studi, quali la riduzione della capacità cognitiva o mnemonica in conseguenza di una microembolia cerebrale peri-procedurale. Tali microembolie possono essere responsabili di fenomeni ischemici di minore entità, ma multipli, con conseguente riduzione delle capacità cerebrali e demenza ⁶⁻⁷. La maggior parte di questi fenomeni possono determinare la comparsa di lesioni clinicamente silenti (subcliniche), in particolare, è stato sottolineato come la microembolia possa essere responsabile di un precoce deterioramento delle capacità cognitive di un individuo, andando a provocare la morte cellulare di neuroni in aree cerebrali deputate alle funzioni superiori. Numerosi tests neuropsicometrici sono oggi disponibili per lo studio di pazienti con deficit neuro cognitivi o con demenza ⁸⁻¹².

Il Mini-Mental State Examination (MMSE) test è un breve questionario di rapida esecuzione in cui si assegna un punteggio al paziente fino ad un

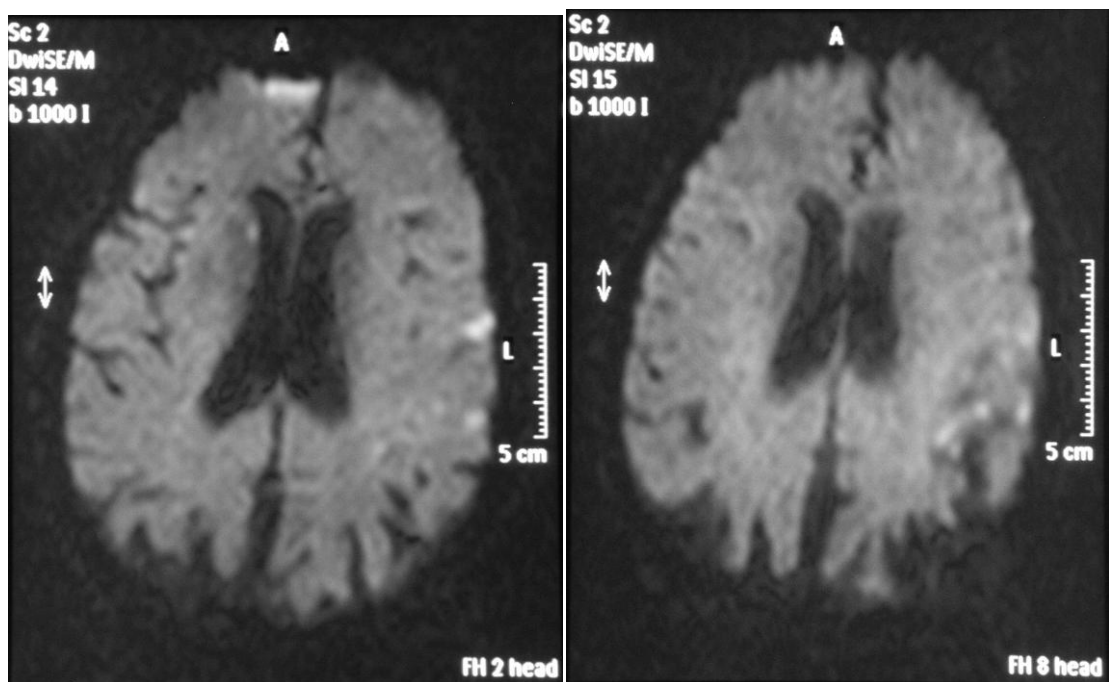
massimo di 30 punti. Esso è comunemente usato in medicina per la valutazione di una demenza o disturbo cognitivo. Viene anche usato per valutare la gravità della compromissione cognitiva in un determinato momento e per valutarne l'evoluzione nel tempo, rendendolo così un buon parametro di valutazione di risposta ad un trattamento. Nel lasso di tempo di circa 10 minuti e con semplici domande si pone la risoluzione di problemi in diverse aree: vengono analizzati il tempo e il luogo della prova, si chiede di ripetere una lista di parole, si effettua una prova aritmetica, si verifica l'uso e la comprensione della lingua e le capacità motorie di base. Per esempio, una delle prove del test richiede di copiare un disegno di due pentagoni. In una scala di punteggio da 0 a 30, un punteggio da 27 a 30 viene considerato normale, da 20 a 26 indica la presenza di un deterioramento cognitivo di grado lieve, da 10 a 19 di grado da moderato a grave e inferiore a 10 sta ad indicare una compromissione cognitiva molto grave. Il punteggio ottenuto può essere corretto per il grado di scolarizzazione e per l'età¹². Un punteggio basso è strettamente correlato alla presenza di demenza anche se può essere talvolta determinato dalla presenza di altri disturbi mentali.

Mentre i fenomeni microembolici possono essere evidenziati solo con tecniche di imaging cerebrale ad alta definizione, gli effetti di tale microembolia potrebbero essere controllati nell'immediato postoperatorio

mediante il dosaggio di markers di danno neuronale, e monitorati nel tempo con mini mental test al fine di dimostrare la diminuzione delle capacità cognitive dei pazienti⁸⁻¹².

Per quanto concerne l'imaging cerebrale, la Risonanza Magnetica Nucleare in Diffusione (Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Imaging - DW-MRI) ha dimostrato di essere efficace nel rilevare nuove lesioni cerebrali già dopo pochi minuti dall'evento ischemico (Figura 4).

Figura 4. Risonanza magnetica nucleare in diffusione.



Fenomeni microembolici cerebrali nell'immediato postoperatorio sono stati evidenziati in alcuni studi dopo rivascularizzazione carotidea ed in

particolare dopo procedure di stenting carotideo¹³. Dopo un ictus ischemico la DW-MRI è molto sensibile ai cambiamenti che si verificano nella lesione¹⁴. L'edema citotossico (rigonfiamento cellulare) che si realizza nelle prime fasi di morte cellulare causa una restrizione alla diffusione di acqua che è responsabile di un aumentato segnale nelle scansioni in DWI. Quest'alterazione compare già dopo pochi minuti dall'inizio dei sintomi di ictus e rimane per un massimo di due settimane. Tali sequenze in DWI, combinate con le immagini realizzate nei tempi di perfusione, possono evidenziare il cosiddetto "mismatch diffusione/perfusione", ovvero le regioni di parenchima in cui la pronta ristabilizzazione di un valido flusso ematico cerebrale può permettere il salvataggio neuronale. In letteratura si apprende come eventi neurologici ischemici subclinici possono essere evidenziati dosando opportunamente dei markers di danno neurologico. Una varietà di marcatori biochimici di danno cerebrale sono stati descritti. Tra questi l'enolasi neurono-specifica (NSE) e la proteina legante il calcio S100 β hanno dimostrato di essere marcatori di ictus sia nei modelli animali che negli studi su pazienti¹⁵⁻²³. Nel 1965 Moore isolò una frazione subcellulare da cervello bovino che fu chiamata S100, poiché i componenti erano solubili in solfato di ammonio saturi al 100% a pH neutro. Studi successivi hanno dimostrato che questa frazione conteneva prevalentemente due polipeptidi, S100A1 e S100 β , con

un peso molecolare di circa 10.000 Da e due domini ad alta affinità EF-hand calcium-binding. L'S100 β venne anche chiamata NEF perché a metà degli anni 1980 Kligman e Marshak individuarono una molecola di proteina purificata che esprimeva un'attività di neurite extension factor quando inoculata in colture di neuroni corticali di pollo come l'S100 β ²⁴.

Alti livelli di S100 β possono essere misurati già 20 minuti dopo un fenomeno ischemico cerebrale²⁵.

L'enolasi neurono-specifica (NSE) è un enzima glicolitico che si trova principalmente nel citoplasma di neuroni e cellule di origine neuroendocrina²⁶. È stato trovato in concentrazioni minori in eritrociti e piastrine, tuttavia le isoforme $\gamma\gamma$ e $\alpha\gamma$ vengono rilasciate esclusivamente dalle cellule neuronali dopo la loro morte. L'NSE ha un peso molecolare di 78 KDa e un'emivita di 20 ore²⁷⁻²⁸.

OBIETTIVI

Lo scopo del nostro lavoro è la valutazione dei disturbi cognitivi in relazione al tasso di microembolia in due differenti gruppi di pazienti trattati per lesione carotidea asintomatica con CEA o CAS, comparando le due metodiche di rivascularizzazione mediante l'utilizzo di tecniche di imaging cerebrale (DW-MRI), markers di danno neuronale (S100 β e NSE) e punteggio ottenuto con MMSE test.

MATERIALE E METODI

Pazienti

Tra aprile 2009 e aprile 2010 sessanta pazienti asintomatici sottoposti a rivascularizzazione carotidea in elezione sono stati reclutati per partecipare a questo studio prospettico. 32 pazienti sono stati sottoposti a CEA e 28 CAS. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico Locale. Tutti i pazienti hanno firmato un consenso informato. Sono stati reclutati pazienti con stenosi carotidea asintomatica $\geq 70\%$ secondo il criterio NASCET². Il tipo di rivascularizzazione è stato scelto in base a criteri clinici ed anatomici. Tutti i pazienti sono stati sottoposti preoperatoriamente ad EcocolorDoppler (ECD) dei tronchi epiaortici ed angioTC al fine di valutare la fattibilità anatomica per la procedura endovascolare. Sono stati esclusi dallo studio tutti i pazienti con lesione carotidea sintomatica.

Tecniche di rivascularizzazione

L'endoarterectomia carotidea (CEA) è stata effettuata con tecnica chirurgica standard in anestesia loco-regionale con blocco locoregionale cervicale dei rami da C2 a C4 in tutti i casi, con misurazione continua dei parametri vitali. La valutazione dello stato neurologico è stata effettuata utilizzando il test della mano ("grip test controlaterale) per il monitoraggio continuo dello status neurologico durante l'intervento. Prima del clampaggio della carotide interna sono state somministrate per via venosa 5000 ± 2000 UI (a seconda del peso corporeo) di eparina sodica. L'uso di shunt e della sutura con patch è stato valutato selettivamente.

La CEA è stata eseguita per via smussa con tecnica standard. Il paziente è stato posto in posizione supina con il collo esteso e rivolto controlateralmente. E' stata effettuata un'incisione di circa 7 - 8 cm lungo il margine anteriore del muscolo sternocleidomastoideo in corrispondenza della proiezione cutanea del bulbo carotideo, mappato con ECD preoperatoriamente. Dopo l'isolamento dell'arteria carotide comune, esterna e tiroidea superiore, l'arteria carotide interna viene isolata a valle della lesione, viene effettuato il clampaggio degli altri vasi e viene valutato il grado di funzionamento del poligono del Willis mediante rilevazione dello status neurologico del paziente e quindi il grado di compenso

cerebrale al clampaggio dell'asse carotideo. Viene quindi clampata l'arteria carotide interna e viene completata la mobilizzazione dell'intero asse carotideo. Viene effettuata un'arteriotomia longitudinale sul lato posterolaterale della biforcazione con individuazione del piano di clivaggio della placca in senso circonferenziale e longitudinale. Dopo asportazione della placca aterosclerotica, vengono asportati eventuali residui visualizzati dopo irrigazione con soluzione fisiologica eparinata. Prima di iniziare la sutura dell'arteriotomia viene sempre eseguito un "flush" dalla carotide interna aperta temporaneamente la clamp sulla carotide interna per permettere al flusso refluo di portar via eventuali residui mobili presenti sull'estremità distale dell'arteriotomia. La sutura mediante interposizione di patch in Dacron è stata eseguita con l'utilizzo di filo in polipropilene 5-0 mentre la sutura diretta con il monofilamento 6/0. Prima del termine della sutura sono stati rilasciati consequenzialmente e temporaneamente gli angiostati in modo da permettere la fuorisciuta di eventuali residui ateromatosi e aria. Terminata la sutura vengono rilasciate prima le clamp sulla carotide esterna e sulla comune, in modo da permettere ad eventuali residui di essere deviati verso il circolo dell'esterna, e poi la clamp sulla carotide interna. Verificate la pulsatilità di tutti i vasi e la buona tenuta della sutura si procede a richiudere per piani la ferita chirurgica previo posizionamento di un drenaggio in aspirazione che viene rimosso in I giornata postoperatoria. Nel

postoperatorio i pazienti hanno proseguito la terapia antiaggregante con acido acetilsalicilico 100 mg/die o ticlopidina 250 mg in due somministrazioni giornaliere o clopidogrel 75 mg/die.

La procedura di stenting carotideo (CAS) è stata effettuata in tutti i 28 casi in anestesia locale con controllo continuo della frequenza cardiaca, pressione arteriosa e tensione parziale di ossigeno arteriosa. La pressione arteriosa viene misurata durante l'intera procedura mediante uno sfigmomanometro automatizzato. La valutazione dello stato neurologico è stata effettuata utilizzando il "grip" test controlaterale, a partire dalla fase angiografica e per tutto il tempo di manipolazione dei cateteri, evitando l'uso di sedativi prima o durante la procedura. I pazienti ricevono acido acetilsalicilico 100 mg/die e clopidogrel 75 mg/die almeno 24 ore prima della procedura e il giorno dell'intervento. Per via arteriosa transfemorale viene posizionato un introduttore da 7F. Viene somministrata eparina sodica in bolo (5000 UI), seguita dalla somministrazione continua di soluzione eparinata attraverso il catetere guida. Il catetere guida viene fatto avanzare all'interno dell'albero arterioso su guida idrofilica 0.035 fino ad imboccare l'ostio dell'arteria carotide comune del lato interessato. Una volta posizionato in maniera stabile il catetere guida all'interno della carotide comune, viene eseguita un'angiografia selettiva dell'asse carotideo interessato e del circolo intracranico per effettuare le opportune misurazioni

per la scelta dello stent. Viene poi tolta la guida idrofilica e viene posizionato il filtro di protezione distale. In tutti i casi è stato utilizzato un FilterWire (Boston Scientific, Natick, MA, USA) con successivo posizionamento di stent Wallstent (Boston Scientific, Natick, MA, USA). Il calibro dello stent è stato scelto sulla base delle misurazioni dei diametri arteriosi e della lunghezza della lesione effettuati con EcocolorDoppler, con l'angiogramma TC preoperatoriamente e con l'angiografia selettiva durante la procedura. In nessun caso il rilascio dello stent è stato preceduto da una predilatazione. In tutti i casi, successivamente al rilascio dello stent, è stato effettuato un pallonamento con catetere a palloncino da 5 o 6 mm ad una pressione da 6 a 10 atm per un massimo di 5 secondi. Immediatamente prima del gonfiaggio del catetere a palloncino è stata somministrata per via endovenosa sistemica atropina 1 mg per evitare l'insorgenza di bradicardia riflessa o asistolia. Al termine viene eseguita un'angiografia di controllo per documentare il buon posizionamento dello stent, l'adeguata dilatazione della stenosi, l'assenza di complicanze locali quali dissezione o spasmo arterioso e la pervietà del circolo intracranico. Il successo tecnico, è stato definito come assenza di stenosi residua o presenza di stenosi residua <30%. Nel postoperatorio i pazienti hanno proseguito la terapia antiaggregante con acido acetilsalicilico 100 mg/die o ticlopidina 250

mgx2/die con aggiunta di clopidogrel 75 mg/die per 6 settimane dopo la procedura.

DW-MRI

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a DW-MRI cerebrale nel pre-operatorio, 24 ore dopo l'intervento e a 12 mesi di distanza dalla rivascolarizzazione.

Markers di danno cerebrale

Sei campioni di sangue venoso sono stati prelevati per ciascun paziente: in fase preoperatoria (campione basale), 5 minuti dopo declampaggio della carotide interna nel gruppo CEA o dopo la rimozione di tutti i devices nel gruppo CAS e poi a 2, 6, 12 e 24 ore dalla fine dell'intervento. I campioni di sangue sono stati centrifugati (1800 g per 6 minuti) entro 20 minuti dal prelievo. Il siero è stato conservato a -80°C per l'analisi successiva. Le proteine S100 β e NSE sono state rilevate nei campioni di siero mediante utilizzo di test automatizzati immunoluminometrici (S100 test Elecsys, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germania; ELSA-NSE, CIS bio internazionale, Gif-sur-Yvette Cedex, Francia). Il test per l'S100 misura la subunità β della proteina S100 mediante 3 anticorpi monoclonali con un

limite di rilevamento di 0,02 µg/L. La misurazione dell'NSE si effettua grazie ad anticorpi monoclonali che si legano alla subunità γ dell'enzima con una concentrazione minima misurabile di 1.0 µg/L. Il responsabile dell'analisi dei markers non era a conoscenza del tipo di trattamento chirurgico di rivascolarizzazione carotidea effettuato dal paziente analizzato.

E' stata valutata sia la variazione del valore del marker all'interno di ogni singolo paziente che nei due gruppi di pazienti. Oltre all'analisi dei valori continui abbiamo classificato ogni paziente, sulla base della variazione del marker nelle 24 ore di analisi. Confrontando tutti i valori con quello basale ed il valore a 12 ore con quello a 24 ore, è stato possibile distinguere tre gruppi di pazienti: "stabile", "aumentato" o "diminuito". E' stato ritenuto significativo una variazione del $\pm 25\%$ rispetto al valore di riferimento.

Neuropsicologia

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a Mini-Mental State Examination (MMSE) test preoperatoriamente, 24 ore dopo l'intervento e a due controlli di follow-up successivi a 6 e 12 mesi. Lo stesso operatore è stato incaricato di somministrare il test a tutti i pazienti. E' stata considerata significativa una differenza di punteggio tra una prova e l'altra di circa 5 punti oppure il

passaggio da una classe cognitiva all'altra (ad esempio da assenza di deficit a deficit lieve o da deficit lieve a deficit moderato).

Statistica

I due gruppi di trattamento sono stati confrontati rispetto alle caratteristiche demografiche preoperatorie, il punteggio MMSE nelle varie misurazioni, la presenza di nuove lesioni alla DW-MRI postoperatoria e i livelli sierici dei due markers di danno neuronale. Inoltre all'interno di ogni gruppo di trattamento sono stati analizzati i punteggi di MMSE nelle varie misurazioni e la variazione dei biomarkers nelle 24 ore di osservazione. Abbiamo ritenuto significativo una variazione del $\pm 25\%$ rispetto al valore basale in ogni paziente. I tre gruppi così ottenuti sono stati paragonati all'interno dei due tipi di rivascolarizzazione. Per ciascun tipo di trattamento abbiamo individuato i soggetti con nuove lesioni DW-MRI o diminuzione significativa (1 step) al punteggio MMSE post-operatorio ed analizzato la correlazione tra le nuove lesioni su DW-MRI, il declino nel punteggio MMSE e la variazione dei biomarkers. Per il confronto tra gruppi sono stati usati il test t di Student per confronti multipli per i valori continui, e il test del χ^2 e test di Fisher (intervallo di confidenza del 95%) per le variabili categoriche. I valori sono stati espressi come media \pm SD. E' stato ritenuto significativo un valore di $p < 0,05$.

RISULTATI

I dati demografici, le caratteristiche delle lesioni carotidee e quelle cliniche preoperatorie sono elencate in tabella.

	CEA N=32 (%)	CAS N=28 (%)	p
Età (anni; media±SD)	70.1±7.2	71.7±7.2	0.67
Maschi/femmine	22/10 (68%)	16/12 (57%)	0.25
Stenosi lato sinistro	17 (53%)	14 (50%)	0.19
Occlusione controlaterale	0	5 (18%)	0.02
% stenosi (media±SD)	77±7.32	73.9±4.99	0.11
Placca iperrecogena	25 (78%)	26 (93%)	0.08
Iperensione	28 (87%)	24 (86%)	0.28
Fumo	19 (59%)	12 (43%)	0.15
Diabete	13 (40%)	16 (57%)	0.09
Iperlipidemia	16 (50%)	9 (32%)	0.12
Coronaropatia (pregresso IMA, CABG, storia di angina)	7 (22%)	15 (53%)	0.01
BPCO	9 (28%)	15 (53%)	0.03

Tabella. Dati demografici, caratteristiche della lesione, fattori di rischio e patologie associate.

Trentadue pazienti sono stati sottoposti ad intervento chirurgico tradizionale e 28 a quello endovascolare. Nel gruppo CEA l'uso dello shunt è stato necessario nel 12,5% dei casi ed è stata eseguita una sutura mediante interposizione di patch nel 78% dei pazienti. Per quanto concerne le procedure CAS il successo tecnico è stato ottenuto in tutti i casi.

Tra i dati pre-operatori, sono state rilevate differenze significative nell'incidenza di coronaropatia (53% vs 22%, $p=0.01$) e di malattia ostruttiva cronica polmonare (53% vs 28%, $p=0.03$), più frequenti nel gruppo CAS. Non sono stati registrati casi di morte nel perioperatorio correlati all'intervento. Un paziente nel gruppo CAS ha presentato minor stroke (1,6%) nel perioperatorio, subito al termine della procedura, pur essendo completamente asintomatico durante tutto l'intervento. Alla DW-MRI il paziente ha mostrato due lesioni cerebrali acute, accompagnate da un aumento significativo dei markers di danno neuronale a partire dal valore rilevato nel prelievo effettuato a distanza di 2 ore dall'intervento. Nel gruppo CEA non sono stati registrati eventi neurologici acuti clinicamente evidenti.

Complessivamente, complicanze perioperatorie minori sono state uno stupor temporaneo del nervo faciale in un paziente del gruppo CEA (3%),

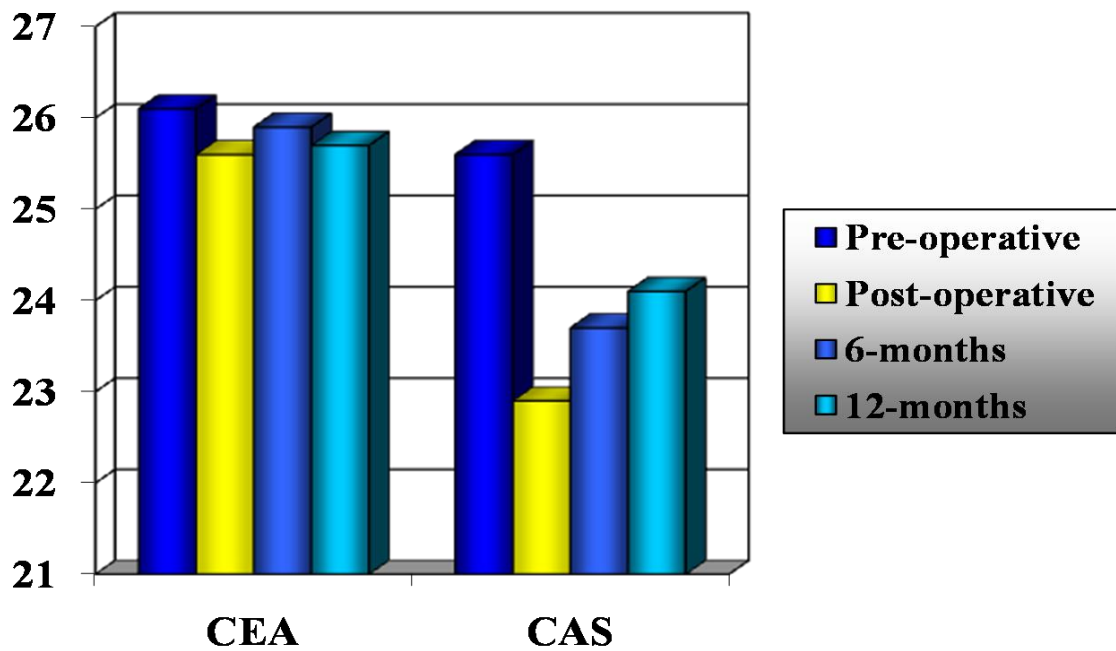
risolti completamente prima della dimissione, e due casi di ematoma nel sito di puntura inguinale nei pazienti del gruppo CAS (7%).

Alla DW-MRI preoperatoria effettuata nei due gruppi di trattamento, nessun paziente presentava lesioni ischemiche cerebrali.

Alla risonanza magnetica di controllo effettuata a 24 ore 6 pazienti del gruppo CAS e 1 paziente del gruppo CEA presentavano lesioni ischemiche acute subcentimetriche clinicamente silenti (21.4% vs 3%, $p=0.03$). Il punteggio medio preoperatorio al test MMSE è stato di $26,1 \pm 3,46$ e $25,6 \pm 4,46$ e punteggio post-operatorio di $25,6 \pm 3,27$ e $22,9 \pm 4,54$ nei gruppi CEA e CAS rispettivamente. L'analisi all'interno di ogni singolo gruppo ha evidenziato una significativa diminuzione nel punteggio MMSE post procedurale nel gruppo CAS non osservata nel gruppo CEA ($p = 0.045$ e $p = 0.67$ rispettivamente). Il confronto tra gruppi ha mostrato un MMSE score postoperatorio significativamente più basso nei pazienti sottoposti a stenting rispetto a quelli sottoposti ad endoarterectomia ($p = 0,03$) con una riduzione > 5 punti in 7 pazienti CAS (25%) ed in 1 paziente CEA (3%) pazienti. Nei pazienti CAS che mostravano anche nuove lesioni ischemiche alla DW-MRI post procedura, il punteggio MMSE postoperatorio si è mostrato significativamente più basso rispetto ai pazienti, dello stesso gruppo, senza lesioni ischemiche ($p < 0.001$). In questi pazienti l'analisi di S100 β e NSE ha mostrato un significativo aumento a 24 ore nel gruppo

CAS rispetto al gruppo CEA ($p = 0,02$). A sei mesi di follow-up lo score MMSE ha mostrato un incremento non significativo nei pazienti del gruppo CAS, rimanendo tuttavia più basso se paragonato al gruppo CEA ($23,7 \pm 4,58$ in CAS vs $25,9 \pm 3,43$ in CEA, $p = NS$). Al controllo a 12 mesi, disponibile in 58 pazienti su 60 (96.6%), l'MMSE ha mostrato un valore sostanzialmente stabile nei pazienti CEA con un ulteriore incremento nei pazienti CAS, senza tuttavia raggiungere i valori preoperatori ($25,7 \pm 3,54$ in CEA vs $24,1 \pm 5,22$ in CAS, $p = NS$). Mentre per i valori di MMSE a 12 mesi il confronto tra gruppo CEA e gruppo CAS non ha mostrato differenze significative, l'analisi tra score in pazienti con DW-MRI positiva nel postoperatorio e pazienti con assenza di nuove lesioni ha mostrato una debole significatività ($p = 0,08$) rafforzando l'ipotesi di una corrispondenza tra microembolia cerebrale silente e declino cognitivo. Alla valutazione DW-MRI a 12 mesi, nessuno dei pazienti ha mostrato lesioni ischemiche recenti, né erano più visibili le lesioni subcentimetriche segnalate nel postoperatorio in 6 pazienti CAS ed in 1 paziente CEA. Tali lesioni, a distanza di tempo, possono infatti passare inosservate data la loro esigua dimensione. I valori di MMSE sono riportati in Figura 5.

Figura 5. MMSE score



Per quel che concerne i markers di danno cerebrale, il valore basale medio nei due gruppi non ha mostrato valori significativamente diversi per entrambi i markers ($p=NS$). L'analisi dei valori continui di NSE e S100 β nel gruppo CAS ha mostrato un trend crescente in tutti i pazienti ed in particolare si è notato un aumento di tutti i valori paragonati al valore basale e di quello a 24 ore rispetto a quello a 12 ore (test t-Student corretto per confronti multipli $p = 0.072$ e 0.38 rispettivamente per S100 β e $p = 0.004$ e 0.581 per NSE). Questa tendenza non è stata confermata nei pazienti CEA ($p=0.875$ e 0.824 per S100 β e $p=0.139$ e 0.292 per NSE rispettivamente per tutti i valori rispetto al valore basale e per il valore a 24 ore rispetto al valore a 12 ore). Il confronto tra i valori dei due markers è rappresentato nelle figure 6 e 7. L'analisi dei valori continui nel confronto

tra gruppi non ha mostrato alcuna differenza statisticamente significativa ad eccezione del valore riscontrato a 6 ore per il marker NSE ($p = 0.042$). Come già detto in precedenza abbiamo suddiviso i pazienti sulla base della tendenza dell'andamento del livello di ogni marker nelle 24 ore ed abbiamo effettuato tra i due gruppi di trattamento un confronto tra valori categorici. Nel gruppo CAS l'S100 β ha mostrato un aumento $\geq 25\%$ a 12 ore rispetto al valore basale e 24 ore rispetto a 12 ore nel 78 e l'83% dei pazienti rispettivamente mentre l'NSE nel 56 e il 70% dei casi. Nel gruppo CEA tale aumento è stato rilevato nel 45 e il 50% dei casi per l'S100 β e il 55 e il 35% per l'NSE.

Nel confronto fra gruppi un numero significativamente più elevato di pazienti nel gruppo CAS apparteneva al gruppo "aumentato" sia all'analisi di tutti i valori rispetto al basale, sia all'analisi del valore a 24 ore rispetto a 12 ore ($p=0.02$). Tutti i pazienti del gruppo CAS con nuove lesioni ischemiche alla DW-MRI e riduzione dello score MMSE nel postoperatorio hanno mostrato un significativo aumento dei valori di S100 β e NSE a 24 ore paragonati ai pazienti CEA ($p=0.02$).

Figura 6. Confronto tra i valori di S100 β nei due gruppi.

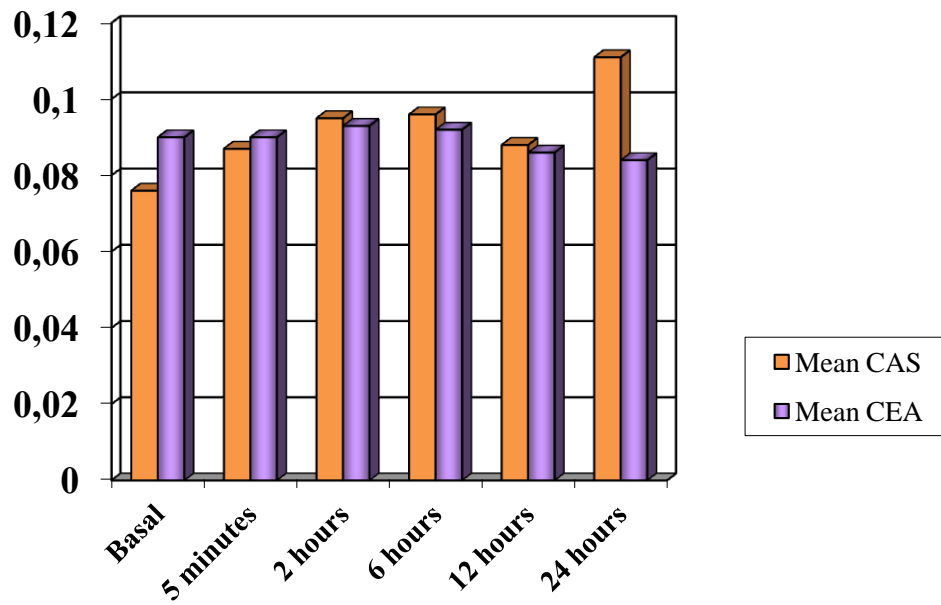
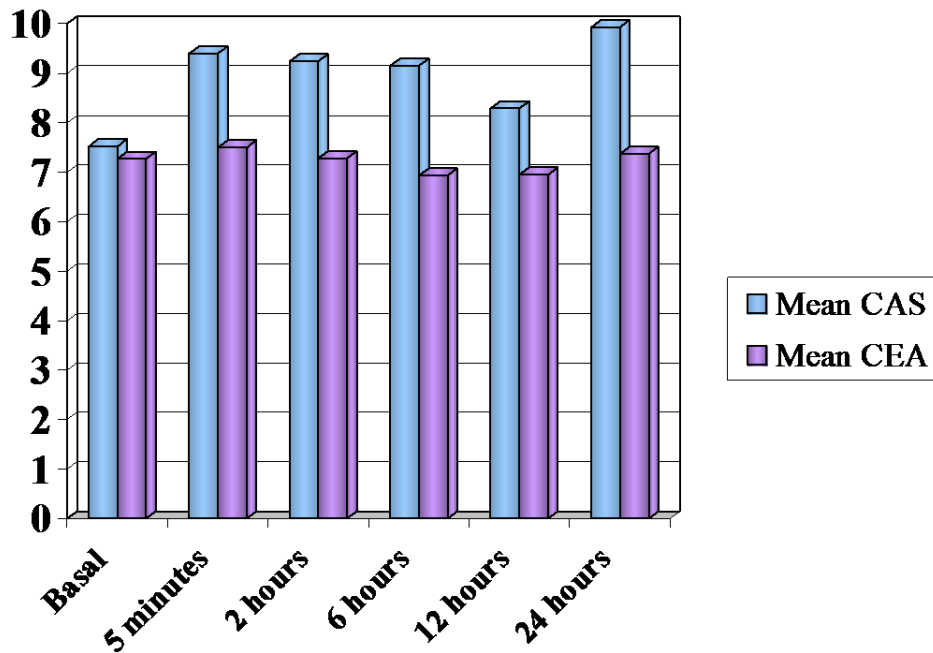


Figura 7. Confronto tra i valori di NSE nei due gruppi.



DISCUSSIONE

La Risonanza Magnetica Nucleare in Diffusione ha dimostrato di essere efficace nel rilevare nuove lesioni cerebrali già dopo pochi minuti dall'evento ischemico. Fenomeni microembolici cerebrali nell'immediato postoperatorio sono stati evidenziati in alcuni studi dopo rivascolarizzazione carotidea ed in particolare dopo procedure di stenting carotideo¹³. Dopo un ictus ischemico la DW-MRI è molto sensibile¹⁴, l'edema citotossico che si realizza nelle prime fasi di morte cellulare è evidente in DW già dopo 5-10 minuti dall'inizio dei sintomi di ictus e rimane per un massimo di due settimane. Tali immagini, combinate con le sequenze realizzate nei tempi di perfusione, possono evidenziare le regioni di "mismatch perfusione/diffusione", ovvero quelle si salvano dopo rivascolarizzazione³³.

Lo stenting carotideo è stato sviluppato come tecnica mini-invasiva alternativa all'endoarterectomia carotidea, la quale è raramente causa di lesioni ischemiche cerebrali intra o perioperatorie evidenziate alla DW-MRI³⁴⁻³⁵. Al contrario, alcuni autori hanno dimostrato che nell'intervento di stenting carotideo le lesioni ischemiche clinicamente manifeste o silenti (e quindi evidenti solo alla DW-MRI) erano molto più comuni rispetto alla CEA³⁴. Jordan WD et al.³⁵ hanno osservato con monitoraggio mediante Doppler transcranico un tasso di microemboli di 8 volte superiore alla CEA

durante l'intervento di stenting. Nel loro studio Rapp et al.¹³ hanno riportato eccellenti risultati clinici in una serie di 48 pazienti sottoposti a 54 procedure di CAS, tuttavia, al controllo cerebrale con DW-MRI è stata notata una preoccupante percentuale di nuove lesioni ischemiche clinicamente silenti. In particolare queste lesioni si sono evidenziate nelle 48 ore successive all'intervento. Sebbene nell'immediato le lesioni cerebrali subcliniche sembrano non avere conseguenze misurabili e già ad un controllo DW-MRI effettuato 6 mesi dopo lo stenting non sono più visibili nelle immagini, lesioni emboliche ripetute possono avere un effetto cumulativo³⁶. Nella nostra serie nessun paziente ha mostrato lesioni ischemiche subcentimetriche subcliniche al controllo con DW-MRI effettuato a 12 mesi, tuttavia, nei pazienti con lesioni postoperatorie, l'MMSE score è rimasto comunque inferiore a quello dei pazienti che non hanno presentato eventi ischemici. Questi dati della risonanza magnetica potrebbero essere dovuti ai suoi limiti temporali e spaziali (lesioni troppo piccole e troppo vecchie), mentre il deficit neurocognitivo rimane ancora rilevabile dai test neuro psicometrici³⁷⁻³⁸. Nel nostro studio non sono state rilevate lesioni ischemiche nel pre-operatorio alla DW-MRI, mentre al controllo effettuato a 24 ore dall'intervento 7 pazienti presentavano lesioni ischemiche acute subcentimetriche clinicamente silenti (6 CAS; 1 CEA).

Alterazioni neurologiche subcliniche nelle funzioni corticali superiori possono essere rilevate con l'utilizzo di test neuropsicometrici. Un basso punteggio raggiunto a questi test nei pazienti sottoposti a rivascolarizzazione carotidea è generalmente espressione di ipoperfusione o microembolia intra o post-operatoria. Mentre diversi studi hanno analizzato l'effetto della CEA sulla funzione cognitiva, raggiungendo spesso risultati tra loro opposti³⁹⁻⁴¹, poco si sa sugli effetti a lungo termine della CAS sulle capacità cognitive e quindi sulla performance dei pazienti nei test neuropsicometrici. Tali test non sono sempre di facile interpretazione, infatti alcuni autori hanno riportato un miglioramento del punteggio ai test neuropsicometrici con somministrazioni ripetute, come per una sorta di allenamento²⁹. Owens et al.⁴⁰ ha dimostrato che i pazienti con una stenosi carotidea superiore al 50% che non mostravano lesioni ischemiche alla TC di base e con radionuclide prima e dopo endoarterectomia, avevano un miglioramento delle capacità cognitive evidenziato da una batteria di test neuropsicometrici nell'immediato periodo post-operatorio (3-10 giorni); viceversa, nei pazienti con evidenza di nuove lesioni ischemiche la performance cognitiva andava deteriorandosi. Nei pazienti con lesioni molto piccole tuttavia il punteggio ottenuto ai test mostrava un miglioramento durante il follow-up, quindi con somministrazioni ripetute (3-6 mesi⁴⁰). Nel loro studio su aterosclerosi carotidea e declino cognitivo

vascolare, Dempsey et al.⁴¹ hanno evidenziato l'esistenza di una correlazione lineare tra aree instabili delle placche carotidee e declino cognitivo. La microembolia è stata rilevata e studiata in diverse procedure di rivascolarizzazione carotidea ed è stata oggetto di molti studi. Alcuni autori hanno riportato che l'incidenza di microemboli rilevata tramite DW-MRI era significativamente più alta in un gruppo di pazienti sottoposti a CAS rispetto ad un gruppo di confronto di pazienti sottoposto a CEA⁴²⁻⁴³.

Anche in un sottogruppo di pazienti arruolati nell'International Carotid Stenting Study (ICSS)⁴⁴ e sottoposti a DW-MRI postoperatoria, è stata evidenziata un'incidenza di microembolia tre volte superiore nei pazienti sottoposti a CAS rispetto a quelli sottoposti a CEA. Nella nostra casistica abbiamo rilevato un calo significativo nel punteggio MMSE postoperatorio nei pazienti sottoposti a stenting, mentre a 6 e 12 mesi è stato notato un lieve ma non significativo miglioramento. La valutazione a 12 mesi con MMSE ha mostrato un punteggio costantemente inferiore in quei pazienti con lesioni ischemiche postoperatorie rispetto ai pazienti con assenza di lesioni. Inoltre, abbiamo rilevato un'associazione significativa tra nuove lesioni ischemiche post-operatorie alla DW-MRI e declino dell'MMSE score nei pazienti del gruppo CAS rispetto ai valori pre-procedurali e ai pazienti con assenza di lesioni ischemiche post-operatorie. Tutto questo sembra suggerire che il principale responsabile del deficit

cognitivo e delle lesioni ischemiche subcliniche rilevate nel postoperatorio possa essere un meccanismo microembolico piuttosto che un'ipoperfusione, così come indicato anche da altri autori⁴²⁻⁴³. Nei pazienti del gruppo CAS abbiamo riscontrato livelli post-operatori più alti di S100 β e NSE e tutti i pazienti con nuove lesioni post-operatorie alla DW-MRI e declino significativo post-operatorio dell'MMSE score hanno mostrato un significativo aumento dell'S100 β a 24-ore. Le proteine NSE e S100 β sono considerate marcatori di danno neuronale^{9,10,15-28}. A causa della breve emivita, gli elevati livelli di S100 β osservati nel siero dei pazienti con ictus potrebbero rappresentare il rilascio continuo in circolo di questo marker da parte di aree cerebrali perilesionali che vengono progressivamente interessate dal processo ischemico, con un meccanismo di allargamento progressivo dell'infarto ad includere aree dette di penombra ischemica. In tal modo il rilascio dell'S100 β avverrebbe proprio ad opera delle aree di penombra ischemica, ovvero quelle aree che, se opportunamente e prontamente rivascolarizzate, potrebbero riacquistare la piena funzione⁴⁵. La progressiva necrosi delle aree di penombra ischemica potrebbe essere responsabile degli elevati livelli sierici di S100 β che si rilevano anche 2-4 giorni dopo un ictus cerebrale⁴⁶. Mentre le lesioni cerebrali più estese sono associate a livelli sierici di S100 β più elevati che si mantengono per diverso tempo²³, i pazienti con lesioni subcliniche

presentano livelli più bassi ma picchi più precoci. La proteina NSE è stata messa in relazione con l'ictus cerebrale: la sua concentrazione aumenta nel sangue periferico quanto più è estesa l'area neuronale danneggiata. In uno studio sperimentale condotto su un modello murino in cui veniva provocata l'occlusione di un'arteria cerebrale, è stato osservato un aumento significativo dell'NSE a partire da 2 ore dopo l'evento ischemico¹⁵. I livelli sierici di NSE aumentano a causa del rilascio di questa proteina dal citoplasma delle cellule neuronali e sono rilevabili ancora prima che si instauri un danno neuronale irreversibile^{15,16}. Il picco di NSE che viene rilevato in un paziente con ictus cerebrale entro 7-18 ore dall'insorgenza dell'evento, può riflettere il danno iniziale del tessuto neuronale, mentre il secondo picco che usualmente si registra può essere dovuto a meccanismi di danno neuronale secondario ad edema e aumento della pressione intracranica. In letteratura diversi Autori hanno riportato tuttavia risultati controversi sulla correlazione esistente tra livelli sierici di NSE, volume dell'infarto cerebrale e disturbi comportamentali^{19,20,47}. Nel nostro studio abbiamo analizzato i livelli di S100 β e NSE nella popolazione in studio sia come valori continui che come variabili categoriche (appartenenti al gruppo aumentato, diminuito e stabile) e abbiamo notato che in qualche misura possono essere considerati in relazione alla comparsa di lesioni ischemiche cerebrali subcliniche. Nonostante l'uso routinario dei sistemi di protezione

distale (filtri) durante la procedura di stenting carotideo, nei pazienti sottoposti a quest'ultimo trattamento abbiamo trovato un numero più elevato di nuove lesioni ischemiche alla DW-MRI e una diminuzione del punteggio MMSE, con differenze significative rispetto al gruppo CEA. Inoltre i pazienti del gruppo CAS con lesioni subcliniche hanno mostrato un trend in aumento di entrambi i markers di danno neuronale.

CONCLUSIONI

Nel nostro studio abbiamo evidenziato una corrispondenza tra declino cognitivo e lesioni ischemiche cerebrali subcliniche, rilevate con DW-MRI, ed aumento dei livelli di neurobiomarkers. Tali lesioni sono più frequenti dopo trattamento con tecnica endovascolare e sembrerebbero in relazione ad un meccanismo di tipo microembolico.

E' possibile fare alcune considerazioni: le procedure di rivascolarizzazione carotidea non dovrebbero essere valutate e confrontate solo sulla base del tasso di morte o di complicanze neurologiche maggiori, ma andrebbe valutata anche l'incidenza di microembolia come possibile causa di perdita di funzione cerebrale.

In tal senso ogni sforzo deve essere compiuto affinché il progresso delle nuove tecniche ci permetta di utilizzare procedure e materiali capaci di

minimizzare le complicanze cliniche e subcliniche, come nel caso dei sistemi di protezione cerebrale ad inversione di flusso. Inoltre, nuovi e più semplici metodi di valutazione del deficit cognitivo dovrebbero essere testati e convalidati in casistiche ampie, come per esempio la capacità dei test neuropsicometrici utilizzati insieme ai markers di danno neuronale di rilevare lesioni cerebrali subcliniche rispetto alla più costosa DW-MRI. L'eventuale utilizzo di queste metodiche permetterebbe un abbattimento dei costi della spesa sanitaria e un minor disagio per il paziente. Infine sembrerebbe auspicabile che gli studi su ampie popolazioni possano analizzare opportunamente l'effetto della microembolia nel tempo in tutti i pazienti sottoposti ad un intervento carotideo.

BIBLIOGRAFIA

1. Heart Disease and Stroke Statistics -- 2010 Update. American Heart Association. <http://www.americanheart.org>.
2. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. *N Engl J Med*. 1991 Aug 15;325(7):445-53.
3. Randomised trial of endarterectomy for recently symptomatic carotid stenosis: final results of the MRC European Carotid Surgery Trial (ECST). *Lancet* 1998; 351(9113): 1379-87.
4. Brott TG, Hobson RW 2nd, Howard G, Roubin GS, Clark WM, Brooks W, Mackey A, Hill MD, Leimgruber PP, Sheffet AJ, Howard VJ, Moore WS, Voeks JH, Hopkins LN, Cutlip DE, Cohen DJ, Popma JJ, Ferguson RD, Cohen SN, Blackshear JL, Silver FL, Mohr JP, Lal BK, Meschia JF; CREST Investigators. Stenting versus endarterectomy for treatment of carotid-artery stenosis. *N Engl J Med*. 2010 Jul 1;363(1):11-23. Epub 2010 May 26.

5. International Carotid Stenting Study investigators, Ederle J, Dobson J, Featherstone RL, Bonati LH, van der Worp HB, de Borst GJ, Lo TH, Gaines P, Dorman PJ, Macdonald S, Lyrer PA, Hendriks JM, McCollum C, Nederkoorn PJ, Brown MM. Carotid artery stenting compared with endarterectomy in patients with symptomatic carotid stenosis (International Carotid Stenting Study): an interim analysis of a randomised controlled trial. *Lancet*. 2010 Mar 20;375(9719):985-97. Epub 2010 Feb 25.
6. Purandare N, Burns A. Cerebral emboli in the genesis of dementia. *J Neurol Sci*. 2009 Aug 15;283(1-2):17-20.
7. Bendszus M, Stoll G. Silent cerebral ischaemia: hidden fingerprints of invasive medical procedures. *Lancet Neurol*. 2006 Apr;5(4):364-72.
8. Heyer EJ, Adams DC, Solomon RA, Todd GJ, Quest DO, McMahon DJ, et al. Neuropsychometric changes in patients after carotid endarterectomy. *Stroke* 1998; 1110-1115.
9. Wunderlich MT, Ebert AD, Kratz T, Goertler M, Jost S, Herrmann M. Early neurobehavioral outcome after stroke is related to release of neurobiochemical markers of brain damage. *Stroke* 1999; 30: 1190-1195.

10. Connolly ES, Winfree CJ, Rampersad A, Sharma R, Mack WJ, Mocco J, et al. Serum S100B protein levels are correlated with subclinical neurocognitive declines after carotid endarterectomy. *Neurosurgery* 2001; 49: 1076-1083.
11. Pearson S, Maddern G, Fitridge R. Cognitive performance in patients after carotid endarterectomy. *J Vasc Surg* 2003; 38: 1248-1253.
12. Crum RM, Anthony JC, Bassett SS, Folstein MF. Population-based norms for the Mini-Mental State Examination by age and educational level. *JAMA* 1993; 269: 2386–2391.
13. Rapp JH, Wakil L, Sawhney R, Pan XM, Yenari MA, Glastonbury C, et al. Subclinical embolization after carotid artery stenting: new lesions on diffusion-weighted magnetic resonance imaging occur postprocedure. *J Vasc Surg* 2007; 45: 867-874.
14. Moseley ME, Cohen Y, Mintorovitch J, Chileuitt L, Shimizu H, Kucharczyk J, et al. Early detection of regional cerebral ischemia in cats: comparison of diffusion- and T2-weighted MRI and spectroscopy. *Magn Reson Med* 1990; 14: 330–346.
15. Barone FC, Clark RK, Price WJ, White RF, Feuerstein GZ, Storer BL, et al. Neuron-specific enolase increases in cerebral and systemic circulation following focal ischemia. *Brain Res* 1993; 623: 77-82.

16. Hardemark H-G, Ericsson N, Kotwica Z, Rundstrom G, Mendel-Hartvig I, Olsson Y, et al. S-100 protein and neuron-specific enolase in CSF after experimental traumatic or focal ischemic brain damage. *J Neurosurg* 1989; 71: 727-731.
17. Buttner T, Weyers S, Postert T, Sprengelmeyer R, Kuhn W. S-100 protein: serum marker of focal brain damage after ischemic territorial MCA infarction. *Stroke* 1997; 28: 1961-1965.
18. Cunningham RT, Watt M, Winder J, McKinstry S, Lawson JT, Johnston CF, et al. Serum neuron-specific enolase as an indicator of stroke volume. *Eur J Clin Invest* 1996; 26: 298-303.
19. Missler U, Wiesmann M, Friedrich C, Kaps M. S-100 protein and neuron-specific enolase concentrations in blood as indicators of infarction volume and prognosis in acute ischemic stroke. *Stroke* 1997; 28: 1956-1960.
20. Persson L, Hardemark H-G, Gustafsson J, Rundstrom G, Mendel-Hartvig I, Esscher T, 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: 911-918.
21. Sindic CJM, Chalon MP, Cambiaso CL, Laterre EC, Masson PL. Assessment of damage to the central nervous system by determination

- of S-100 protein in the cerebrospinal fluid. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1982; 45:1130-1135.
22. Biberthaler P, Mussack T, Wiedermann E, Gilg T, Soyka M, Koller J, et al. Elevated serum levels of S-100B reflect the extent of brain injury in alcohol intoxicated patients after mild head trauma. *Shock* 2001; 16: 97-101.
23. Jonsson H, Johnsson P, Alling C, Backstrom M, Bergh C, Blomquist S, et al. S100beta after coronary artery surgery: release pattern, source of contamination, and relation to neuropsychometric outcome. *Ann Thorac Surg* 1999; 68: 2202-2208.
24. Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W. The S100 protein family: history, function and expression. *Brain Res Bull* 1995; 37: 417-429.
25. Jonsson H, Johnsson P, Høglund P, Alling C, Blomquist S. Elimination of S-100B and renal function after cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2002; 14: 698-701.
26. Jauch EC. Diagnosis of stroke: the use of serum markers. *Adv Emerg Card Neurovasc Care* 2002; 39–45.

27. Cooper EH. Neuron-specific enolase. *Int J Biol Markers* 1994; 9: 205-210.
28. Ingebrigsten T, Romner B. Biochemical serum markers for brain damage: a short review with emphasis on clinical utility in mild head injury. *Restorative Neurology and Neuroscience* 2003; 21: 171-176.
29. Hodkinson HM. Evaluation of a mental test score for assessment of mental impairment in the elderly. *Age and ageing* 1972; 1 : 233–238.
30. Rollason WN, Robertson GS, Cordiner CM, Hall DJ. A comparison of mental function in relation to hypotensive and normotensive anaesthesia in the elderly. *Br J Anaesth* 1971; 43: 561-566.
31. Yoneda Y, Tokui D, Hanihara T, Kitagaki H, Tabuchi M, Mori E. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging: detection of ischemic injury 39 minutes after onset in a stroke patient. *Ann Neurol* 1999; 45: 794-797.
32. Feiwell RJ, Besmertis L, Sardar R, Saloner DA, Rapp JH. Detection of clinically silent infarcts after carotid endarterectomy by use of diffusion-weighted imaging. *Am J Neuroradiol* 2001; 22: 646-649.
33. Forbes KP, Shill KA, Britt PM, Zabramski HM, Spetzler RF, Heiserman HE. Assessment of silent embolism from carotid

- endarterectomy by use of diffusion-weighted imaging. *Am J Neuroradiol* 2001; 22: 650-653.
34. Roh HG, Byun HS, Ryoo JW, Na DG, Moon WJ, Lee BB, et al. Prospective analysis of cerebral infarction after carotid endarterectomy and carotid artery stent placement by using diffusion-weighted imaging. *Am J Neuroradiol* 2005; 26: 376-384.
35. Jordan WD Jr, Voellinger DC, Doblal DD, Plyushcheva NP, Fisher WS, McDowell HA. Microemboli detected by transcranial Doppler monitoring in patients during carotid angioplasty versus carotid endarterectomy. *Cardiovasc Surg* 1999; 7: 33-38.
36. Hauth EA, Jansen C, Drescher R, Schwartz M, Forsting M, Jaeger HJ, et al. MR and clinical follow-up of diffusion-weighted cerebral lesions after carotid artery stenting. *Am J Neuroradiol* 2005; 26: 2336-2341.
37. Lal BK. Cognitive function after carotid artery revascularization. *Vasc Endovascular Surg*. 2007 Feb-Mar;41(1):5-13.
38. Bornstein RA, Benoit BG, Trites RL. Neuropsychological changes following carotid endarterectomy. *Can J Neurol Sci* 1981; 8: 127-132.
39. Falkensammer J, Oldenburg WA, Hendrzak AJ, Neuhauser B, Pedraza O, Ferman T, Klocker J, Biebl M, Hugl B, Meschia JF, Hakaim AG,

Brott TG. Evaluation of subclinical cerebral injury and neuropsychologic function in patients undergoing carotid endarterectomy. *Ann Vasc Surg.* 2008 Jul-Aug;22(4):497-504.

40. Owens M, Pressman M, Edwards AE, Tourtellotte W, Rose JG, Stern D, et al. The effect of small infarcts and carotid endarterectomy on postoperative psychologic test performance. *J Surg Res* 1980; 28: 209-216.

41. Dempsey RJ, Vemuganti R, Varghese T, Hermann BP. A review of carotid atherosclerosis and vascular cognitive decline: a new understanding of the keys to symptomology. *Neurosurgery.* 2010 Aug;67(2):484-93.

42. Zhou W, Dinishak D, Lane B, Hernandez-Boussard T, Bech F, Rosen A. Long-term radiographic outcomes of microemboli following carotid interventions. *J Vasc Surg.* 2009 Dec;50(6):1314-9.

43. Ghogawala Z, Westerveld M, Amin-Hanjani S. Cognitive outcomes after carotid revascularization: the role of cerebral emboli and hypoperfusion. *Neurosurgery.* 2008 Feb;62(2):385-95.

44. Bonati LH, Jongen LM, Haller S, Flach HZ, Dobson J, Nederkoorn PJ, Macdonald S, Gaines PA, Waaijer A, Stierli P, Jäger HR, Lyrer PA, Kappelle LJ, Wetzel SG, van der Lugt A, Mali WP, Brown MM, van

der Worp HB, Engelter ST; ICSS-MRI study group. New ischaemic brain lesions on MRI after stenting or endarterectomy for symptomatic carotid stenosis: a substudy of the International Carotid Stenting Study (ICSS). *Lancet Neurol.* 2010 Apr;9(4):353-62.

45. DeBette S, Markus HS. The clinical importance of white matter hyperintensities on brain magnetic resonance imaging: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2010 Jul 26;341:c3666.

46. Kilminster S, Treasure T, McMillan T, Holt DW. Neuropsychological change and S-100 protein release in 130 unselected patients undergoing cardiac surgery. *Stroke* 1999; 30: 1869-1874.

47. Rasmussen LS, Christiansen M, Johnson J, Gronholdt ML, Moller JT. Subtle brain damage cannot be detected by measuring neuron-specific enolase and S-100B protein after carotid endarterectomy. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2000; 14: 166-170.