

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE CHIRURGICHE

Ciclo XXVI

Settore Concorsuale di afferenza: 06E3

Settore Scientifico disciplinare: MED22

TITOLO TESI

MARKERS MORFOLOGICI E SIEROLOGICI DI VULNERABILITA' DELLA
PLACCA CAROTIDEA

Presentata da: Dott.ssa Raffaella Mauro

Coordinatore Dottorato

Prof. Andrea Stella

Relatore

Prof. Andrea Stella

Esame finale anno 2014

A mia madre, con amore

Indice

	Pagina
1. Introduzione	1
2. La placca carotidea: patogenesi e caratteristiche	5
2.1 Patogenesi	5
2.2 Il “fibrous cap”	8
2.3 La calcificazione	10
2.4 Il core lipidico	12
2.5 Gli elementi flogistici	14
2.6 La neoangiogenesi	17
3. Instabilità di placca e flogosi	21
3.1 PCR e infiammazione: marker o agente?	21
3.2 VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor e la neoangiogenesi	23
3.3 PAPP-A: Pregnancy-Associated Plasma Protein-A, nuovo marker di placca instabile	25
3.4 Iperomocisteinemia: un marker del passato	26
4. PCR e placca carotidea	28
4.1 PCR come fattore di rischio cerebrovascolare	28
4.2 PCR e progressione della stenosi carotidea	33
4.3 PCR e instabilità di placca carotidea	37
5. Neoangiogenesi nella placca carotidea	40
5.1 Microvascolarizzazione della placca carotidea	40
5.2 VEGF marker di vascolarizzazione della placca carotidea	41
5.3 CEUS nuovo metodo nella valutazione della vascolarizzazione intrapacca	42
6. Studi sull'instabilità della placca carotidea presso l'Università degli Studi di Bologna “Alma Mater Studiorum” U.O. Chirurgia Vascolare Prof. A.Stella	45
6.1 I livelli di PCR possono predire il grado di embolizzazione durante lo stenting carotideo	45
6.2 Identificazione della placca carotidea vulnerabile attraverso l'uso dell'ecografia con mezzo di contrasto	52

6.3 Discussione	59
7. Conclusioni	60
8. Bibliografia	62
9. Ringraziamenti	76

1. INTRODUZIONE

La patologia aterosclerotica nei paesi occidentali è in continuo aumento. E' determinata sia dal tipico stile di vita, con esposizione ai fattori di rischio cardiovascolare, sia dall'aumento dell'età media. Ciò comporta una maggiore incidenza di patologie coronariche e cerebrovascolari.

In particolar modo negli ultimi anni si è assistito ad un aumento della prevalenza delle lesioni aterosclerotiche carotidee con un contemporaneo aumento del rischio di ictus. Queste lesioni hanno una prevalenza nella popolazione generale del 2-4%, per stenosi >50%, e del 1-2% per stenosi >80%.¹⁻⁵ La prevalenza aumenta in maniera importante, raggiungendo il 10-30%, per stenosi >50%, in presenza di fattori di rischio quali il fumo, l'ipercolesterolemia o comorbilità quali arteriopatie periferiche o coronariche.⁶⁻¹⁰

Il distretto carotideo, in particolar modo la biforcazione della carotide comune in carotide interna ed esterna, rappresenta una sede tipica nello sviluppo di lesioni aterosclerotiche. Ciò è determinato da vari fattori. In primo luogo il cambiamento dello Shear Stress (forza tangenziale), che si verifica nel flusso ematico nella biforcazione carotidea, va a determinare uno stimolo sull'endotelio vascolare favorendo la deposizione di cristalli di colesterolo in sede subintimale. Oltre a ciò la presenza dei classici fattori di rischio cardiocircolatorio quali l'ipertensione, l'ipercolesterolemia (associata a bassi livelli di HDL), il diabete mellito e il fumo determinano direttamente la disfunzione endoteliale ed il progressivo sviluppo della placca aterosclerotica.¹¹⁻¹⁴

La presenza di una placca aterosclerotica nel distretto carotideo, rappresenta una condizione di provato rischio per sviluppo di eventi cerebrovascolari. Lesioni in grado di determinare una stenosi del lume vascolare maggiore del 60% si associano alla possibilità, in 5 anni, di sviluppo di ictus cerebrale dell' 11%.

Questa condizione di rischio risulta essere ulteriormente aumentata nel caso in cui la placca determini una sintomatologia cerebro-ischemica, come attacchi ischemici transitori o fenomeni di amaurosis fugax; in questo caso la possibilità di eventi maggiori (morte/ictus) sale al 22-26% con maggiore incidenza di questi eventi nei primi giorni successivi ai sintomi. (Fig.1)

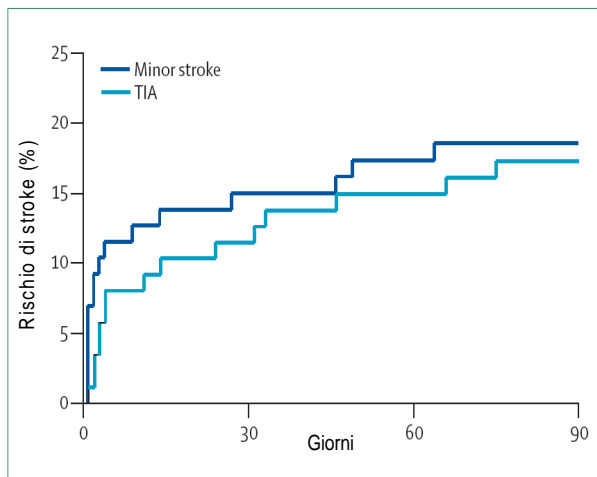


Figura 1: rischio di Major Stroke nei giorni successivi ad un Attacco Ischemico Transitorio (TIA) o Minor Stroke. È messo in evidenza il forte incremento del rischio di eventi maggiori che raggiunge il 18% dopo 90 giorni dal primo attacco (modificato da: Rothwell, Lancet Neurol 2006).

In funzione anche di caratteristiche cliniche del paziente, valutate nell'ABCD2 score (Fig.2 Tab.1) (A: age, età > 60 anni; B: blood pressure, pressione arteriosa sistolica > 140 o diastolica >90 mmHg; C: clinica features cioè l'entità delle manifestazioni cliniche; D: duration of symptoms, durata dei sintomi; D: diabetes, la presenza o meno di diabete) si individuano pazienti nei quali il rischio di ictus sale ulteriormente anche oltre al 20% nel periodo successivo alla prima manifestazione.¹⁵

Tabella 1: punteggio per i fattori di rischio dell'ABCD2 Score (modificato da: Johnston, Lancet 2007).

Fattori di Rischio	Punteggio
Età >60 anni	1
Pressione Arteriosa (mmHg)	
Sistolica >140 e/o Diastolica > 90	1
Manifestazioni Cliniche	
Ipostenia unilaterale	2
Disturbo linguaggio senza ipostenia	1
Altro	0
Durata dei sintomi	
> 60 min	2
10-59 min	1
< 9 min	0
Diabete Mellito	1

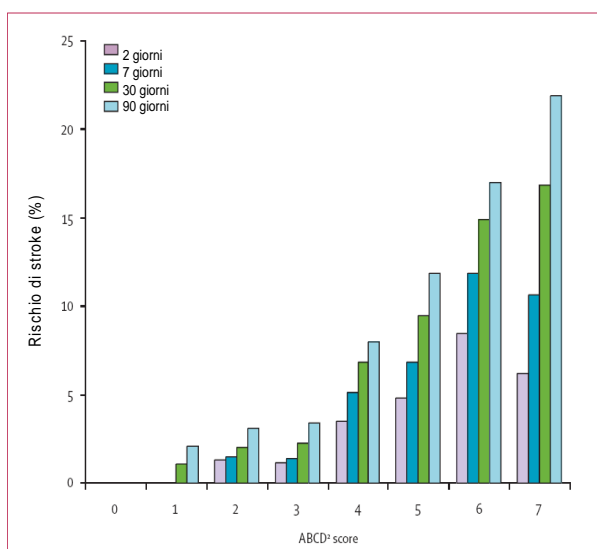


Figura 2: ABCD2 Score e rischio di Stroke

Trials clinici randomizzati hanno messo in evidenza, nei pazienti con placca carotidea e stenosi maggiore del 60%, il significativo beneficio del trattamento di rivascolarizzazione mediante endoarterectomia. Il beneficio è una riduzione relativa del 56% (ed assoluta del 11,6%) dello sviluppo di eventi maggiori nei pazienti con stenosi carotidea sintomatica e di una riduzione relativa del 34,5% (ed assoluta del 7,2%) dei pazienti che presentano una stenosi asintomatica.¹⁶⁻¹⁹ (Fig.3)

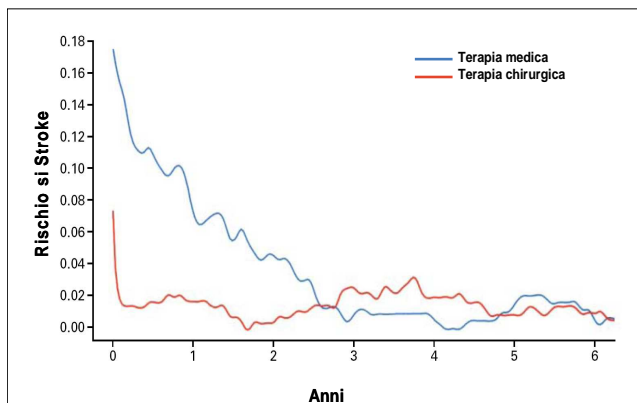


Figura 3: rischio di Stroke in pazienti con stenosi carotidea sintomatici, in seguito a terapia chirurgica o terapia medica. La riduzione del rischio risulta particolarmente significativa nei primi due anni dopo l'evento con una riduzione del rischio assoluto del 11,6% grazie alla terapia chirurgica rispetto alla sola terapia medica (modificato da: NASCET, N Engl J Med 1991).

La valutazione del rischio per lo sviluppo di eventi cerebrali è determinata routinariamente con la valutazione del grado di stenosi carotidea, che si ottiene con esami come l'Eco-Color-Doppler. Questo esame permette l'individuazione della stenosi analizzando la percentuale di riduzione del lume del vascolare ed esaminando le modificazioni del flusso ematico in questa sede. In corrispondenza della stenosi il flusso aumenta di velocità, per mantenere costante la portata cerebrale. Ciò permette una chiara ed oggettiva valutazione del grado di stenosi, definendo "emodinamiche" le stenosi >70% del lume, che determinano una forte accelerazione.²⁰

La sola analisi del grado di stenosi non permette però una valutazione dell'instabilità della placca, cioè della possibilità che essa possa andare incontro a fenomeni di emorragia interna, rottura del "fibrous cap" e sviluppo di trombosi, cioè di quei fenomeni fisiopatologici dinamici in grado di determinare embolie cerebrali. Per avere anche una possibile valutazione della vulnerabilità della placca si prende perciò in considerazione oggi anche la sua ecostruttura. La presenza di alterazioni di superficie, o una ecostruttura disomogenea, indicano instabilità di placca, in quanto rappresentano elementi come ulcere o core ricco in elementi lipidici. La valutazione della placca considerando la sua ecogenicità viene eseguita mediante il "Gray Scale Measurement" cioè la misurazione della scala di grigi della placca durante la valutazione B-mode all' Eco-Color-Doppler, identificando con valori più bassi, dovuti all'ipoecogenicità, le placche ricche in colesterolo, povere di calcio e con poca componente fibrosa nella sua superficie (placche instabili), mentre presentano valori più elevati, dovuti all'iperecogenicità, placche con una componente calcifica maggiore, una minore presenza di colesterolo e una composizione prevalentemente fibrosa, (placche stabili a minore rischio embolico).²¹⁻²⁴

Queste valutazioni rappresentano importanti strumenti aggiuntivi nella valutazione complessiva del rischio cerebrovascolare, poiché prendono in considerazione anche aspetti ecomorfologici della struttura interna della placca; tuttavia non prendono in considerazione gli aspetti dinamici interni ad essa, determinati dalla presenza di elementi flogistici e dal livello di microvascolarizzazione, che rappresentano invece le basi fisiopatologiche dell'instabilità della placca in grado di determinare una possibile rottura nella sua superficie, causa di eventi tromboembolici.

La valutazione di elementi correlati con l'instabilità interna della placca rappresenta l'obiettivo primario di numerosi nuovi studi che prendono in considerazione, con metodiche sierologiche o strumentali, sia markers sistemici di infiammazione associati all'infiltrato

flogistico della placca, sia il suo grado di vascolarizzazione, che è alla base di possibili fenomeni emorragici intrapacca.

2. LA PLACCA CAROTIDEA: PATOGENESI E CARATTERISTICHE

2.1 Patogenesi

L'aterosclerosi è caratterizzata da lesioni intimali, gli ateromi, protrudenti nel lume vascolare in grado di determinare alterazioni del normale decorso ematico e danni diretti sulla struttura del vaso. Queste lesioni hanno dapprima una distribuzione focale nell'arteria ma aumentando rapidamente di numero, man mano che la malattia progredisce, giungono ad interessare l'intera circonferenza delle pareti più severamente colpite.

Strutturalmente la lesione elementare consiste in una placca focale localizzata nell'intima, con un nucleo centrale di lipidi (in particolare colesterolo e suoi esteri) e ricoperta da un cappuccio fibroso, il "fibrous cap". Le placche aterosclerotiche sono costituite principalmente da elementi cellulari: cellule muscolari lisce, macrofagi e leucociti, tessuto connettivo della matrice extracellulare - collagene, fibre elastiche e proteoglicani - e depositi lipidici intra ed extra cellulari. Le proporzioni relative di queste componenti variano nelle differenti placche, dando luogo ad un ampio spettro di lesioni con diverso grado di instabilità. Il "fibrous cap" di rivestimento è formato da cellule muscolari lisce, scarsi leucociti e tessuto connettivo relativamente denso. L'area cellulata situata sotto e al fianco della cappa fibrosa - la "spalla" - è costituita da macrofagi, cellule muscolari lisce e linfociti T. Nel nucleo, più profondo e spesso necrotico, si localizza una massa disorganizzata di materiale lipidico, costituita da cristalli di colesterolo, detriti cellulari, trombi in stato di organizzazione ed altre proteine plasmatiche. I lipidi sono costituiti fundamentalmente da colesterolo e da suoi esteri. Sono presenti cellule che hanno fagocitato questo materiale lipidico, dette "cellule schiumose": principalmente monociti circolanti attivati in macrofagi e cellule muscolari lisce attivate. Infine, soprattutto nella periferia delle lesioni, sono frequenti aspetti di neovascolarizzazione, rappresentati da proliferazione di vasi sanguigni più o meno maturi. Le variazioni nelle caratteristiche istologiche delle placche dipendono - oltre che dai contenuti in lipidi - dal numero di cellule muscolari lisce e macrofagi, dalla quantità di collagene e dagli altri componenti extracellulari.²⁵

Lo sviluppo patogenetico di queste lesioni è ancora oggi non del tutto chiaro; si ritiene che l'endotelio giochi un ruolo fondamentale nello sviluppo iniziale della placca. L'ipotesi più accreditata pone alla base di questo processo, una reazione al danno intinale. L'aterosclerosi rappresenterebbe in questo caso una risposta infiammatoria della parete vascolare.²⁶

Elemento caratteristico delle lesioni primarie è la presenza di un endotelio ancora morfologicamente non danneggiato. Ciò ha permesso di considerare di fondamentale importanza - nello sviluppo della malattia - non tanto un danno diretto, quanto una disfunzione e un'attivazione cellulare, con un aumento della permeabilità endoteliale. Questa si manifesta con un incremento dell'adesione di leucociti e monociti, evidenziato da alterazioni nell'espressione delle molecole di adesione endoteliale ICAM-1 e VCAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule 1, Vascular Cell Adhesion Molecule 1).²⁷⁻²⁹

Le cause principali di disfunzione e danno endoteliale sono le alterazioni emodinamiche che si verificano in particolari punti dell'albero circolatorio - come le biforcazioni - e gli effetti nocivi dell'ipercolesterolemia.

Ruolo del flusso ematico. A supporto del ruolo del flusso, e delle sue modificazioni da laminare a turbolento con una perdita di forza tangenziale - quindi basso "Shear Stress" - è la localizzazione stessa delle placche che si presentano più tipicamente in sede ostiale o a livello di biforcazioni.^{30, 31}

Si ritiene che il flusso così modificato, con livelli variabili di stress parietali, causi locali disfunzioni endoteliali e predisponga quindi allo sviluppo di lesioni in queste sedi. (Fig.4)

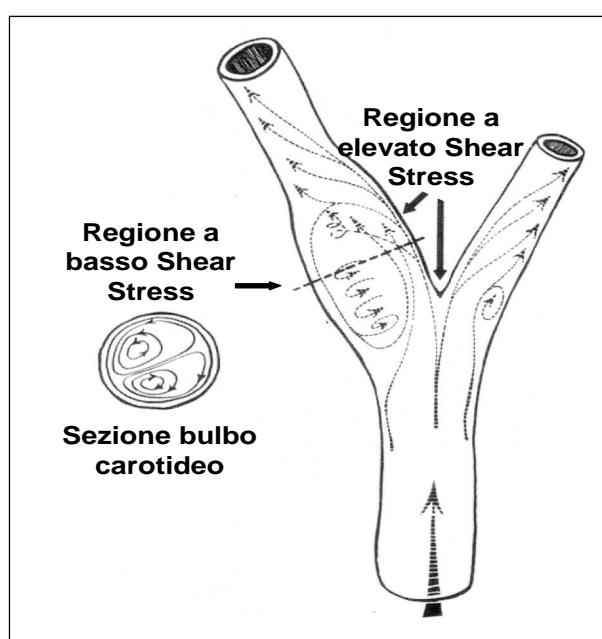


Figura 4: rappresentazione del flusso ematico al passaggio a livello della biforcazione carotidea. Nelle regioni in cui il flusso diviene turbolento si ha una riduzione dello Shear Stress causando disfunzioni endoteliali in grado di permettere una più facile formazione della placca.

Tutto ciò causa l'attivazione di numerosi geni pro-infiammatori e pro-aterogenici, da cui produzione di citochine, molecole di adesione e proteine della coagulazione, che causano un aumento di permeabilità endoteliale, del turn-over cellulare e dell'endocitosi cellulare di LDL presente in questa sede.

Ruolo dell'ipercolesterolemia. L'ipercolesterolemia è condizione base nello sviluppo della placca, per una maggiore deposizione in sede sottointimale di colesterolo. Oltre a ciò, lo stato iperlipidico stesso determina una disfunzione endoteliale, per una maggiore produzione di superossidodismutasi e di altri radicali liberi dell'ossigeno che disattivano l'ossido nitrico, principale fattore rilassante le arterie. Le modificazioni ossidative indotte da radicali liberi prodotte dai macrofagi e dalle cellule endoteliali portano alla formazione di LDL-ossidate, che a loro volta contribuiscono alla formazione di lesioni in vario modo:

1. possono essere facilmente fagocitate dai macrofagi con formazione delle cellule schiumose,
2. sono chemiotattiche per i monociti circolanti,
3. aumentano l'adesione dei monociti soprattutto attraverso l'induzione di molecole di adesione endoteliale,
4. inibiscono la mobilità dei macrofagi già presenti nella lesione, favorendo il reclutamento e il permanere dei macrofagi nelle placca,
5. stimolano il rilascio di fattori di crescita e citochine,
6. sono citotossiche per le cellule endoteliali e per le cellule muscolari lisce,
7. sono immunogene inducendo la produzione di anticorpi diretti contro lipoproteine ossidate.

Il concetto che l'iperlipidemia porti alla formazione di lesioni attraverso lo stress ossidativo sull'endotelio è comprovato da studi clinici e sperimentali che evidenziano come proteine antiossidanti e farmaci che riducono l'ossidazione hanno un effetto protettivo sull'aterosclerosi; inoltre la diminuzione del colesterolo e la terapia antiossidante migliorano la funzione endoteliale.³²

Nel meccanismo di genesi della placca i monociti, successivamente, aderiscono alla superficie endoteliale attivata grazie a molecole di adesione e quindi migrano attraverso tali cellule andando a localizzarsi in sede sottoendoteliale. In questa sede si trasformano in macrofagi e fagocitano le molecole di LDL-ossidate divenendo cellule schiumose. I macrofagi hanno un ruolo multifattoriale nella progressione dell'aterosclerosi grazie alla secrezione di proteine, come interleuchine (IL-1) e il fattore di crescita tumorale (TNF), che

aumentano l'adesione dei leucociti. I macrofagi producono inoltre radicali dell'ossigeno che causano l'ossidazione delle LDL nella lesione ed elaborano fattori di crescita che possono contribuire alla proliferazione di cellule muscolari lisce. Precocemente nello sviluppo della lesione le cellule muscolari lisce migrano nell'intima dove proliferano e determinano il deposito di materiale extracellulare, favorendo così l'accrescimento della placca.³³

Negli stadi precoci dell'aterogenesi la placca intimale è costituita dall'aggregazione di cellule schiumose, alcune delle quali possono morire rilasciando lipidi extracellulari e detriti cellulari che circondano le cellule muscolari. Progressivamente l'ateroma celluloadiposo si modifica, in seguito al deposito di collagene e proteoglicani. Il tessuto connettivo è particolarmente abbondante in sede intimale dove produce il "fibrous cap", che sviluppa così il fibroateroma maturo. Alcune di queste lesioni vanno incontro ad ulteriori modificazioni.

A. Possono accumulare maggiori quantitativi di tessuto connettivo, divenendo placche fibrose.

B. Possono presentare depositi calcifici.

C. Sviluppano un nucleo centrale ricco in lipidi e cellule schiumose, più potenzialmente a rischio di sviluppo d'importanti complicanze.²⁶ (Fig.5)

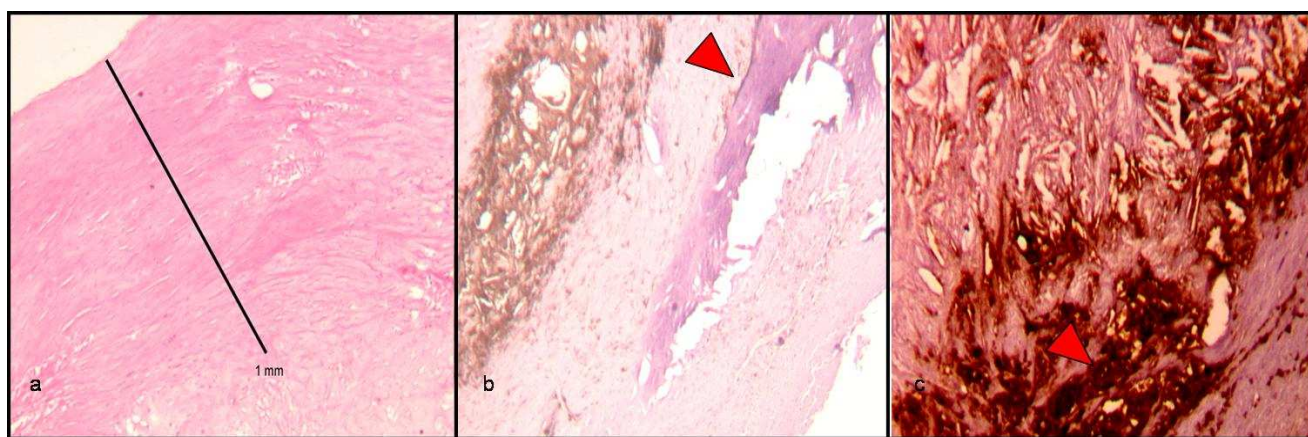


Figura 5: varie tipologie di placche carotidee, a) placca fibrosa, b) placca con componente calcifica, evidenziata dalla freccia, b) placca con ricca componente flogistica, evidenziata dalla freccia.

2.2 Il "fibrous cap"

Il "fibrous cap" è la parte fibrosa più esterna che avvolge la placca aterosclerotica. E' la struttura che separa il circolo ematico dal core necrotico della lesione ed è quindi di

grande importanza nella stabilità della placca. Lesioni sulla sua superficie possono mettere a contatto elementi circolanti - piastrine e fattori della coagulazione - con elementi interni della placca promuovendo la formazione di trombi.

Il cappuccio fibroso origina dall'attività secretoria delle cellule muscolari lisce. Queste cellule migrano dalla media in sede sottoendoteliale - durante la formazione della placca - dove producono collagene, fibre elastiche e proteoglicani, al fine di limitare l'allargamento verso il lume del vaso del processo infiammatorio presente nella placca.^{26, 30}

La presenza di un cappuccio fibroso sottile, "thin-fibrous cap", rappresenta quindi una condizione di placca instabile predisposta a rottura. Lo sviluppo di un cappuccio fibroso sottile è determinata da una serie di fenomeni:

1. attivazione dei leucociti all'interno della placca con produzione di metalloproteinasi,
2. degradazione di collagene e di proteoglicani prodotti delle cellule muscolari lisce,
3. liberazione di citochine in grado di ridurre l'attività delle cellule muscolari lisce.³⁴

Analisi istologiche hanno messo in evidenza che il "thin-fibrous cap" si associa a maggiori concentrazioni di macrofagi in sede sottoendoteliale. Il cappuccio fibroso sottile (<65 µm) è una condizione d'instabilità di placca per possibili rotture di superficie, indipendentemente dalle dimensioni del core necrotico.

Spesso in sede di lesioni del "fibrous cap", che non determinano fenomeni clinici maggiori, la riparazione della superficie ulcerata avviene in maniera incompleta. Questi siti sono punti di minore resistenza in grado di determinare successivamente altre fratture della superficie che possono associarsi a manifestazioni cliniche maggiori. Ciò giustifica le classiche manifestazioni della placca carotidea, la quale può dare un segnale premonitore con attacchi ischemici transitori (TIA: Transient Ischemic Attack), epifenomeno di una microfrattura sulla superficie della lesione aterosclerotica, alla quale spesso può seguire, nei giorni successivi, un evento ischemico maggiore (Stroke), per un'ulteriore rottura della placca non del tutto riparata.³⁵⁻³⁷

Valutazioni strumentali. Nello studio ecografico, la morfologia della superficie della placca rappresenta un elemento aggiuntivo nella valutazione del rischio associato ad una lesione carotidea, oltre all'analisi del grado di stenosi. L'individuazione di alterazioni, a livello della superficie della placca, come lesioni ulcerative (Fig.6) (identificate come introflessioni della superficie della placca di almeno 2 mm per 2 mm di lunghezza) è quindi di grande importanza nella valutazione complessiva del paziente, potendo individuare un rischio aggiuntivo di eventi ischemici. Anche altre metodiche di imaging, quali la Tomografia

Computerizzata (TC) o la Risonanza Magnetica (RM), permettono l'identificazione delle alterazioni strutturali e il rischio di eventi cerebrali per la presenza di un cappuccio fibroso particolarmente sottile, tuttavia il loro utilizzo nella pratica clinica è meno diffuso rispetto all'ecografia.³⁸⁻⁴⁰



Figura 6: placca ulcerata a livello della superficie del fibrous cap (freccia), identificata mediante valutazione ecografica. La presenza di lesioni nella struttura della placca carotidea rappresenta una condizione di instabilità strutturale e quindi di maggiore rischio per eventi cerebrovascolari.

Le alterazioni della superficie della placca o l'individuazione di “thin-fibrous cap” rappresentano una condizione di instabilità di placca e di maggiore rischio cerebrovascolare, tuttavia entrano in gioco solo parzialmente nel processo decisionale di trattamento chirurgico delle lesioni carotidee, dal momento che i dati dei maggiori trials clinici da cui originano le attuali indicazioni fanno riferimento soprattutto alla valutazione del grado di stenosi e alla possibile sintomatologia ad essa associata.

2.3 La calcificazione

La calcificazione a livello arterioso è un processo non ancora del tutto chiarito e si può presentare sia a livello della tunica media sia a livello intimale.

Tunica media. Il coinvolgimento della media, definita come sclerosi calcifica di Monckeberg, è un processo che si instaura in sedi non tipicamente coinvolte da fenomeni aterosclerotici, come i vasi distali degli arti, i vasi viscerali e i vasi tiroidei. La calcificazione si associa a patologie in cui si hanno alterazioni ioniche: disfunzioni metaboliche, elettrolitiche, diabete e insufficienza renale cronica. La calcificazione può anche essere determinata da alterazioni degli stimoli nervosi e dalle neuropatie. Altra causa ancora è la

simpaticectomia lombare, in seguito alle quale si ha un incrementato sviluppo di calcificazioni mediali nei vasi del piede omolaterale alla sede di simpaticectomia (88% in 2 anni) rispetto al piede controlaterale (18%).

Intima. La condizione più comune è la calcificazione intimale che si sviluppa a livello di lesioni aterosclerotiche. Le ipotesi più accreditate riconducono nell'infiammazione all'interno della placca la condizione predisponente la deposizione di cristalli di calcio (oltre a un possibile ruolo giocato da alterazioni nel metabolismo del fosforo e del calcio). La flogosi a livello della lesione aterosclerotica si associa alla liberazione di citochine che causano la produzione di molecole che stimolano la formazione di noduli calcifici. La Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2), secreta dalla cellule muscolari lisce, ha un ruolo fondamentale in questo processo. Gli stimoli all'interno della placca possono essere minimi - determinando microcalcificazioni - oppure possono essere particolarmente intensi: favorendo una progressiva differenziazione delle cellule muscolari lisce a cellule ad attività osteoblastica/osteocalastica con formazione di matrice ossea e anche tessuto osseo. Nelle placche aterosclerotiche carotidee il calcio si sviluppa inizialmente in noduli a livello basale, e successivamente con microcristalli in tutta la placca.⁴¹⁻⁴³

A livello vascolare l'individuazione di calcificazioni può essere un indice di aterosclerosi. Nelle coronarie il calcio si presenta solo nelle placche aterosclerotiche: ciò ha dato spazio a metodiche come la TC nella valutazione non invasiva di queste lesioni (*Calcium Score*). A livello di stenosi carotidee, essendo l'ecografia la metodica di indagine di primo livello con la quale è facile individuare la presenza di una placca, il ruolo della calcificazione come indice di aterosclerosi non viene utilizzato.

La presenza di depositi calcifici carotidei è al contrario, indice indiretto di stabilità della placca; la valutazione istologica delle placche carotidee ha infatti messo in evidenza in numerosi studi che le placche calcifiche si presentano tipicamente nei pazienti asintomatici, mentre le calcificazioni sono minime o assenti nei pazienti che hanno avuto sintomatologia neurologica e quindi con lesioni instabili. Analisi sui reperti anatomopatologici hanno confermato poi che la calcificazione all'interno della placca carotidea si associa ad un fibrous cap più spesso e a minore sviluppo del core lipidico, condizioni di stabilità di placca.⁴⁴

Nella valutazione ecografica la presenza di calcificazioni viene identificata con la presenza di forte iperecogenicità, che può determinare anche lo sviluppo di un cono d'ombra dovuto alla completa riflessione degli ultrasuoni. Ciò comporta una più difficile valutazione della lesione ateromastica; in queste lesioni la valutazione della modificazione

del flusso, successivo al cono d'ombra, è perciò fondamentale per l'identificazione e la valutazione del grado di stenosi.^{45, 46}

L'identificazione di una lesione carotidea calcifica quindi è di relativo interesse per l'indicazione ad un possibile trattamento chirurgico.

2.4 Il core lipidico

Il core lipidico della placca carotidea è l'elemento di maggiore interesse, poiché costituisce il componente principale nella determinazione della stenosi e di conseguenza del rischio cerebro-ischemico. Il core è formato principalmente da LDL, che dal circolo ematico oltrepassano la barriera endoteliale del vaso accumulandosi all'interno dell'intima. I macrofagi vengono richiamati e attivati dal deposito sottoendoteliale e si modificano in cellule schiumose. Queste cellule liberano sostanze ossidanti, andando a determinare la formazione delle LDL-ossidate che hanno un ruolo chemiotattico, stimolando l'evoluzione della lesione ateromatosa. Le concentrazioni sieriche di colesterolo, con elevati valori di LDL e bassi valori di HDL, sono fondamentali nello sviluppo della placca carotidea e si correlano con maggiore accumulo di lipidi all'interno della placca. La presenza di una ricca componente lipidica all'interno della placca carotidea è una condizione di maggiore instabilità strutturale - con possibili eventi embolici - per vari motivi.^{26, 47}

1. maggiore fragilità con possibili eventi di emorragia interna,
2. maggiore componente flogistica,
3. presenza di "thin-fibrous cap",
4. forte stimolo all'aggregazione piastrinica nel caso di lesioni

Di conseguenza le metodiche per l'identificazione di queste lesioni molto ricche in lipidi sono importanti.

Ipercolesterolemia. La valutazione delle concentrazioni sieriche di colesterolo è un primo elemento utile: nello studio ACST (Asymptomatic Carotid Surgery Trial) si evidenzia come i pazienti che presentano una stenosi carotidea al di sopra del 70% con valori di colesterolo ematico superiore a 250 mg/dl hanno un rischio significativamente maggiore di eventi ischemici rispetto al gruppo di pazienti con livelli sierici più bassi. Il trattamento mediante endoarterectomia di queste lesioni, determina una riduzione assoluta del rischio di eventi a

5 anni del 11,7% nei pazienti con livelli elevati di colesterolo contro il 4,6% nei pazienti con livelli più bassi.¹⁷

Valutazioni strumentali. La valutazione mediante tecniche di imaging della placca carotidea è un supporto nell'identificazione della componente interna del core. La valutazione ecografica diretta in B-Mode viene oggi utilizzata per la descrizione interna della placca, che viene definita ipoecogena nel caso in cui si presenti strutturalmente più scura rispetto alla componente avventiziale. Ciò è dovuto al fatto che il core lipidico non determina la riflessione delle onde ecografiche e si manifesta quindi scuro. Tuttavia la valutazione diretta non permette una oggettivazione del risultato, quindi è definita "operatore dipendente" e passibile di variazioni individuali. L'analisi della struttura della placca mediante la valutazione della scala di grigi "Grey Scale Mesurament" (GSM) rappresenta una metodica più oggettiva. Questa metodica considera la variazione media nella scala di grigi nell'area della placca, ricavandone un risultato numerico e di conseguenza non soggettivo. (Fig.7)

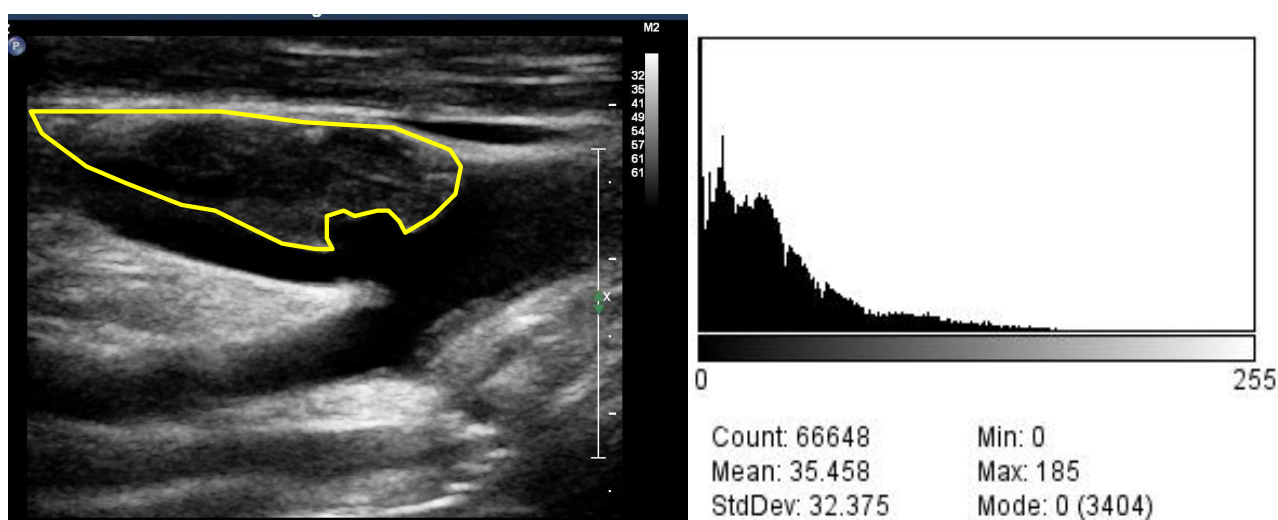


Figura 7: valutazione del Gray Scale Mesurament (GSM). A livello della regione di interesse (placca) viene calcolata la media della scala di grigi ricavando un valore numerico che ne indica il grado di ipoecogenicità.

Valutazioni mediante questa metodica hanno messo in evidenza che le placche sintomatiche più spesso hanno valori bassi di GSM (<50) mentre le placche asintomatiche valori maggiori, indice di una struttura più stabile e meno propensa a possibili complicazioni; inoltre, valutazioni a lungo termine hanno evidenziato come siano proprio le placche con GSM basso a determinare eventi ischemici.²¹⁻²⁴

Come già esposto in precedenza, anche con metodiche come CT o RM è possibile analizzare la struttura del core, traendone la conferma che lesioni strutturalmente più ricche in componente lipidica presentano maggiori rischi cerebrovascolari a lungo termine.^{48, 49}

Terapie Farmacologiche. L'utilizzo di terapie con farmaci in grado di determinare una riduzione delle concentrazioni ematiche di lipidi e colesterolo, quali gli inibitori dell'Idrossimetilglutaril-CoA Redattasi (statine), si sono rivelate in grado di ridurre il rischio cerebrovascolare, agendo sia su i livelli lipidici sia riducendo lo stato flogistico proprio dell'aterosclerosi. E' stato dimostrato che alte dosi di statine hanno efficacia nello stabilizzare la placca carotidea. Valutazioni ecografiche, in pazienti con stenosi carotidea tra 40-60% in terapia con Atorvastatina 80 mg/die (per 12 mesi), hanno evidenziato una significativa stabilizzazione ecografica della placca (con un aumento del GSM da 66 a 100) rispetto ai pazienti trattati con basse dosi di farmaco (GSM da 64 a 85).⁵⁰

Altri studi hanno evidenziato come la terapia con statine possa determinare una significativa riduzione delle concentrazioni di macrofagi e infiammazione all'interno della placca carotidea.⁵¹

Le statine si sono rivelate utili nel trattamento delle stenosi carotidee, perché riducono la componente lipidica del core e stabilizzano la placca, tuttavia in presenza di lesioni emodinamicamente significative la loro efficacia nel prevenire eventi cerebrovascolari non è stata dimostrata.^{52,53}

2.5 Gli elementi flogistici

Le cellule dell'infiammazione - in particolare i macrofagi e i linfociti T - rappresentano la componente attiva e dinamica all'interno della placca aterosclerotica. Si ritiene che i monociti circolanti possano localizzarsi a livello della lesione grazie all'espressione endoteliale di molecole di adesione (ICAM1 e VCAM1), dovuta all'attivazione cellulare, permettendone la migrazione in sede subintimale dove maturano in macrofagi.²⁷ Queste cellule sono elementi fondamentali nello sviluppo della placca, dalle fasi iniziali a quelle in cui la lesione va incontro a modificazioni in grado di determinare manifestazioni cliniche.

Le funzioni fisiologiche dei macrofagi sono diverse:

1. presentare l'antigene ai linfociti,

2. agire da cellule “spazzino” grazie ai recettori *scavenger* e recettori per la fagocitosi delle sostanze nocive,
3. liberare molecole (radicali) e citochine per rispondere a stimoli infettivi.

Il ruolo di queste cellule come principale agente infiammatorio all'interno della placca ateromatosa è quindi chiaro: le molecole di LDL, che si accumulano già nelle fasi iniziali del processo di aterosclerosi, vengono riconosciute come elementi estranei e di conseguenza fagocitate mediante il recettore *scavenger*. Le LDL internalizzate nei fagosomi, vanno incontro ad ossidazione, formando le LDL-ossidate. Le cellule che accumulano grandi quantità di colesterolo ossidato vengono chiamate cellule schiumose, tipiche della placca aterosclerotica. Quando queste cellule non sono in grado di metabolizzare ulteriormente LDL vanno incontro a morte, liberando nuovamente le LDL-ossidate, assieme a radicali e a molecole interne, stimolando nuovamente il processo. In più i macrofagi agiscono liberando attivamente nell'ambiente interstiziale radicali dell'ossigeno; queste sostanze - agendo sulle molecole di LDL - ne determinano l'ossidazione. Si verifica quindi un ulteriore richiamo leucocitario e un'attivazione maggiore dei macrofagi presenti, stimolandoli alla liberazione di citochine, fattori di crescita e radicali. I macrofagi liberano perossidasi, questi enzimi agiscono sulle LDL formando aldeidi e chetoni i quali si legano ad altre molecole di colesterolo, aumentandone il deposito e la successiva fagocitazione.

Il ruolo dei macrofagi nella stabilità di placca è dato anche dalla possibilità di liberare metalloproteinasi di matrice (matrix metalloproteinasi, MMP). Le MMP agiscono sulla componente extracellulare, degradando molecole di collagene e proteoglicani e rendono la struttura della placca meno stabile. L'attività delle MMP risulta essere rilevante nella modificazione del fibrous cap; questi enzimi sono in grado di ridurre lo spessore favorendo lo sviluppo di lesioni superficiali.

Infine i macrofagi liberando citochine che mediano la flogosi, IL1 e TNF, promuovono:

1. il mantenimento dell'infiammazione, con il richiamo di linfociti T e Mast cell,
2. lo stimolo a una maggiore attivazione cellulare,
3. l'inibizione di i processi di riparazione.

Tutto ciò instaura un processo lentamente progressivo e autoalimentato, in grado di fare evolvere in maniera negativa la lesione, con conseguenti manifestazioni cliniche.^{26, 54-57}

Valutazioni istologiche. Studi istologici su placche aterosclerotiche carotidee hanno messo in evidenza l'importanza dell'infiltrato flogistico nello sviluppo di placche instabili. Il

riscontro di una maggiore concentrazione di macrofagi in lesioni con “thin-fibrous cap” ed abbondante componente lipidica, confermano anche a livello carotideo il ruolo di queste cellule nello sviluppo di ulcerazioni di parete e di trombosi su placca. E’ stato anche evidenziato come la presenza di elementi macrofagici nella placca si associ a una maggiore incidenza di sintomi, ad ulteriore conferma del ruolo di queste cellule nello sviluppo di complicanze di placca.⁴⁶

Valutazioni strumentali. Metodiche strumentali per la valutazione dell’infiltrato flogistico all’interno della placca carotidea non sono di facile reperibilità. L’ecografia che convenzionalmente viene utilizzata per la valutazione di queste lesioni non fornisce alcuna informazione sulla presenza di elementi macrofagici o di infiammazione all’interno della placca. Allo stesso modo, metodiche più complesse come CT o RM, non danno informazioni sulla flogosi all’interno della placca quindi sul livello di instabilità morfologicamente non visibile.

La Tomografia ad Emissione di Positroni con 18 fluorodesossiglucosio (FDG-PET) è una nuova metodica che agisce somministrando molecole radio-emettenti che si localizzano nei siti di attività flogistica rendendoli chiaramente evidenti; la sovrapposizione di immagini CT ne permette poi la chiara localizzazione anatomica. Questa metodica, ancora in fase di valutazione, ha permesso di ricavare informazioni funzionali all’interno della placca carotidea. In più studi si è messo in evidenza la correlazione tra i livelli di captazione di FDG all’interno della placca e la concentrazione di macrofagi attivi (valutati su pezzi chirurgici post-endoarterectomia). In più, livelli di maggiore captazione di FDG sono fortemente espressi a livello di placche che hanno determinato una sintomatologia - quindi instabili - rispetto a lesioni asintomatiche. (Fig.8)

Questa metodica è stata anche utilizzata per evidenziare - in studi sperimentali su animali - l’efficacia di terapie mediche nella riduzione della componente flogistica in placche aterosclerotiche.

L’utilizzo della FDG-PET è quindi una metodica potenzialmente utile nella valutazione della placca carotidea, tuttavia la sua non completa validazione scientifica nella stratificazione del rischio e la sua reale disponibilità sul territorio, rendono questa metodica ancora lontana dal poter essere utilizzata nella pratica clinica.⁵⁸⁻⁶⁰

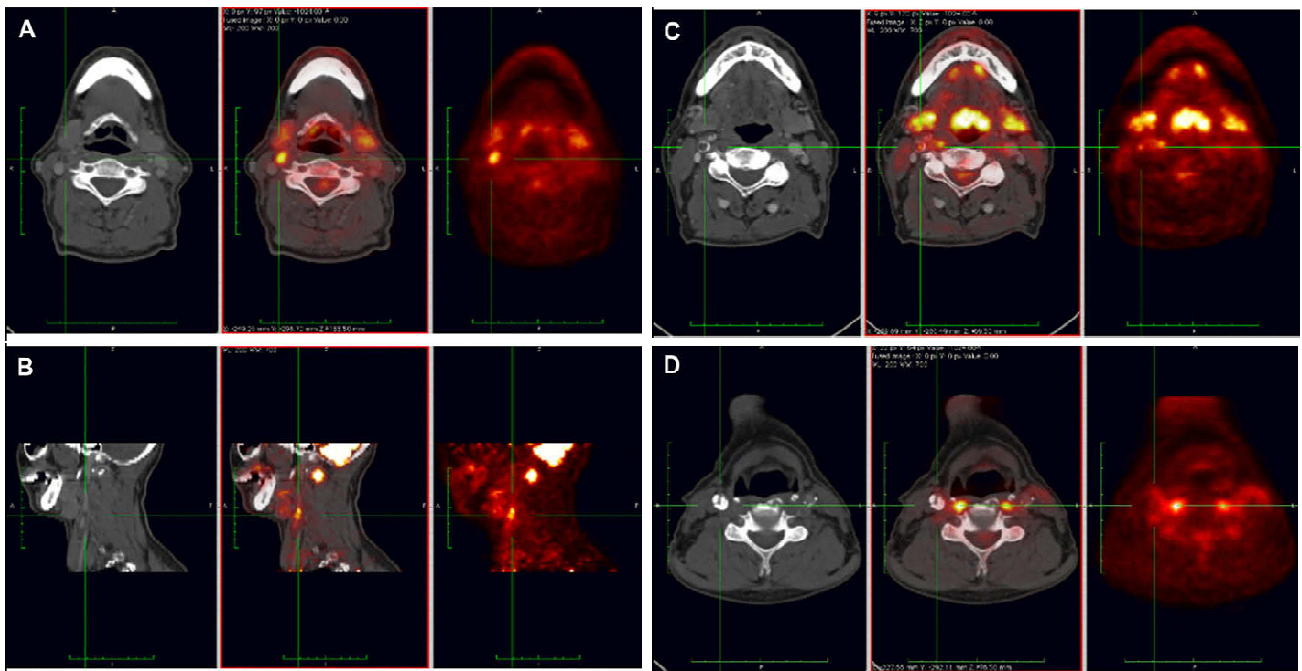


Figura 8: immagini di Tomografie ad Emissione di Positroni con 18 fluorodesossiglucosio (PET-FDG) con uptake a livello della carotide interna destra in tre pazienti. A) Immagine trasversale (e B) sagittale dello stesso paziente) con elevato uptake della placca carotidea, C) uptake intermedio e D) assente.

La mancanza di metodiche strumentali clinicamente utilizzabili nella valutazione del livello di flogosi interna della placca può essere compensata dalla valutazione di markers sistemici di infiammazione. Queste metodiche laboratoristiche non danno la possibilità di identificare la sede esatta delle lesioni aterosclerotiche più instabili, tuttavia il riscontro di un'elevazione di questi markers può indicare uno stato flogistico maggiormente attivo anche a livello delle lesioni aterosclerotiche.

Numerosi studi hanno posto l'accento sulla valutazione di uno stato flogistico più attivo e su possibili manifestazioni coronariche, ottenendo risultati significativi, utili per la gestione del paziente. A livello carotideo queste metodiche stanno iniziando ad essere prese in considerazione e i dati in letteratura sull'argomento sono significativi e verranno riproposti nei prossimi capitoli (Cap. 3 e Cap. 4).

2.6 La neoangiogenesi

Le arterie di dimensioni maggiori sono costituite esternamente da strutture vascolari, i Vasa Vasorum, atti a perfondere la tunica adventizia e media, non altrimenti irrorate dal

sangue circolante all'interno del lume del vaso. La presenza di condizioni in grado di incrementare lo spessore intimale, da depositi iniziali di colesterolo fino alle placche aterosclerotiche, rappresentano un ostacolo aggiuntivo al passaggio di ossigeno e di nutrienti in sede subintimale, creando una condizione di ipossia. Questa condizione rappresenta lo stimolo primario alla formazione di nuovi vasi che dai Vasa Vasorum più esterni possono approfondirsi permettendo la vascolarizzazione del vaso al di sotto delle strutture aterosclerotiche.^{61, 62} (Fig.9)

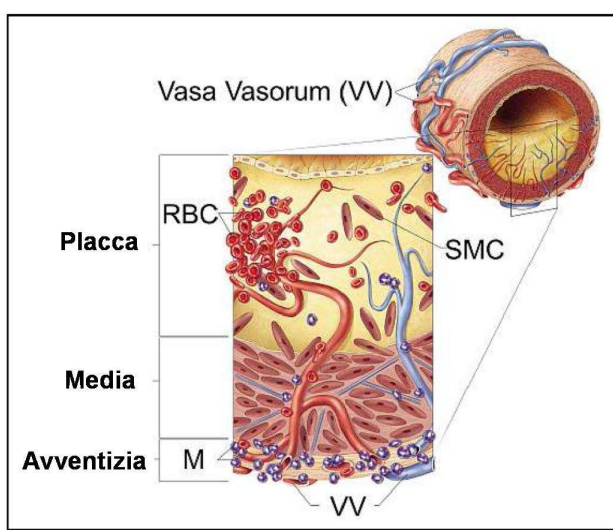


Figura 9: schematizzazione della neoangiogenesi intraplaacca. I microvasi prendono origine dai Vasa Vasorum esterni alla carotide penetrando nella placca favorendo fenomeni emorragici al suo interno.

Lo stato ipossico che causa la produzione cellulare di Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) - molecola principale nella attivazione endoteliale per la costituzione di nuovi micro vasi - è determinato dall'incremento dello spessore intimale oltre i 500 µm.

Lesioni aterosclerotiche si associano direttamente alla presenza di nuovi vasi avventiziali e alla neovascolarizzazione intrapacca. Il ruolo esclusivo dello stato ipossico non giustifica completamente l'attività angiogenetica all'interno della lesione aterosclerotica. La presenza di uno stato flogistico è un cofattore fondamentale nel loro sviluppo. L'attività secretoria di macrofagi, con formazione di radicali dell'ossigeno e liberazione di citochine, determina sia un danno tissutale sia una condizione di aumentato metabolismo cellulare, elementi che rappresentano uno stimolo neoangiogenetico. La formazione di queste strutture vascolari agisce anche come fattore in grado di aumentare lo stato flogistico all'interno della placca, in quanto favorisce la permeabilità ed il passaggio dei monociti dal flusso ematico a livello interstiziale. Si sviluppa quindi un circolo continuo nella formazione di vasi e di infiammazione.⁶³⁻⁶⁵

Il ruolo dei vasi all'interno della placca è quello di determinare una migliore perfusione cellulare, tuttavia nella lesione aterosclerotica la loro presenza è fondamentale per la progressione e per l'instabilità di placca. La vascolarizzazione da parte di vasi neoformati determina un maggiore apporto di colesterolo e di leucociti, incrementando lo stato flogistico. Inoltre si possono determinare fenomeni di emorragia intrapacca. Le cause che determinano lo stravasamento ematico all'interno del core si riconducono primariamente alla non completa formazione dei nuovi vasi e all'attività macrofagica; questi con la liberazione di MMP e formazione di radicali liberi determinano la rottura del vaso e lo stravasamento ematico. L'emorragia interna è l'elemento che rappresenta la condizione di maggiore instabilità. Questo determina un accumulo di globuli rossi e piastrine nel core lipidico, causando un significativo incremento nell'attività secernente macrofagica. Accumuli di ferro e di membrane dei globuli rossi causano inoltre maggiore deposito di colesterolo. Lesioni ateromatose con la presenza di emorragia interna sono strutturalmente meno stabili per modificazioni del core, che da lipidico diviene necrotico-emorragico, e per il rapido aumento di dimensioni.⁶⁶⁻⁶⁷

Nelle stenosi carotidee lo sviluppo di emorragia interna alla placca è una condizione che si associa direttamente a manifestazioni cliniche cerebrovascolari.

Le cause possono essere:

1. uno stato fortemente infiammatorio che si instaura dopo l'emorragia, causa la riduzione dello spessore del "fibrous cap" fino alla sua ulcerazione,
2. l'emorragia interna può determinare l'occlusione acuta del vaso nelle stenosi particolarmente serrate,
3. l'emorragia intrapacca determina un rapido incremento di pressione che porta alla rottura acuta del cappuccio fibroso permettendo la liberazione in circolo degli elementi della placca e l'aggregazione piastrinica, con conseguente formazione di trombo, in grado di embolizzare distalmente (questo è ritenuto il meccanismo fisiopatologico più significativo).⁶⁸

Valutazioni strumentali. Metodiche strumentali possono individuare la presenza di alterazioni interne alla placca: mediante l'ecografia l'identificazione di una lesione particolarmente ipoecogena - con un rapido incremento del livello di stenosi rispetto all'esame precedente - è suggestiva di sviluppo di un'emorragia all'interno della placca. Tuttavia questa metodica non ha un elevato grado di specificità, pur essendo molto sensibile, poiché componenti lipidiche interne al core presentano un'ecogenicità molto simile (Sen 90-94% Spe 65-84%).⁶⁹⁻⁷²

L'utilizzo di RM ad alta risoluzione permette di rilevare all'interno della placca la presenza di ematoma. Studi che hanno utilizzato questa metodica hanno messo in evidenza come la presenza di emorragia all'interno della placca si associ a una sua rapida progressione, e che lesioni nelle quali vi sia sviluppata una prima emorragia possano più facilmente (circa nel 40% dei casi, in un follow-up di 18 mesi) sviluppare un nuovo evento emorragico. Questi dati ricavati direttamente in vivo permettono di confermare i dati provenienti da studi sperimentali/istologici, avvalorando il ruolo dell'emorragia nella progressione e nell'instabilità della placca.^{73, 74}

Il ruolo fondamentale della vascolarizzazione della placca carotidea e della sua instabilità viene indagato in numerosi studi. Nuove metodiche strumentali (la RM ad alta risoluzione ne è un esempio, pur non potendo entrare nella pratica clinica per la scarsa reperibilità ed i suoi costi elevati) si stanno rilevando di grande efficacia per l'individuazione dei microvasi all'interno della placca. L'ecografia con mezzo di contrasto (Contrast Enhanced UltraSound CEUS) sta dando buoni risultati a questo proposito. Oltre a metodiche strumentali anche la valutazione di VEGF a livello sierico è soggetto a numerosi studi che ne confermano il ruolo fondamentale in questa patologia.

Queste nuove metodiche verranno discusse nei prossimi capitoli (Cap. 3 e Cap. 5).

3. INSTABILITA' DI PLACCA E FLOGOSI

3.1 PCR e infiammazione: marker o agente?

E' ormai chiaro il ruolo centrale dell'infiammazione nelle varie fasi dell'aterogenesi. L'attività dei macrofagi determina instabilità di placca per l'erosione del cappuccio fibroso e le alterazioni sui microvasi interni. L'attività flogistica si manifesta anche con la presenza di varie molecole - citochine, chemochine e interleuchine - che agiscono come stimolo sui leucociti a livello della placca.²⁶

Esistono numerosi studi che prendono in considerazione questi markers molecolari come elementi predittivi di eventi cardiovascolari. I markers più studiati sono: molecole di adesione cellulare, citochine, chemochine, molecole di fase acuta come il fibrinogeno e la Proteina C-Reattiva (PCR).⁷⁵

La PCR è stata ampiamente studiata, sono infatti presenti in letteratura numerose pubblicazioni a supporto del suo ruolo come marker di rischio cardiovascolare.

La PCR è una proteina della famiglia delle pentraxine; la sua produzione a livello epatico è regolata dai livelli sierici di IL-6, anche se IL-1 e TNF possono contribuire alla sua liberazione. L'emivita della PCR è di circa 19 ore ed è prodotta a livelli basali in condizioni di benessere e a livelli maggiori in stati di malattia. L'attività principale, legandosi ai recettori Fc macrofagici è di stimolare la fagocitosi di cellule morte per apoptosi o necrosi. Studi recenti hanno individuato siti di produzione di questa proteina anche al di fuori del fegato, come nelle lesioni aterosclerotiche (da parte di macrofagi e cellule muscolari lisce), nel rene, nei neuroni e nei macrofagi alveolari. La perossidazione lipidica e lo stato infettivo, con la liberazione di citochine infiammatorie, attivano il rilascio di PCR.⁷⁶⁻⁷⁸

PCR marker di rischio. Numerosi studi hanno dimostrato il ruolo predittivo della PCR per eventi cardiovascolari come l'infarto miocardico, le coronaropatie, la morte improvvisa, l'arteriopatia periferica e lo stroke in individui apparentemente sani.⁷⁹⁻⁸²

Su questi dati l'"American Heart Association" e "Centers for Disease Control and Prevention" hanno indicato che la PCR può essere usata come marker di rischio di patologie cardiovascolari.

Nelle raccomandazioni si ha:

- PCR < 1 mg/l: basso rischio
- PCR tra 1 e 3 mg/l: rischio intermedio

- PCR > 3 mg/l: rischio elevato

Nella valutazione del rischio la PCR deve essere dosata due volte a una distanza di un mese e i livelli devono rimanere all'interno di una stessa categoria. Tuttavia se i livelli sono maggiori a 10 mg/l, CRP non può essere utilizzata come marker di rischio cardiovascolare, perché è necessario escludere altri processi infiammatori (infettivi o traumatici). Nella prevenzione primaria di eventi cardiovascolari è necessario utilizzare la valutazione "altamente sensibile" della PCR (hsPCR) ed il paziente deve essere libero da stati di infiammazione acuta per almeno 2 settimane.

Condizioni che si associano a livelli maggiori di PCR sono: l'obesità, malattie infiammatorie croniche, la sindrome metabolica e il diabete mellito di tipo 2.

PCR agente di infiammazione. Il ruolo della PCR come fattore di rischio è ormai accettato ma il suo riscontro a livello della lesioni aterosclerotiche ha portato alla ricerca di una possibile attività direttamente nella placca. Sono presenti in letteratura affascinanti studi che hanno messo in luce il ruolo della PCR nelle cellule coinvolte nell'aterogenesi. Il limite di questi studi è la valutazione dell'attività di questa proteina in vitro o su modelli animali, non ancora sull'uomo in vivo. Di seguito è riportato un elenco riassuntivo delle attività cellulari connesse alla PCR. (Fig.10)

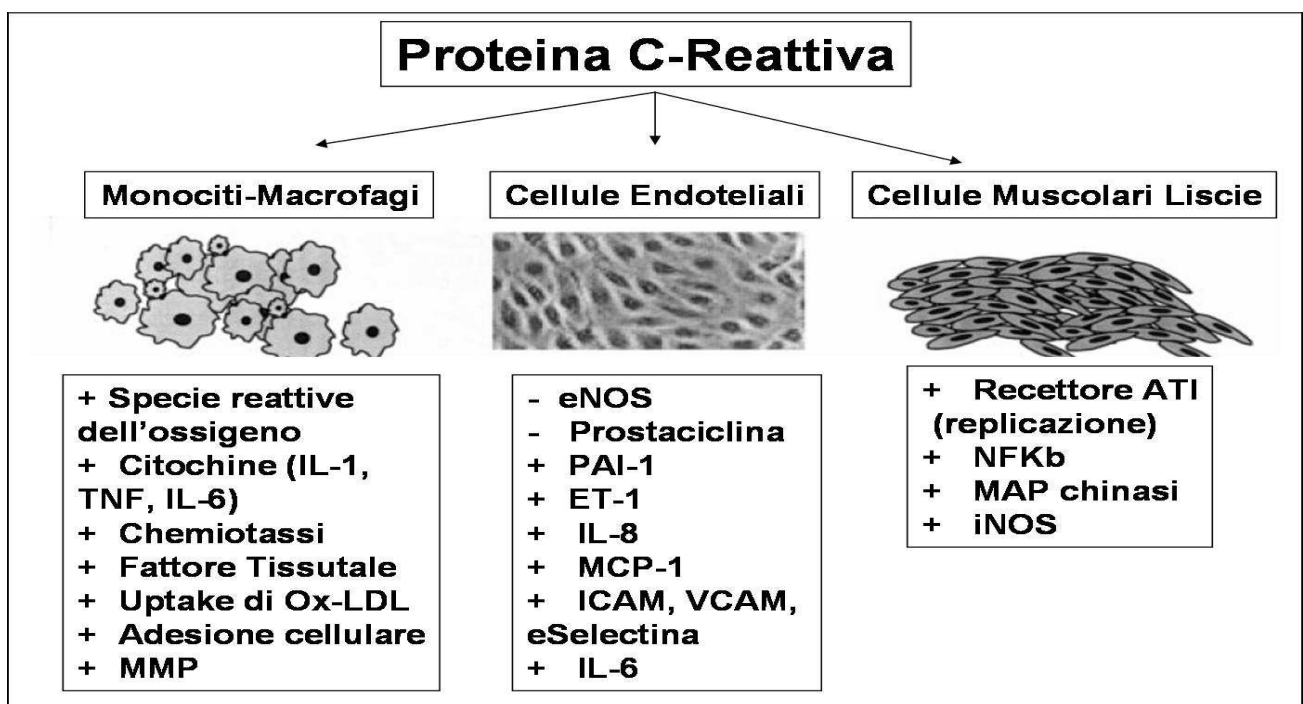


Figura 10: schematizzazione del ruolo della Proteina C-Reattiva su Monociti-Macrofagi, Cellule Endoteliali e Cellule Muscolari Liscie.

PCR e macrofagi: -PCR stimola la liberazione di elementi reattivi dell'ossigeno,⁸⁸

- stimola il rilascio di IL-6 e TNF,⁸⁹
- aumenta la liberazione di MMP1,⁹⁰
- promuove la fagocitosi di colesterolo.⁹¹

PCR e cellule endoteliali:-PCR stimola l'espressione di molecole di adesione per i monociti (ICAM1 e VCAM1),⁸³

- PCR correla con la vasoreattività e disfunzione endoteliale con l'inibizione della produzione di NO,^{84, 85}
- inibisce la produzione di prostaciline, che inibiscono l'aggregazione piastrinica e la proliferazione delle cellule muscolari lisce,⁸⁶
- stimola l'espressione di PAI-1 (inibitore dell'attivatore del plasminogeno1), ad azione aterogenetica e procoagulante.⁸⁷

PCR e cell musc lisce: -PCR stimola l'espressione di AT₁R (angiotensin type1 receptor) che ha un ruolo aterogenetico,⁹²

- stimola la proliferazione cellulare.⁹³

3.2 VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor e la neoangiogenesi

Il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) è una molecola chiave nello sviluppo dei vasi sanguigni nell'uomo. L'espressione di VEGF si ha nel periodo embrionale, durante lo sviluppo dell'albero vascolare, nelle fasi di accrescimento e nei processi di riparazione tissutale. L'angiogenesi è regolata fisiologicamente da VEGF ed i suoi inibitori. Nel momento in cui la regolazione fallisce i vasi sanguigni si formano eccessivamente o in maniera insufficiente.

Lo stimolo maggiore, nell'adulto, per la produzione e liberazione cellulare di VEGF è dato dall'ipossia; questa produzione si ha da parte di cellule normali e cellule tumorali. Molti studi hanno focalizzato l'attenzione sul ruolo del VEGF nello sviluppo di neoplasie solide; queste durante il loro accrescimento necessitano di nuove strutture vascolari e quindi liberano VEGF per formarle.⁹⁴

Solo negli ultimi anni il ruolo di questa molecola è stato preso in considerazione anche nell'aterogenesi. Nelle lesioni aterosclerotiche, per l'ipossia e per la liberazione di molecole da parte dei macrofagi, si ha l'espressione di VEGF. All'interno della placca si formano piccoli vasi che rendono la placca più instabile poiché facilitano il richiamo macrofagico e possono dare emorragie interne. Il VEGF è espresso dalle cellule endoteliali, macrofagi e cellule muscolari lisce.

La sua azione nella placca è data dai recettori coinvolti:

VEGFR1: (fms-related tyrosine kinase 1, Flt-1) determina l'azione proinfiammatoria,

VEGFR2: (kinase insert domain-containing receptor, KDR) regola l'angiogenesi.

La sua attività è messa in luce da studi sperimentali su animali, in cui la somministrazione di VEGF umano ricombinato aumenta - rispetto ai controlli trattati con placebo - le dimensioni delle lesioni aterosclerotiche, la loro vascolarizzazione e il contenuto di macrofagi. In altri studi su animali l'*angiostatina*, inibitore del VEGF, riduce l'accumulo di macrofagi e le dimensioni delle lesioni aterosclerotiche. Negli ultimi anni, molti studi hanno dimostrato che la presenza di VEGF nella placche aterosclerotiche si associa a instabilità, sia per l'angiogenesi sia per il grado di infiammazione al suo interno.⁹⁵⁻⁹⁸

Terapia farmacologia. Esistono farmaci, che al momento sono utilizzati nel trattamento di neoplasie, in grado di contrastare la neoangiogenesi. Il loro possibile ruolo nel ridurre la progressione delle lesioni aterosclerotiche è dimostrato nei modelli animali ma la loro applicazione nella pratica clinica è ancora controversa, visto che oltre al possibile beneficio della riduzione della vascolarizzazione intraplacca, si possono presentare effetti ischemici avversi in altri territori.⁹⁹

Il ruolo del VEGF nelle placche aterosclerotiche, comprese quelle carotidee, è chiaro. Studi stanno cercando di avvalorare l'ipotesi che questa molecola possa essere considerata un marker di rischio aterosclerotico, al fine di poter individuare lesioni carotidee ad alto rischio cerebrovascolare (Cap. 5.2).

3.3 PAPP-A: Pregnancy-Associated Plasma Protein-A, nuovo marker di placca instabile

La Pregnancy-Associated Plasma Protein-A (PAPP-A) è una zinco-metallo proteinasi, la sua valutazione sierologica è normalmente utilizzata durante la gravidanza nella diagnosi di trisomia 21. Negli ultimi anni è stata soggetta a numerosi studi che la correlano con l'instabilità coronarica. Questa proteina prodotta da macrofagi attivati è presente nelle placche aterosclerotiche causando, con le altre MMP, instabilità. Oltre alla presenza a livello della lesione aterosclerotica, PAPP-A passa in circolo nel momento in cui la placca sviluppa delle soluzioni di continuo sulla sua superficie.

Queste caratteristiche sono state soggette a numerosi studi nella patologia coronarica acuta. PAPP-A è fortemente espressa nelle cellule e nella matrice extracellulare di placche coronariche ulcerate o fissurate ma non nella lesioni stabili. In diversi studi i livelli circolanti di PAPP-A sono stati riscontrati elevati nei pazienti con angina instabile o con infarto miocardico acuto, mentre nei pazienti con angina stabile o nei controlli era a livelli bassi. Livelli sierici maggiori di 10 mIU/l identificano individui con sindrome acuta coronarica con una sensibilità del 89,2% e una specificità del 81,3%. Questo marker si rivela quindi di grande importanza, indicando uno stato di instabilità della placca aterosclerotica; in più è correlata con altri markers infiammatori, come PCR. La PAPP-A è anche stata identificata come marker di rischio indipendente per la presenza di coronaropatie nei pazienti stabili. Questi studi, nonostante di numero limitato, hanno dato buoni risultati nell'identificazione di PAPP-A come marker di coronaropatie, in quanto si presenta all'interno di placche instabili.¹⁰⁰⁻¹⁰²

La valutazione di PAPP-A nelle lesioni aterosclerotiche carotidiche è ancora agli esordi, tuttavia anche in questo distretto ha una stretta correlazione con le placche complicate. E' stata riscontrata una maggiore concentrazione sierica di PAPP-A in placche carotidiche strutturalmente ipoecogene e anche in pazienti asintomatici con maggiore componente infiammatoria nella placca.

Analisi istologiche di lesioni carotidiche hanno messo in evidenza che livelli elevati di PAPP-A si presentano in placche strutturalmente instabili o complicate, con il fibrous cap ulcerato o sottile e infiltrato flogistico. I livelli sierici di questa proteina si sono dimostrati più elevati in pazienti con placche ulcerate/vulnerabili rispetto ai pazienti con placche stabili.

Inoltre i livelli ematici di questa proteina sono maggiori nei pazienti sintomatici rispetto a quelli asintomatici.^{103, 104}

La necessità di una corretta stratificazione del rischio cardio/cerebrovascolare ha stimolato la ricerca questi e molti altri markers. Per le stenosi carotidee, specie nei pazienti asintomatici, è opportuno identificare i pazienti a maggiore rischio, per poi intervenire chirurgicamente. I pazienti con rischio cerebrovascolare minore, invece, beneficerebbero maggiormente dalla sola terapia medica. Il futuro di questi markers, se questi risultati preliminari potranno essere confermati in studi randomizzati controllati, potrà essere quello di entrare nel processo decisionale del trattamento chirurgico o meno di stenosi carotidee.

3.4 Iperomocisteinemia: un marker del passato

Dagli anni '60 l'iperomocisteinemia è stata considerata un fattore di rischio cardiovascolare. L'omocisteina è un aminoacido (con un gruppo sulfidrilico) derivante dal metabolismo (demetilazione) della metionina. In molti tessuti l'omocisteina viene nuovamente metilata - con formazione di metionina - grazie ad enzimi che utilizzano la vitamina B₁₂ come cofattore e acido folico nelle tappe successive.

Studi epidemiologici - cross-sectional e studi caso-controllo retrospettivi - hanno messo in evidenza come livelli elevati di questa molecola rappresentino un importante fattore di rischio di infarto miocardico, di stroke e di ateropatia periferica. Livelli elevati di omocisteina sono stati associati ad un incremento lineare del rischio di stroke ed infarto, con un aumento del rischio del 6-7% per ogni $\mu\text{mol/l}$ di omocisteina sopra il livello base.¹⁰⁴ Anche l'attività biologica di questa molecola, studiata sperimentalmente, è stata di supporto ai dati epidemiologici. L'omocisteina stimola l'adesione endoteliale dei leucociti, la loro migrazione sottointimale ed il danno endoteliale.

Cause di iperomocisteinemia possono essere:

1. Genetiche: deficit omozigotico del gene cistatione β -sintetasi (con frequenza in eterozigosi di 1:150),
2. Nutrizionali: deficit vitaminici (B₁₂, B₆, Ac. Folico), eccesso di metionina (proteine animali),
3. Malattie: anemia perniziosa, insufficienza renale, ipotiroidismo, neoplasie maligne,

4. Sostanze: Folati-antagonisti (methotrxate, fenitoina), Vit. B₆ antagonisti (teofillina), contraccettivi estrogenici orali, fumo di sigaretta,
5. Fattori biologici: età avanzata, sesso maschile, periodo post-menopausale.

L'individuazione di un così importante fattore di rischio e la semplice possibilità di trattamento con vitamine del gruppo B, per ridurre i livelli ematici, ha determinato grande entusiasmo.¹⁰⁵

Sul finire degli anni novanta, con la pubblicazione dei primi studi prospettici sull'argomento con risultati discordanti, alcuni autori hanno messo in dubbio il ruolo dell'iperomocisteinemia come fattore di rischio. Rispetto alla sua attività biologica è stato evidenziato che lo stato ischemico, con danno tissutale, è una causa di incremento sierico di questa molecola. In più, l'attività sui leucociti rientrerebbe nel processo di rimodellamento tissutale dopo insulto ischemico.^{106, 107}

Studi sperimentali su animali trattati con alte dosi di omocisteina non hanno mostrato un incremento di patologia aterosclerotica.¹⁰⁸

Negli ultimi anni sono stati pubblicati numerosi studi prospettici randomizzati/controllati sul trattamento con vitamine del gruppo B per ridurre i livelli di omocisteina e il rischio cardiovascolare. I risultati di questi studi sono unanimi nel considerare inutile il supplemento vitaminico e la riduzione dei livelli di omocisteina per diminuire il rischio cardiovascolare (primario e secondario).¹⁰⁹⁻¹¹¹

Altri studi che hanno preso in esame possibili sottogruppi - sesso femminile, insufficienza renale - hanno confermato l'inefficacia della terapia vitaminica.¹¹²⁻¹¹⁴

Alla luce di questi dati l'"American Heart Association" non considera l'iperomocisteinemia un fattore di rischio maggiore e non raccomanda l'uso di supplementi vitaminici (Vit. B₁₂, B₆, Ac. Folico) a scopo di prevenzione primaria o secondaria per patologie cardiovascolari.¹¹⁵

3. INSTABILITA' DI PLACCA E FLOGOSI

3.1 PCR e infiammazione: marker o agente?

E' ormai chiaro il ruolo centrale dell'infiammazione nelle varie fasi dell'aterogenesi. L'attività dei macrofagi determina instabilità di placca per l'erosione del cappuccio fibroso e le alterazioni sui microvasi interni. L'attività flogistica si manifesta anche con la presenza di varie molecole - citochine, chemochine e interleuchine - che agiscono come stimolo sui leucociti a livello della placca.²⁶

Esistono numerosi studi che prendono in considerazione questi markers molecolari come elementi predittivi di eventi cardiovascolari. I markers più studiati sono: molecole di adesione cellulare, citochine, chemochine, molecole di fase acuta come il fibrinogeno e la Proteina C-Reattiva (PCR).⁷⁵

La PCR è stata ampiamente studiata, sono infatti presenti in letteratura numerose pubblicazioni a supporto del suo ruolo come marker di rischio cardiovascolare.

La PCR è una proteina della famiglia delle pentraxine; la sua produzione a livello epatico è regolata dai livelli sierici di IL-6, anche se IL-1 e TNF possono contribuire alla sua liberazione. L'emivita della PCR è di circa 19 ore ed è prodotta a livelli basali in condizioni di benessere e a livelli maggiori in stati di malattia. L'attività principale, legandosi ai recettori Fc macrofagici è di stimolare la fagocitosi di cellule morte per apoptosi o necrosi. Studi recenti hanno individuato siti di produzione di questa proteina anche al di fuori del fegato, come nelle lesioni aterosclerotiche (da parte di macrofagi e cellule muscolari lisce), nel rene, nei neuroni e nei macrofagi alveolari. La perossidazione lipidica e lo stato infettivo, con la liberazione di citochine infiammatorie, attivano il rilascio di PCR.⁷⁶⁻⁷⁸

PCR marker di rischio. Numerosi studi hanno dimostrato il ruolo predittivo della PCR per eventi cardiovascolari come l'infarto miocardico, le coronaropatie, la morte improvvisa, l'arteriopatia periferica e lo stroke in individui apparentemente sani.⁷⁹⁻⁸²

Su questi dati l'"American Heart Association" e "Centers for Disease Control and Prevention" hanno indicato che la PCR può essere usata come marker di rischio di patologie cardiovascolari.

Nelle raccomandazioni si ha:

- PCR < 1 mg/l: basso rischio
- PCR tra 1 e 3 mg/l: rischio intermedio

- PCR > 3 mg/l: rischio elevato

Nella valutazione del rischio la PCR deve essere dosata due volte a una distanza di un mese e i livelli devono rimanere all'interno di una stessa categoria. Tuttavia se i livelli sono maggiori a 10 mg/l, CRP non può essere utilizzata come marker di rischio cardiovascolare, perché è necessario escludere altri processi infiammatori (infettivi o traumatici). Nella prevenzione primaria di eventi cardiovascolari è necessario utilizzare la valutazione "altamente sensibile" della PCR (hsPCR) ed il paziente deve essere libero da stati di infiammazione acuta per almeno 2 settimane.

Condizioni che si associano a livelli maggiori di PCR sono: l'obesità, malattie infiammatorie croniche, la sindrome metabolica e il diabete mellito di tipo 2.

PCR agente di infiammazione. Il ruolo della PCR come fattore di rischio è ormai accettato ma il suo riscontro a livello della lesioni aterosclerotiche ha portato alla ricerca di una possibile attività direttamente nella placca. Sono presenti in letteratura affascinanti studi che hanno messo in luce il ruolo della PCR nelle cellule coinvolte nell'aterogenesi. Il limite di questi studi è la valutazione dell'attività di questa proteina in vitro o su modelli animali, non ancora sull'uomo in vivo. Di seguito è riportato un elenco riassuntivo delle attività cellulari connesse alla PCR. (Fig.10)

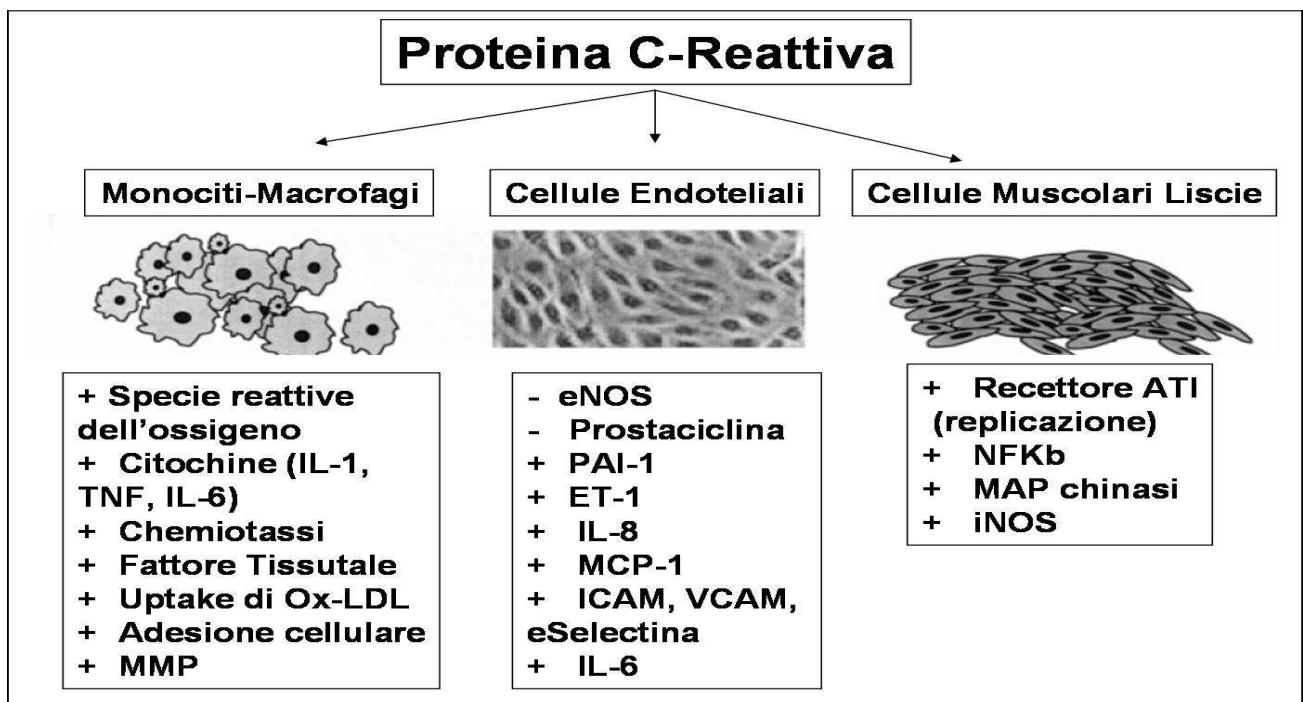


Figura 10: schematizzazione del ruolo della Proteina C-Reattiva su Monociti-Macrofagi, Cellule Endoteliali e Cellule Muscolari Liscie.

PCR e macrofagi: -PCR stimola la liberazione di elementi reattivi dell'ossigeno,⁸⁸

- stimola il rilascio di IL-6 e TNF,⁸⁹
- aumenta la liberazione di MMP1,⁹⁰
- promuove la fagocitosi di colesterolo.⁹¹

PCR e cellule endoteliali:-PCR stimola l'espressione di molecole di adesione per i monociti (ICAM1 e VCAM1),⁸³

- PCR correla con la vasoreattività e disfunzione endoteliale con l'inibizione della produzione di NO,^{84, 85}
- inibisce la produzione di prostaciline, che inibiscono l'aggregazione piastrinica e la proliferazione delle cellule muscolari lisce,⁸⁶
- stimola l'espressione di PAI-1 (inibitore dell'attivatore del plasminogeno1), ad azione aterogenetica e procoagulante.⁸⁷

PCR e cell musc lisce: -PCR stimola l'espressione di AT₁R (angiotensin type1 receptor) che ha un ruolo aterogenico,⁹²

- stimola la proliferazione cellulare.⁹³

3.2 VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor e la neoangiogenesi

Il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) è una molecola chiave nello sviluppo dei vasi sanguigni nell'uomo. L'espressione di VEGF si ha nel periodo embrionale, durante lo sviluppo dell'albero vascolare, nelle fasi di accrescimento e nei processi di riparazione tissutale. L'angiogenesi è regolata fisiologicamente da VEGF ed i suoi inibitori. Nel momento in cui la regolazione fallisce i vasi sanguigni si formano eccessivamente o in maniera insufficiente.

Lo stimolo maggiore, nell'adulto, per la produzione e liberazione cellulare di VEGF è dato dall'ipossia; questa produzione si ha da parte di cellule normali e cellule tumorali. Molti studi hanno focalizzato l'attenzione sul ruolo del VEGF nello sviluppo di neoplasie solide; queste durante il loro accrescimento necessitano di nuove strutture vascolari e quindi liberano VEGF per formarle.⁹⁴

Solo negli ultimi anni il ruolo di questa molecola è stato preso in considerazione anche nell'aterogenesi. Nelle lesioni aterosclerotiche, per l'ipossia e per la liberazione di molecole da parte dei macrofagi, si ha l'espressione di VEGF. All'interno della placca si formano piccoli vasi che rendono la placca più instabile poiché facilitano il richiamo macrofagico e possono dare emorragie interne. Il VEGF è espresso dalle cellule endoteliali, macrofagi e cellule muscolari lisce.

La sua azione nella placca è data dai recettori coinvolti:

VEGFR1: (fms-related tyrosine kinase 1, Flt-1) determina l'azione proinfiammatoria,

VEGFR2: (kinase insert domain-containing receptor, KDR) regola l'angiogenesi.

La sua attività è messa in luce da studi sperimentali su animali, in cui la somministrazione di VEGF umano ricombinato aumenta - rispetto ai controlli trattati con placebo - le dimensioni delle lesioni aterosclerotiche, la loro vascolarizzazione e il contenuto di macrofagi. In altri studi su animali l'*angiostatina*, inibitore del VEGF, riduce l'accumulo di macrofagi e le dimensioni delle lesioni aterosclerotiche. Negli ultimi anni, molti studi hanno dimostrato che la presenza di VEGF nella placche aterosclerotiche si associa a instabilità, sia per l'angiogenesi sia per il grado di infiammazione al suo interno.⁹⁵⁻⁹⁸

Terapia farmacologica. Esistono farmaci, che al momento sono utilizzati nel trattamento di neoplasie, in grado di contrastare la neoangiogenesi. Il loro possibile ruolo nel ridurre la progressione delle lesioni aterosclerotiche è dimostrato nei modelli animali ma la loro applicazione nella pratica clinica è ancora controversa, visto che oltre al possibile beneficio della riduzione della vascolarizzazione intraplacca, si possono presentare effetti ischemici avversi in altri territori.⁹⁹

Il ruolo del VEGF nelle placche aterosclerotiche, comprese quelle carotidee, è chiaro. Studi stanno cercando di avvalorare l'ipotesi che questa molecola possa essere considerata un marker di rischio aterosclerotico, al fine di poter individuare lesioni carotidee ad alto rischio cerebrovascolare (Cap. 5.2).

3.3 PAPP-A: Pregnancy-Associated Plasma Protein-A, nuovo marker di placca instabile

La Pregnancy-Associated Plasma Protein-A (PAPP-A) è una zinco-metallo proteinasi, la sua valutazione sierologica è normalmente utilizzata durante la gravidanza nella diagnosi di trisomia 21. Negli ultimi anni è stata soggetta a numerosi studi che la correlano con l'instabilità coronarica. Questa proteina prodotta da macrofagi attivati è presente nelle placche aterosclerotiche causando, con le altre MMP, instabilità. Oltre alla presenza a livello della lesione aterosclerotica, PAPP-A passa in circolo nel momento in cui la placca sviluppa delle soluzioni di continuo sulla sua superficie.

Queste caratteristiche sono state soggette a numerosi studi nella patologia coronarica acuta. PAPP-A è fortemente espressa nelle cellule e nella matrice extracellulare di placche coronariche ulcerate o fissurate ma non nella lesioni stabili. In diversi studi i livelli circolanti di PAPP-A sono stati riscontrati elevati nei pazienti con angina instabile o con infarto miocardico acuto, mentre nei pazienti con angina stabile o nei controlli era a livelli bassi. Livelli sierici maggiori di 10 mIU/l identificano individui con sindrome acuta coronarica con una sensibilità del 89,2% e una specificità del 81,3%. Questo marker si rivela quindi di grande importanza, indicando uno stato di instabilità della placca aterosclerotica; in più è correlata con altri markers infiammatori, come PCR. La PAPP-A è anche stata identificata come marker di rischio indipendente per la presenza di coronaropatie nei pazienti stabili. Questi studi, nonostante di numero limitato, hanno dato buoni risultati nell'identificazione di PAPP-A come marker di coronaropatie, in quanto si presenta all'interno di placche instabili.¹⁰⁰⁻¹⁰²

La valutazione di PAPP-A nelle lesioni aterosclerotiche carotidiche è ancora agli esordi, tuttavia anche in questo distretto ha una stretta correlazione con le placche complicate. E' stata riscontrata una maggiore concentrazione sierica di PAPP-A in placche carotidiche strutturalmente ipoecogene e anche in pazienti asintomatici con maggiore componente infiammatoria nella placca.

Analisi istologiche di lesioni carotidiche hanno messo in evidenza che livelli elevati di PAPP-A si presentano in placche strutturalmente instabili o complicate, con il fibrous cap ulcerato o sottile e infiltrato flogistico. I livelli sierici di questa proteina si sono dimostrati più elevati in pazienti con placche ulcerate/vulnerabili rispetto ai pazienti con placche stabili.

Inoltre i livelli ematici di questa proteina sono maggiori nei pazienti sintomatici rispetto a quelli asintomatici.^{103, 104}

La necessità di una corretta stratificazione del rischio cardio/cerebrovascolare ha stimolato la ricerca questi e molti altri markers. Per le stenosi carotidee, specie nei pazienti asintomatici, è opportuno identificare i pazienti a maggiore rischio, per poi intervenire chirurgicamente. I pazienti con rischio cerebrovascolare minore, invece, beneficerebbero maggiormente dalla sola terapia medica. Il futuro di questi markers, se questi risultati preliminari potranno essere confermati in studi randomizzati controllati, potrà essere quello di entrare nel processo decisionale del trattamento chirurgico o meno di stenosi carotidee.

3.4 Iperomocisteinemia: un marker del passato

Dagli anni '60 l'iperomocisteinemia è stata considerata un fattore di rischio cardiovascolare. L'omocisteina è un aminoacido (con un gruppo sulfidrilico) derivante dal metabolismo (demetilazione) della metionina. In molti tessuti l'omocisteina viene nuovamente metilata - con formazione di metionina - grazie ad enzimi che utilizzano la vitamina B₁₂ come cofattore e acido folico nelle tappe successive.

Studi epidemiologici - cross-sectional e studi caso-controllo retrospettivi - hanno messo in evidenza come livelli elevati di questa molecola rappresentino un importante fattore di rischio di infarto miocardico, di stroke e di ateropatia periferica. Livelli elevati di omocisteina sono stati associati ad un incremento lineare del rischio di stroke ed infarto, con un aumento del rischio del 6-7% per ogni $\mu\text{mol/l}$ di omocisteina sopra il livello base.¹⁰⁴ Anche l'attività biologica di questa molecola, studiata sperimentalmente, è stata di supporto ai dati epidemiologici. L'omocisteina stimola l'adesione endoteliale dei leucociti, la loro migrazione sottointimale ed il danno endoteliale.

Cause di iperomocisteinemia possono essere:

6. Genetiche: deficit omozigotico del gene cistatione β -sintetasi (con frequenza in eterozigosi di 1:150),
7. Nutrizionali: deficit vitaminici (B₁₂, B₆, Ac. Folico), eccesso di metionina (proteine animali),
8. Malattie: anemia perniziosa, insufficienza renale, ipotiroidismo, neoplasie maligne,

9. Sostanze: Folati-antagonisti (methotrxate, fenitoina), Vit. B₆ antagonisti (teofillina), contraccettivi estrogenici orali, fumo di sigaretta,
10. Fattori biologici: età avanzata, sesso maschile, periodo post-menopausale.

L'individuazione di un così importante fattore di rischio e la semplice possibilità di trattamento con vitamine del gruppo B, per ridurre i livelli ematici, ha determinato grande entusiasmo.¹⁰⁵

Sul finire degli anni novanta, con la pubblicazione dei primi studi prospettici sull'argomento con risultati discordanti, alcuni autori hanno messo in dubbio il ruolo dell'iperomocisteinemia come fattore di rischio. Rispetto alla sua attività biologica è stato evidenziato che lo stato ischemico, con danno tissutale, è una causa di incremento sierico di questa molecola. In più, l'attività sui leucociti rientrerebbe nel processo di rimodellamento tissutale dopo insulto ischemico.^{106, 107}

Studi sperimentali su animali trattati con alte dosi di omocisteina non hanno mostrato un incremento di patologia aterosclerotica.¹⁰⁸

Negli ultimi anni sono stati pubblicati numerosi studi prospettici randomizzati/controllati sul trattamento con vitamine del gruppo B per ridurre i livelli di omocisteina e il rischio cardiovascolare. I risultati di questi studi sono unanimi nel considerare inutile il supplemento vitaminico e la riduzione dei livelli di omocisteina per diminuire il rischio cardiovascolare (primario e secondario).¹⁰⁹⁻¹¹¹

Altri studi che hanno preso in esame possibili sottogruppi - sesso femminile, insufficienza renale - hanno confermato l'inefficacia della terapia vitaminica.¹¹²⁻¹¹⁴

Alla luce di questi dati l'"American Heart Association" non considera l'iperomocisteinemia un fattore di rischio maggiore e non raccomanda l'uso di supplementi vitaminici (Vit. B₁₂, B₆, Ac. Folico) a scopo di prevenzione primaria o secondaria per patologie cardiovascolari.¹¹⁵

4. PCR E PLACCA CAROTIDEA

4.1 PCR come fattore di rischio cerebrovascolare

La PCR è un fattore di rischio cardiovascolare indipendente, dati provenienti dal “*Framingham Study*” indicano che individui con livelli elevati di PCR hanno un rischio aumentato di eventi cardiovascolari: Odds Ratio (OR) di 2,13 (Intervallo di Confidenza [IC] al 95%, 1,38-2,28).¹¹⁶⁻¹¹⁹

Questi dati hanno portato alla formazione delle linee guida AHA/CDC (American Heart Association e Centers for Disease Control and Prevention) che raccomandano:¹²⁰

1. Valutazione hsPCR in individui con sindrome metabolica senza chiare infiammazioni in atto,
2. Il risultato deve essere espresso in mg/l valutato due volte a una distanza di 2 settimane,
3. Suddivisione dei pazienti in tre gruppi di rischio (<1 mg/l basso rischio; 1-3 mg/l rischio moderato; >3 mg/l rischio elevato),
4. I pazienti con PCR >3 mg/l presentano rischio doppio di patologie cardiovascolari rispetto ai pazienti con PCR <1 mg/l,
5. I pazienti con rischio cardiovascolare moderato la valutazione della hsCRP è utile oltre alla valutazione dei classici fattori di rischio; i pazienti con basso rischio o con rischio elevato l'influenza della hsPCR nel rischio globale è modesta.

La PCR è utile quindi nella valutazione globale del rischio coronarico, ma è significativa anche per la valutazione del rischio di stroke.

È stata individuata una significativa associazione tra livelli elevati di hsPCR e la presenza di infarti cerebrali silenti con una prevalenza del 30% in individui con hsPCR > 8 mg/l rispetto al 15% in individui con hsCRP<7 mg/l (OR 1,50, IC 95% 1,00-2,24).¹²¹

Diversi studi prospettici hanno dimostrato che una singola misurazione di hsPCR in persone apparentemente sane è predittiva di futuri eventi cerebrovascolari: si ha incidenza doppia di ictus tra pazienti con elevati livelli di PCR rispetto a quelli con bassi livelli. La correlazione tra PCR e l'incidenza di futuri eventi si è dimostrata indipendente dagli altri fattori di rischio (età, fumo, colesterolemia, pressione sanguigna e diabete). Nella

popolazione generale è stato valutato il rischio di eventi cerebrali in funzione dei livelli di PCR, si ha:¹²²

- per PCR < 2,1 mg/l un OR 1,26
- per PCR 2,1-5,5 mg/l un OR 1,58
- per PCR >5,5 mg/l un OR 2,21

Il ruolo della PCR nella valutazione globale del rischio di eventi cerebrovascolari è quindi un fattore di rischio indipendente in con un livello di evidenza B e classe IIa.

Il ruolo della PCR nella prevenzione secondaria è più complesso in quanto il danno ischemico cerebrale determina l'attivazione leucocitaria per il rimodellamento tissutale; ciò comporta un incremento dei livelli di PCR. Livelli elevati di questa proteina dopo un evento cerebrovascolare rappresentano comunque un marker indipendente di rischio cardiovascolare e di morte (livello di evidenza B, classe IIb).¹²³

La possibilità di screening della popolazione generale ed il trattamento più adeguato - per lo stato flogistico associato a elevati livelli di PCR - non sono ancora stati chiariti da studi specifici. Inoltre la possibile patogenesi non aterosclerotica di molti strokes riduce la sensibilità della valutazione della PCR.

Il ruolo della PCR acquisisce maggiore importanza clinica se utilizzata per la valutazione del rischio in sottogruppi di pazienti che presentano già un determinato rischio. Nella Sindrome Metabolica (presenza di almeno 3 caratteristiche tra: obesità, ipertensione, ipertrigliceridemia, bassi livelli di HDL e alterazioni glucidiche) la presenza di elevati livelli di PCR è di grande importanza nella stratificazione del rischio cerebro/cardiovascolare. I valori medi di PCR incrementano con l'aumentare dei fattori di rischio e rappresentano un rischio aggiunto di ictus rispetto ai pazienti con livelli normali.¹²⁴

Stenosi carotidea. In pazienti con stenosi carotidea la valutazione della PCR si è rivelata molto importante. Esiste una relazione tra l'incremento dei livelli di PCR e la presenza stessa di placca carotidea. È stata identificata una differenza significativa - indipendente rispetto ad altri fattori di rischio - nelle concentrazioni di PCR tra pazienti con stenosi carotidea ($3,7 \pm 6,1$ mg/l) rispetto a pazienti senza stenosi ($1,9 \pm 2,1$ mg/l).¹²⁵

In letteratura pochi studi prospettici hanno analizzato il rischio di eventi maggiori in pazienti con stenosi carotidea in funzione dei livelli di PCR. La presenza di elevati livelli sierici di PCR si è dimostrata in uno studio prospettico su 1065 pazienti con stenosi carotidea asintomatica (Schlager et al.) come un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di eventi maggiori - stroke, infarto miocardico, morte - con un Hazard Ratio (HR) di 2,9 (IC 95%, 1,83 a 4,87) per livelli di hsPCR > 7,4 mg/l. La sopravvivenza libera da eventi in 3

anni di follow-up è stata del 73% nei pazienti con hsPCR > 7,4 mg/l del 89% nei pazienti con hsPCR < 1,1 mg/dl. (Fig.11)

Il rischio incrementato è indipendente dai classici fattori di rischio e anche dal grado di stenosi (maggiore o minore del 50%). (Fig. 12)

In questi dati si considerano come eventi maggiori anche patologie coronariche e non solo eventi cerebrovascolari; nonostante ciò il ruolo della PCR acquisisce maggiore importanza nella stratificazione del rischio di stroke in pazienti con stenosi carotidea.¹²⁶

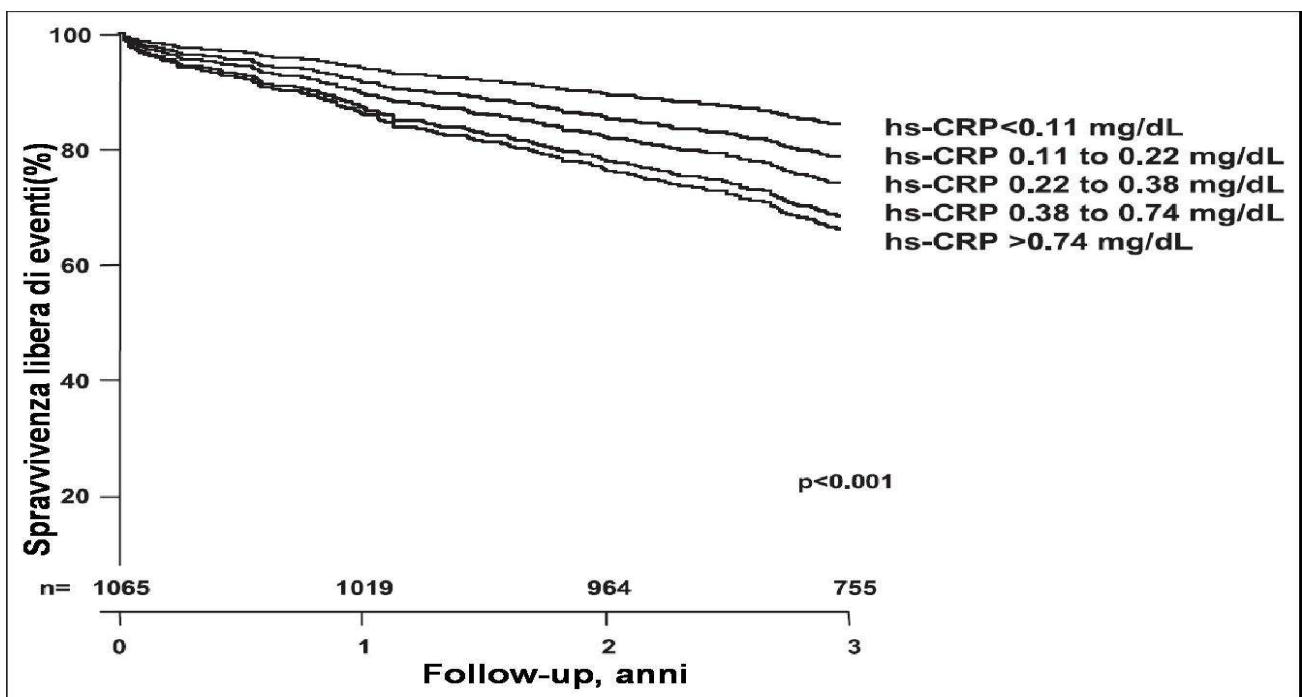


Figura 11: sopravvivenza libera da eventi (stroke, infarto miocardico e morte) in pazienti con stenosi carotidea. La sopravvivenza libera da eventi in 3 anni di follow-up è stata del 73% nei pazienti con hsPCR > 7,4 mg/l del 89% nei pazienti con hsPCR < 1,1 mg/dl; $p < 0,001$ (modificato da: Schlager, Stroke 2007).

hs-CRP (mg/dL)
 <0.11
 0.11 to 0.22
 0.22 to 0.38
 0.38 to 0.74
 >0.74

Q1
 Q2
 Q3
 Q4
 Q5

Rischio di eventi cardiovascolari

Iperensione
 NO

Q1
 Q2
 Q3
 Q4
 Q5

SI

Q1
 Q2
 Q3
 Q4
 Q5

Diabete
 NO

Q1
 Q2
 Q3
 Q4
 Q5

SI

Q1
 Q2
 Q3
 Q4
 Q5

Dislipidemia
 NO

Q1
 Q2
 Q3
 Q4
 Q5

SI

Q1
 Q2
 Q3
 Q4
 Q5

Fumo
 NO

Q1
 Q2
 Q3
 Q4
 Q5

SI

Q1
 Q2
 Q3
 Q4
 Q5

Grado di stenosi
 carotidea
 <50%

Q1
 Q2
 Q3
 Q4
 Q5

>50%

Q1
 Q2
 Q3
 Q4
 Q5

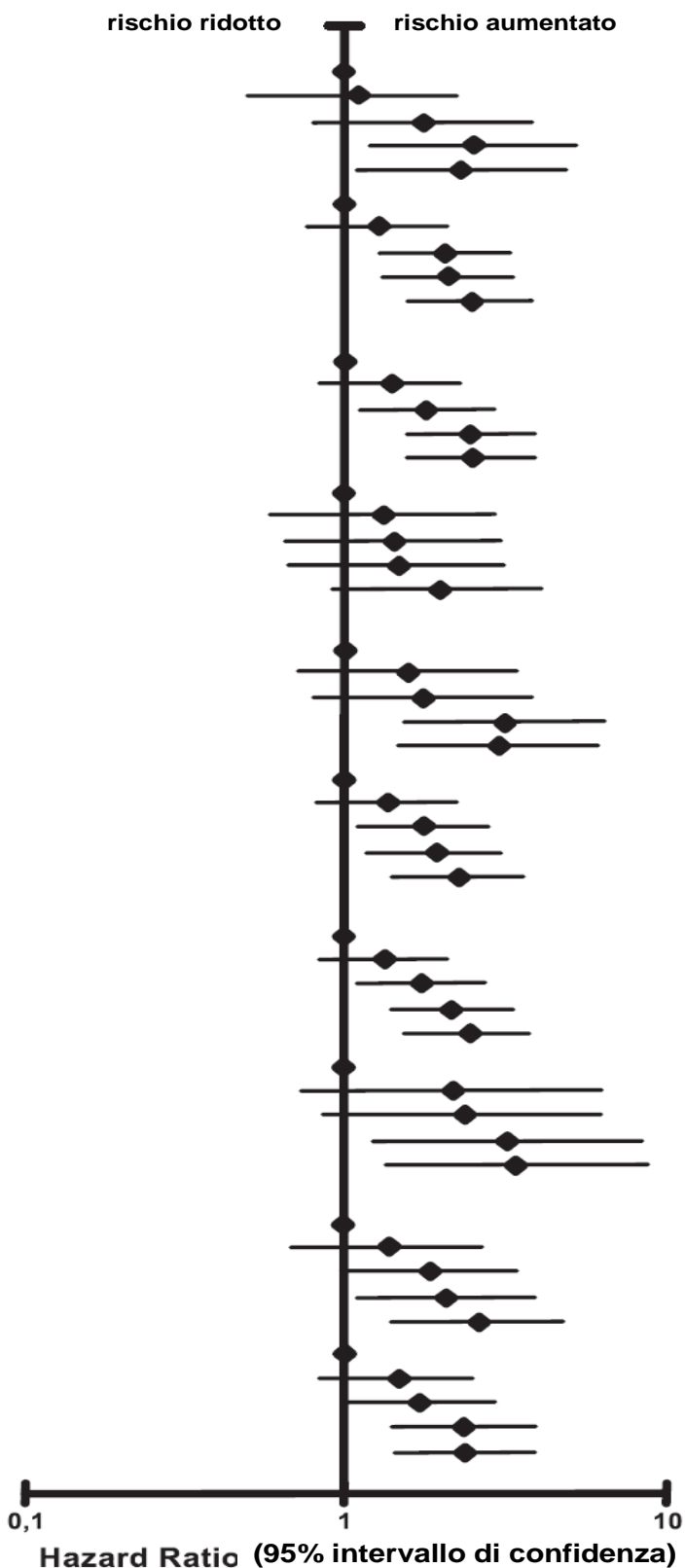


Figura 12: Hazard Ratio del rischio cardiovascolare (stroke, infarto miocardico e morte) in funzione dei livelli di hsPCR e di altri fattori di rischio (modificato da: Schlager, Stroke 2007).

Prevenzione e statine. Le statine si sono rivelate efficaci nella riduzione di eventi cardiovascolari in individui ipercolesterolemici. La loro azione farmacologica riduce i livelli di LDL ed aumenta quelli di HDL - fattori di rischio fondamentali nella patologia coronarica - riducendo l'incidenza e la mortalità per patologie cardiovascolari.

Il ruolo di questi farmaci nella prevenzione dello stroke è stata presa in considerazione solo negli ultimi anni. L'ipercolesterolemia ha un minor peso nel rischio di ictus rispetto ad altri fattori (es. ipertensione), tuttavia le statine si sono dimostrate efficaci nella riduzione dell'incidenza di stroke. Questi farmaci (atorvastatina in particolare) hanno determinato una riduzione del Rischio Relativo (RR) del 25-48% (e del Rischio Assoluto [RA] 0,7-1,3%) di eventi cerebrovascolari rispetto ai pazienti trattati con placebo. Sottogruppi di pazienti (negli studi prospettici ASCOT-LLA e CARDS) non dislipidemicici - diabetici e ipertesi - hanno avuto una riduzione di stroke del 48% in tre anni di follow-up rispetto ai controlli con placebo.^{127, 128}

Studi prospettici (Collins et al. studio prospettico su 20536 pazienti) hanno messo in evidenza anche in pazienti con stenosi carotidea il beneficio della terapia con statine, con una riduzione del 20% di incidenza di eventi vascolari maggiori: stroke, infarto miocardico e morte. La riduzione del rischio di soli eventi cerebrovascolari in pazienti con stenosi carotidea non si è rilevata statisticamente significativa (probabilmente perché la patologia aterosclerotica è già in una fase avanzata).¹²⁹

Il ruolo della statine nella prevenzione dello stroke va oltre la loro attività di riduzione della colesterolemia. Questi farmaci agiscono anche nella riduzione dello stato infiammatorio, il quale si correla maggiormente con eventi cerebrovascolari rispetto all'ipercolesterolemia. Le statine, con la diminuzione dello stato flogistico, si associano anche alla riduzione dei livelli ematici di PCR. L'effetto di questi farmaci nella riduzione della PCR è indipendente dall'attività sui livelli di LDL. Studi prospettici hanno dimostrato la riduzione del rischio cardiovascolare, in seguito a terapia con statine, in pazienti in cui si ha una riduzione combinata dei livelli di LDL (<70 mg/dl) e di PCR (<2 mg/l) rispetto ai pazienti in cui la terapia riduce solo i livelli di colesterolo. La riduzione delle concentrazioni di PCR rappresentano quindi un nuovo target terapeutico in grado di determinare un'ulteriore riduzione di eventi maggiori.¹³⁰

L'attività pleiotropica delle statine è un elemento fondamentale nella prevenzione dello stroke. Di seguito è riportato un elenco riassuntivo delle attività di questi farmaci nella prevenzione dell'ictus.¹²⁸

Riduzione della disfunzione endoteliale: - stimolazione per la sintesi di NO (ossido nitrico),
- diminuzione sintesi di endotelina 1,
- inibizione ossidazione LDL.

Riduzione della risposta infiammatoria: - riduzione del numero e dell'attività delle cellule infiammatorie,
- riduzione dei livelli di PCR.

Stabilizzazione placche aterosclerotiche: - riduzione delle concentrazioni sieriche di LDL,
- riduzione produzione di metalloproteinasi.

Riduzione della risposta trombotica: - inibizione dell'adesione a aggregazione delle piastrine,
- riduzione concentrazione di fibrinogeno,
- riduzione della viscosità emica.

L' "American Heart Association" e il "National Stroke Association" raccomandano la terapia con statine nella prevenzione dello stroke per i pazienti ipercolesterolemici o con patologie coronariche.¹²³

Queste linee guida non sono state aggiornate dalla pubblicazione dei risultati della terapia con statine in pazienti non dislipidemic. Sulla base di questi dati la terapia ottimale nella prevenzione dello stroke potrebbe includere l'uso delle statine in pazienti a rischio, come ipertesi o dislipidemic, indipendentemente dai livelli di colesterolo. Biomarkers sierici, come la PCR che è indipendente dalla colesterolemia, potrebbe essere utilizzata in associazione ai fattori di rischio standard per l'individuazione degli individui che potrebbero beneficiare di questa terapia.

4.2 PCR e progressione della stenosi carotidea

La presenza di una placca carotidea impone la sua periodica sorveglianza per valutare una possibile progressione della stenosi. La presenza di fattori di rischio che intercorrono nella formazione della placca rappresentano un possibile elemento di stimolo

nella progressione della lesione. In letteratura sono presenti pochi studi che prendono in esame l'argomento.

- Schlager et al. nello studio prospettico ICARS (Inflammation in Carotid Arteries Risk for Atherosclerosis Study)^{131, 132} hanno arruolato 1065 pazienti con stenosi carotidea asintomatica. In un follow-up ecografico medio di 7,5 mesi la progressione della stenosi - identificata come incremento di categoria tra "carotid plaque" (0-29%), "advanced plaque" (30-49%), "moderate stenosis" (50-69%), "high-grade stenosis" (70-90%), "subocclusive stenosis" (90-99%) e "occlusion" (100%) - si è presentata nell'8,7% dei pazienti. I fattori che si associano ad un incremento della stenosi carotidea sono:
 - L'età avanzata (>71 anni)
 - Il fumo
 - HbA1c % > 6,2
 - Arteropatia periferica
 - Storia di stroke
 - Grado di stenosi: elemento che si è rilevato maggiormente significativo con un rischio di progressione della stenosi del 14% per stenosi >50% rispetto al 5% per stenosi <50% (OR 4,7)
 - Stato infiammatorio (discusso più avanti)
- Muluk et al.¹³³ hanno arruolato 1004 pazienti con stenosi carotidea asintomatica in un periodo di follow-up ecografico medio di 28 mesi. La progressione della stenosi è stata indicata come incremento di una categoria – analogamente allo studio di Schlager – o il passaggio di una stenosi da <50% a >50%. È stata identificata una progressione della stenosi nel 9,3% pazienti/anno. I fattori che si associano ad un incremento della stenosi carotidea sono stati identificati in:
 - Grado di stenosi: stenosi >50% presentano un RR 3,34 di progressione
 - Stenosi carotide esterna: RR 1,51
 - Stenosi controlaterale >50%: RR 1,41
 - Pressione sistolica >160 mmHg: RR 1,37
- Garvey et al.¹³⁴ hanno arruolato 905 pazienti con stenosi carotidea asintomatica e prospettivamente valutati ecograficamente per un follow-up medio di 29 mesi. La progressione della stenosi è stata indicata analogamente allo studio di Muluk. La

progressione si è verificata nel 9,3% pazienti/anno. I fattori che i associano ad un incremento della stenosi carotidea sono stati identificati in:

- Et  avanzata
- Sesso maschile
- Pressione sistolica >160 mmHg
- Pressione differenziale
- Colesterolo totale
- Bassi livelli di HDL

I fattori che si associano in maniera indipendente alla progressione della stenosi sono i livelli di HDL la pressione differenziale.

I risultati di questi ampi studi confermano la progressione annua della stenosi in circa il 9% dei pazienti anche se non sono concordi nella valutazione dei possibili fattori in grado di influenzare la sua evoluzione.

PCR e progressione della stenosi. Lo stato infiammatorio rappresenta un elemento fondamentale nello sviluppo di lesioni aterosclerotiche. Questo   determinato dall'attivit  dei macrofagi all'interno della placca che causano un aumento del core necrotico-lipidico. Lo stato flogistico quindi permette la progressione della stenosi carotidea.²⁶

L'identificazione di markers dell'infiammazione che si associano all'incremento della stenosi costituisce l'obiettivo di ricerca di nuovi studi. La PCR, molecola che aumenta di concentrazione negli stati flogistici,   un marker molto sensibile dello stato infiammatorio.

Sono presenti in letteratura studi che correlano la progressione della stenosi ai livelli elevati di hsPCR. Nel gi  citato studio ICARS, livelli di hsPCR >5 mg/l rappresentano un fattore di rischio indipendente per la progressione di stenosi carotidea (associato alla Proteina Sierica A, un altro marker di flogosi). La presenza di livelli di PCR elevati determinano un OR 3,65 (IC 95%, 1,65 - 8,08) di progressione rapida - in un periodo di circa 7 mesi - della stenosi.¹³²

Questi dati confermano il ruolo della PCR come marker di rischio, potendo individuare cos  non solo "placche carotidee vulnerabili" ma "pazienti vulnerabili", con un rischio di progressione della patologia aterosclerotica multidistrettuale (coronarica e periferica). Il ruolo della PCR come elemento predittivo di incremento della stenosi   stato confermato anche in altri studi nei quali livelli elevati di PCR hanno un HR di 1,54 (IC 95%, 1,06 - 2,60) di progressione della stenosi rispetto ai pazienti con livelli bassi di PCR.^{135, 136}

Oggi il corretto management dei pazienti con stenosi carotidea - specie asintomatica - rappresenta un obiettivo fondamentale nella pratica clinica; l'importanza di nuovi elementi in grado di determinare una maggiore stratificazione del rischio sono quindi di grande utilità nella corretta gestione - chirurgica o meno - del paziente con stenosi carotidea.

Progressione, infiammazione e statine. Le statine sono farmaci che hanno un'azione non solo sui livelli di colesterolo ematico ma anche sullo stato flogistico. È stato dimostrato come questi farmaci siano in grado di ridurre lo stato flogistico, con una diminuzione significativa delle concentrazioni di hsPCR, indipendente dall'azione sulla colesterolemia.¹³⁷

L'azione delle statine nella progressione della stenosi carotidea è stato scarsamente studiato. In letteratura sono presenti pochi studi (Hegland et al.) che valutano le modificazioni ecografiche del grado di stenosi: essi hanno messo in evidenza che la terapia con statine – rispetto al placebo – determina una lieve riduzione della stenosi: diminuzione annua dell' 8% in pazienti con stenosi del 40-59%, del 3% in pazienti con stenosi del 60-79% e dell'1% per stenosi del 80-99%, comparati con il gruppo controllo che presenta un costante incremento annuo del 5%. Lo studio riportato, tuttavia, compie valutazioni ecografiche delle percentuali di stenosi in base a metodiche non validate e sono quindi suscettibili di interpretazioni di dubbia validità scientifica.^{138,139}

Lo studio ICARS, che non aveva come obiettivo la valutazione della terapia con statine nella progressione della placca, ha evidenziato nel gruppo di pazienti in cui la stenosi rimaneva stabile nel follow-up un maggiore utilizzo di statine con una tendenza alla significatività ($p=0,066$).¹⁴⁰

Studi che hanno utilizzato metodiche RM nella valutazione dell'evoluzione della placca, in pazienti in terapia con statine, hanno evidenziato che la stenosi non diminuisce né progredisce più lentamente nel follow-up (24 mesi), rispetto ai controlli, tuttavia si determina una riduzione del core necrotico-lipidico.^{141, 142}

L'attività delle statine nel ridurre il rischio cardiovascolare agendo anche sullo stato flogistico è un dato di fatto, tuttavia il ruolo di questi farmaci nell'evoluzione della placca carotidea non è ancora stato chiarito, sarebbero necessari ampi studi per metterne in luce la loro reale attività.

4.3 PCR e instabilità di placca carotidea

L'instabilità strutturale della placca carotidea è determinata principalmente dallo stato flogistico al suo interno. Il processo infiammatorio causa il richiamo di leucociti, macrofagi e linfociti T; queste cellule formano le LDL-ossidate, liberano MMP e secernano citochine proinfiammatorie. Di conseguenza si ha all'interno della placca un incremento del core, una riduzione del fibrous cap e un ulteriore accumulo di leucociti, predisponendola alla rottura e all'ulcerazione.¹⁴³

La PCR è un marker sistemico di infiammazione che si associa sia a un maggiore rischio di stroke sia alla progressione della placca carotidea (Cap. 2.1 e 2.2). In diversi studi è stata esaminata l'associazione tra i livelli ematici di PCR e l'analisi istologica della placca post-endoarterectomia.^{144, 145}

Concentrazioni maggiori di hsPCR sono state identificate in pazienti con placca instabile: 27,1 mg/l contro 4,1 mg/l nei pazienti con placca stabile. È stata individuata una correlazione lineare tra il maggiore infiltrato di macrofagi e linfociti ed i livelli sierici di PCR. Valori elevati di PCR (> 10 mg/l) sono associati a un OR 16 (IC 95% 3,9-51,9) di riscontro di placche carotidee instabili.¹⁴⁴

Studi condotti con metodiche RM hanno dimostrato che individui con alterazioni strutturali ed emorragia interna alla placca carotidea, presentano concentrazioni maggiori di PCR rispetto a pazienti con placca stabile.¹⁴⁵

La presenza di placche carotidee sintomatiche è un ulteriore elemento di identificazione di lesioni instabili. In numerosi studi è stata valutata la possibile associazione tra la presenza di placca sintomatica e concentrazioni di PCR.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶

Nei pazienti sintomatici è stata riscontrata una concentrazione significativamente maggiore di PCR rispetto ai controlli asintomatici, questi hanno presentato sempre valori di PCR sotto 10mg/l. I livelli medi di PCR nei pazienti che hanno presentato uno stroke sono stati di 41,2 mg/l mentre nei pazienti che hanno presentato un TIA sono stati di 24,7 mg/l senza una differenza significativa tra i due gruppi. I prelievi ematici per la valutazione della PCR sono stati effettuati mediamente 6 settimane dopo l'evento cerebrale. La non associazione tra PCR e intensità dei sintomi ed il tempo intercorso prima del prelievo ematico sono elementi contro l'ipotesi che l'incremento PCR sia stato determinato dal danno ischemico cerebrale.¹⁴⁴

Il ruolo della PCR come marker di flogosi nella lesione aterosclerotica carotidea è chiaro, studi simili sono stati eseguiti anche per la patologia coronarica mettendo in evidenza gli stessi risultati. La PCR rappresenta quindi un marker/agente di “instabilità aterosclerotica” in grado di individuare *pazienti instabili* con necessità di intervento. Lo stato di instabilità della lesione e lo stato flogistico incrementato possono rappresentare elementi di maggiore rischio nelle procedure di rivascolarizzazione. Nel trattamento endovascolare delle stenosi coronariche è stato messo in evidenza che i pazienti con livelli maggiori di PCR sono più a rischio di sviluppare eventi cardioischemici e ristenosi della lesione trattata nel follow-up.¹⁴⁷

L’associazione tra i livelli di PCR e l’outcome nelle procedure di rivascolarizzazione carotidea (Stenting carotideo [CAS] o endoarterectomia [CEA]) è stato scarsamente studiato.

PCR e CAS. La procedura di stenting carotideo prevede il posizionamento di uno stent a livello della placca per eliminare la stenosi “shiacciando” a parete la lesione aterosclerotica. Questa è una procedura che può determinare embolizzazioni cerebrali. Negli ultimi anni sono entrati nella pratica clinica filtri di protezione cerebrale in grado di bloccare buona parte degli emboli, riducendo in parte il rischio cerebrale legato a questa procedura. La struttura della placca rappresenta un elemento in grado di influenzare l’esito dell’intervento. Stenosi serrate, ulcerazioni, trombi su placca sono caratteristiche che si associano a maggiori eventi cerebrali. La struttura interna della placca può essere un fattore di rischio: lesioni con un core lipidico abbondante possono determinare embolizzazioni per una loro maggiore fragilità. A conferma di ciò, stenosi ecograficamente ipoecogene - GSM < 25, per l’abbondante componente lipidica/emorragica – si associano a maggiori complicanze neurologiche post CAS.^{148, 149}

La PCR è associata a lesioni ricche in componente flogistica - quindi instabili – che possono determinare maggiori embolizzazioni durante il CAS. Nei pochi studi sull’argomento si è messo in evidenza che livelli di hsPCR elevati (>5 mg/l) sono associati in maniera indipendente a maggiori complicanze (stroke e morte), con OR 7,7 (IC 95% 1,8-32,8).¹⁵⁰

In letteratura sono presenti pochi dati sulla PCR e la ristesosi post CAS: concentrazioni >5 mg/l sono state associate a proliferazione neointimale intra-stent ma non si è dimostrata in maniera indipendente associata a sviluppo di ristesosi.^{151, 152}

PCR e CEA. La presenza di una placca instabile non rappresenta un fattore di rischio legato all’intervento di endoarterectomia. L’associazione tra i livelli di hsPCR e

possibili eventi maggiori post CEA non si è dimostrata significativa; tuttavia alcuni studi che hanno fatto uso della RM a diffusione - per l'identificazione di lesioni ischemiche acute anche asintomatiche - hanno evidenziato che maggiori livelli di hsPCR (>5 mg/l) si associano a più lesioni ischemiche post CEA, quindi microembolizzazioni periprocedurali. Questa correlazione però non si è dimostrata significativa per la sintomaticità delle lesioni.¹⁵³

5. NEOANGIOGENESI NELLA PLACCA CAROTIDEA

5.1 Microvascolarizzazione della placca carotidea

La vascolarizzazione della placca aterosclerotica è un elemento fondamentale nello sviluppo e progressione della lesione. I vasi permettono un maggiore richiamo di cellule dell'infiammazione e l'ulteriore deposito di colesterolo. I nuovi vasi spesso non sono completamente formati e possono facilmente causare una perdita ematica all'interno del core della placca. Questo fenomeno determina una maggiore attivazione dei macrofagi, un incremento del core della placca - e quindi della stenosi - e la possibilità della rottura del cap fibroso.^{66, 67}

Strutturalmente è stata identificata anche nelle placche carotidiche la stretta relazione tra vascolarizzazione, presenza di core necrotico e ulcerazione di superficie.

La presenza di vasi neoformati all'interno della placca carotidea è stato dimostrato essere più comune nei pazienti sintomatici rispetto agli asintomatici. La concentrazione media di microvasi è superiore in placche sintomatiche e la localizzazione dei vasi è maggiore medialmente e lateralmente rispetto al core. È stata riscontrata una stretta associazione tra la presenza di vasi a livello del fibrous cap e sintomi neurologici, poiché probabilmente fenomeni emorragici in questa sede determinano direttamente la rottura del cappuccio fibroso. Anche la struttura dei vasi si è dimostrata essere correlata con la presenza di sintomi neurologici. Neovasi di dimensioni maggiori - area luminare trasversale media di 0,1 mm - sono tipici in pazienti sintomatici. Vasi a struttura irregolare - bilobati o non circolari - si associano a placche sintomatiche mentre strutture vascolari regolari e ben definite si presentano maggiormente in quelle asintomatiche.^{154, 155}

La presenza di microvascolarizzazione nella placca carotidea è stata direttamente correlata con lesioni cerebrali rilevate alla TC, spesso lesioni asintomatiche, supportando l'ipotesi di maggiore instabilità della lesione aterosclerotica per la presenza di neovasi.¹⁵⁶

La presenza di vasi nella placca può essere un elemento dinamico. Una maggiore concentrazione di vasi è stata riscontrata nelle placche recentemente sintomatiche rispetto a placche sintomatiche le cui manifestazioni si sono presentate oltre tre mesi prima dell'analisi istologica. Questi dati supportano la possibilità che all'interno della lesione aterosclerotica possano verificarsi fenomeni riparativi. Il rischio di eventi neurologici dopo

un TIA - espresso già nei trials NASCET ed ECST - tende a diminuire in maniera considerevole dopo i primi 2 anni, ciò è da ritenersi legato a fenomeni di riparazione interna alla placca, con la riduzione della componente vascolare.¹⁵⁷

La presenza di neovascolarizzazione nella placca carotidea determina instabilità e quindi maggiore rischio di sviluppo di eventi neurologici. La possibilità di identificare lesioni ricche in componente vascolare rappresenta un elemento aggiuntivo di valutazione del rischio del paziente. VEGF è il fattore di crescita principalmente coinvolto nello stimolo angiogenetico, questo agisce all'interno della placca ma può essere identificato anche a livello ematico, rappresentando un possibile futuro marker di rischio. Anche metodiche strumentali, come CEUS, possono permettere di identificare lesioni aterosclerotiche con maggiore componente vascolare, individuando in maniera rapida lesioni particolarmente a rischio.

5.2 VEGF marker di vascolarizzazione della placca carotidea

La presenza di microvascolarizzazione all'interno della placca carotidea è un elemento che determina instabilità. Lo stimolo angiogenetico è dato dalla liberazione di VEGF, questa molecola stimola le cellule endoteliali alla duplicazione con formazione di nuovi vasi. Le strutture così formate inizialmente sono costituite solamente da elementi endoteliali - senza una componente muscolare o di matrice in grado di dare stabilità strutturale - e si localizzano sia nella "spalla" della placca sia sotto il fibrous cap. Il VEGF è una delle molecole chiave nello stimolo angiogenetico: la sua azione sul recettore VEGFR2 causa la proliferazione vascolare, mentre su VEGFR1 determina un maggiore stimolo infiammatorio. L'attività del VEGF nello sviluppo della "placca instabile" è quindi di grande importanza.¹⁵⁸⁻¹⁶⁰

La presenza di questa molecola all'interno della placca carotidea si correla con la presenza di componente vascolare neoformata, di cellule muscolari lisce e di cellule dell'infiammazione. È stata dimostrata la correlazione tra la presenza di VEGF nella placca e alterazioni strutturali (rottura del fibrous cap), maggiore positività a CD34 (marker endoteliale) e espressione di VEGFR1 nelle cellule presenti.¹⁶¹

La valutazione dei livelli ematici di VEGF può essere uno strumento utile per poter identificare lesioni aterosclerotiche ricche in microvasi e quindi più instabili.

La concentrazione sierica di VEGF è stata correlata con il grado di stenosi carotidea; livelli maggiori sono stati individuati anche in soggetti recentemente sintomatici per episodi ateroembolici cerebrali. Sono stati condotti pochi studi sulla valutazione di questa molecola come possibile marker di instabilità di placca. Le concentrazioni di VEGF si sono dimostrate essere inversamente correlate con la struttura ecografica della placca. Lesioni aterosclerotiche ipoecogene - con livelli di GSM minori - si associano a maggiori concentrazioni sieriche di VEGF. Non sono presenti studi sulla valutazione delle concentrazioni di VEGF e al presenza a livello di lesioni aterosclerotiche di maggiore o minore componente vascolare.¹⁶²

La stratificazione del rischio è di grande importanza, nel trattamento delle stenosi carotidee, per poter indirizzare il paziente verso il trattamento più adeguato nei tempi opportuni. La possibilità di identificare condizioni di rischio aggiunto sono quindi l'obiettivo di nuovi studi su markers sierici e su nuove metodiche strumentali di diagnostica per immagini.

5.3 CEUS nuovo metodo nella valutazione della vascolarizzazione intraplacca

Il ruolo della neoangiogenesi all'interno della lesione aterosclerotica è ormai chiaro tuttavia non sono ancora presenti nella pratica clinica, metodiche in grado di individuare la presenza di vascolarizzazione nella placca carotidea. Metodiche di RM ad alta definizione e con mezzo di contrasto, hanno permesso di identificare vasi all'interno della placca. La RM tuttavia determina una sovrastima della presenza di vasi nella lesione - confrontata con l'analisi istologica – in più non è applicabile nella pratica clinica sia per la scarsa reperibilità sia per i costi di questa tecnica.

La metodica di ecografia con l'uso di microbolle come mezzo di contrasto (Contrast Enhanced UltraSound: CEUS) è in grado di identificare chiaramente la presenza di vasi; oggi questa tecnica è ampiamente utilizzata nella valutazione della vascolarizzazione dei tumori epatici. La CEUS solo negli ultimi anni è stata usata nell'analisi della placca carotidea. Questa metodica si è rivelata importante nella valutazione della superficie della placca: il

mezzo di contrasto, all'interno del lume carotideo, permette una chiara individuazione di alterazioni di superficie - ulcerazioni ed irregolarità - specie in placche fortemente ipoecogene o calcifici.¹⁶³ (Fig.13).

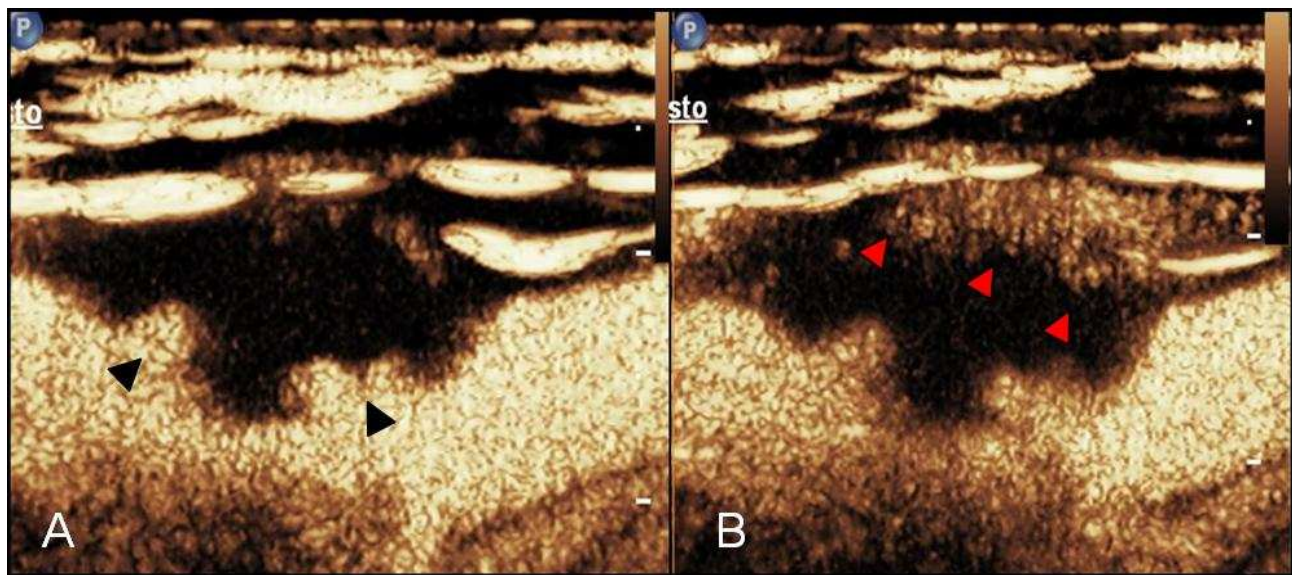


Figura 13: Contrast Enhanced Ultrasound a livello della placca carotidea. A) Identificazione di ulcere sulla superficie della placca (freccie). B) Identificazione della vascolarizzazione all'interno della placca per presenza di microbolle al suo interno (freccie), la vascolarizzazione è visibile alcuni secondi dopo la presenza delle microbolle nel flusso carotideo (confronto A e B).

La CEUS è stata applicata anche nell'analisi della presenza di vasi all'interno della placca. Studi clinici hanno messo in evidenza che in lesioni carotidee si ha una maggiore presenza di contrasto rispetto al semplice ispessimento miointimale. La carotide presenta normalmente vasa vasorum ma la placca stimola una maggiore proliferazione vascolare sia nell'avventizia sia all'interno della placca. E' stata identificata una correlazione lineare tra lo spessore della placca e la presenza di vascolarizzazione individuata alla CEUS. Maggiore enhancement è stato riscontrato in placche ecograficamente ipoecogene, mentre lesioni calcifiche e iperecogene hanno presentato una minore vascolarizzazione.^{164, 165}

La CEUS è in grado di identificare la presenza di vascolarizzazione interna alla placca carotidea. Studi di comparazione tra la valutazione CEUS e l'analisi istologica della placca (con marcatori CD34 e CD31 per le cellule endoteliali) lo hanno confermato. Placche carotidee nelle quali sono state identificate istologicamente una maggiore concentrazione di vasi ($3,24/\text{mm}^2$) hanno presentato anche un maggiore enhancement alla CEUS rispetto alle lesioni con minor concentrazione vascolare ($1,82/\text{mm}^2$). È stata riscontrata una correlazione lineare tra il livello di vascolarizzazione interna alla placca ed il grado di

enhancement rilevato con la CEUS. La CEUS si è dimostrata in grado di identificare le placche maggiormente instabili individuando facilmente sia le alterazioni di superficie sia la maggiore vascolarizzazione della placca.¹⁶⁶

Ultimi studi hanno analizzato in presenza placche sintomatiche il livello di vascolarizzazione alla CEUS. Le placche carotidee sintomatiche, con manifestazioni neurologiche recenti (<1 settimana), hanno dimostrato maggiore localizzazione di microbolle - alla CEUS - alla base della placca e a livello del cappuccio fibroso. Le lesioni asintomatiche invece hanno presentato un minor enhancement al loro interno. I dati ricavati dalla valutazione CEUS si sono dimostrati correlati con l'analisi istologica per la presenza di vasi e con la valutazione GSM per l'identificazione delle placche più a rischio.¹⁶⁷

La valutazione della vascolarizzazione alla CEUS è stata eseguita, in questi primi studi, sul giudizio soggettivo dell'operatore è quindi passibile di variazioni individuali. Esistono software in grado di elaborare un valore numerico - quindi oggettivo - del grado di enhancement (espresso in dB) all'interno della placca. È stata identificata una differenza significativa di dB-enhancement tra placche sintomatiche e placche asintomatiche (rispettivamente $13,9 \pm 6,4$ contro $8,8 \pm 5,2$ dB). La sensibilità e specificità del riscontro di una placca sintomatica con dB-enhancement maggiore di 10 è del 74% e del 62%. La valutazione del rapporto tra dB-enhancement all'interno della placca e nel lume del vaso si è dimostrata migliore, con una sensibilità del 74% e una specificità del 75%.¹⁶⁸

La CEUS rappresenta uno strumento aggiuntivo nella valutazione complessiva del rischio del paziente. Questa possibilità determinerebbe un migliore approccio terapeutico - medico o chirurgico - per una migliore prevenzione dello stroke basata sulle caratteristiche del paziente.

Si stanno svolgendo numerosi studi scientifici per identificare fattori associati alla presenza di placca carotidea instabile. Presso l'U.O. di Chirurgia Vascolare Prof. A. Stella dell'università di Bologna "Alma Mater Studiorum" sono in atto più studi su quest'ambito: valutando l'associazione tra i livelli di hsPCR e la possibile embolizzazione durante stenting carotideo e analizzando il ruolo della CEUS nell'identificare le placche definite instabili alla valutazione istologica. Nel prossimo capitolo sono riportati questi studi ed i loro risultati.

6. STUDI SULL'INSTABILITA' DELLA PLACCA CAROTIDEA

presso l'Università degli Studi di Bologna "Alma Mater Studiorum"

U.O. Chirurgia Vascolare Prof. A.Stella

6.1 I livelli di hsPCR possono predire il grado di embolizzazione durante lo stenting carotideo

OBIETTIVO

Valutazione quantitativa e qualitativa del materiale embolico - indice di embolizzazione di placca - nei filtri di protezione cerebrale utilizzati nelle procedure di Stenting Carotideo (CAS), in relazione ai livelli di hsPCR .

MATERIALI E METODI

Pazienti

Nel periodo tra Giugno e Dicembre 2009 una serie di pazienti consecutivi con stenosi carotidea $\geq 70\%$ (NAS CET)¹⁸ sono stati sottoposti a CAS, secondo le raccomandazioni della Society of Vascular Surgery¹⁶⁹. Dati demografici, sintomi (amaurosis fugax, attacchi ischemici transitori, minor e major stroke), fattori di rischio cardiovascolare (ipertensione, cardiopatia ischemica, bronco pneumopatia cronica ostruttiva, dislipidemia, diabete mellito, fumo, insufficienza renale cronica) e terapia (ASA, terapia anticoagulante orale, utilizzo di statine) sono stati raccolti per ciascun paziente e immessi in un database. Tutti i pazienti hanno dato il proprio consenso per lo studio prima della procedura di CAS.

Analisi della struttura della placca carotidea

Il grado di stenosi e la struttura della placca sono state valutate mediante Eco-Color-Doppler (Philips IU 22). Le immagini sono state salvate per la successiva analisi da parte di un operatore. Le placche sono state suddivise in Omogenee e Disomogenee in funzione del valore rilevato all'analisi del *Gray Scale Measurement* (GSM).²⁴ La valutazione del GSM è stata eseguita mediante l'utilizzo del free-software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), le immagini sono state importate ed analizzate mediante la funzione Histogram che fornisce la valutazione della media dei grigi dei pixel della regione di interesse. Le placche sono state

definite disomogenee se con GSM<50.²⁴ Sono state definite come disomogenee anche placche con la presenza di ulcere, definite come recessi sulla superficie della placca di almeno 2mm di lunghezza e 2 mm di profondità.

Misurazione dei livelli di hsPCR circolanti

I campioni di sangue raccolti mediante prelievo 24h prima della procedura di CAS, sono stati centrifugati a 1800 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente. Le concentrazioni di hsPCR sono state analizzate mediante valutazione nefelometrica (Image, Beckman Instrument). I pazienti sono stati suddivisi in due gruppi: GI con livelli di hsPCR< 5mg/l e GII con livelli di hsPCR>5 mg/l.

Procedura di CAS

I pazienti sono stati portati in sala angiografica dopo apposito consenso informato, valutazione cardiologia, ed il trattamento con doppia antiaggregazione (aspirina 100 mg/die e clopidogrel 75 mg/die iniziata tre giorni prima della procedura). Tutti i trattamenti sono stati eseguiti in anestesia locale inguinale ed eparinizzazione sistemica. È stato utilizzato di un introduttore da 8 F e la cannulazione carotidea comune mediante catetere 40° (I e II Boston Scientific® o Medtronic® HS) sopra ad una guida (Terumo®). Nelle condizioni in cui la precedente manovra non è stata sufficiente per l'incannulazione carotidea sono stati intraprese differenti tecniche alternative (buddy wire o coaxiale). Non sono stati eseguiti accessi carotideo o brachiale. Il filtro di protezione cerebrale utilizzato è il Filterwire EZ (Boston Scientific®) mentre lo stent utilizzato è a celle chiuse (Wallstent, Boston Scientific®).

Analisi dei filtri alla microscopia ottica

Al termine della procedura di CAS i filtri sono stati recuperati, lavati con soluzione fisiologica e fissati in formalina (10% neutral, pH6.9). Sono state effettuate fotografie allo stereomicroscopio del filtro nella sua interezza. Dopo la rimozione della componente metallica di sostegno i filtri sono stati tagliati in due sezioni uguali. Il primo pezzo è stato montato su di un vetrino utilizzando Canada Balsam (Sigma-Aldrich C1795) ed il secondo fissato mantenuto in formalina per la successiva valutazione alla microscopia elettronica. La valutazione morfometrica è stata eseguita al microscopio ottico (Leitz Wetzlak, Germany 12 V max, 100W) connesso con una camera CCD Olympus CX42. Le immagini sono state salvate utilizzando Image-Pro Plus software (Media Cybernetics) processate con ImageJ

free software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Il livello di membrana occupata da materiale embolico è stata espressa come % di superficie occupata (%SI). Tutte le immagini sono state convertite in stack, trasformate in montage, convertite da immagini a colori a immagini in bianco e nero da 8 bit e la scala di grigi è stata settata. E' stato delineato il confine dei filtri ed è stata calcolata l'area totale per ogni stack, dopo avere settato i valori più alti e più bassi è stata ricavata l'area di superficie coinvolta. Il numero di pori occlusi (PO) da materiale embolico ed il numero totale i pori non occlusi è stato quantificato e considerato in percentuale. Per l'analisi istologica dei materiali embolici la punta dei filtri è stata tagliata, deidratata e messa in paraffina per 1h. La sezione (2,5 µm) è stata analizzata in ematossilina-eosina.

Analisi dei filtri mediante microscopia a scansione elettronica

La microscopia a scansione elettronica (SEM) è stata effettuata per analizzare le dimensioni ed il tipo di elementi embolici aderenti al filtro nella sua superficie interna.

I filtri sono stati inclusi nella carta da filtro per SEM, lavati con soluzione fosfato 0,15 M e fissati in osmium tetroxide all'1% per 15 min a temperatura ambiente. Successivamente i filtri sono stati lavati per 15 min in acqua distillata, deidratati con passaggi successivi in etanolo (70%, 95%, 100% per 15 min ad ogni passaggio) ed asciugati con hexamethyldisilazene (HMDS, Fluka, Steinheim, Germany) per 30 min a temperatura ambiente. I filtri asciugati sono stati montati su strutture in alluminio (Multilab Type stub pin 1/2", Surrey, UK) rivestite di uno strato di 10 nm di spessore di oro-platino in un elemento Balzers MED 010 (Balzer Union FL 9496 Furstentum, Liechtenstein). Successivamente gli elementi sono stati osservati utilizzando in microscopio elettronico a scansione (Philips 505 Scanning Electron Microscope at 15 kV). Le immagini sono state processate con ImageJ. Le dimensioni delle particelle sono state analizzate e misurate in lunghezza dell'asse maggiore e dell'asse minore.

Analisi statistica

Variabili quantitative sono state espresse come media e deviazione standard (SD), variabili qualitative come frequenze assolute e relative. L'analisi della differenza tra le medie di GI e GII è stata eseguita mediante il test T di Student, mentre la valutazione delle frequenze di variabili nominali mediante il test di Fisher. Il test one-way ANOVA è stato utilizzato per valutare possibili differenze tra le medie di %SI e PO tra più di due gruppi. L'analisi statistica

è stata eseguita mediante l'utilizzo del software SPSS® 13.0 for Windows® (SPSS, Chicago, Illinois, USA). La significatività statistica è stata posta per $P < 0,05$.

RISULTATI

Pazienti

Sono stati inclusi nello studio 14 pazienti. La concentrazione media di hsPCR è stata di $11,5 \pm 18,4$ mg/l (range 0,21- 67,8 mg/l), 8 pazienti sono rientrati in GI con hsPCR di $1,9 \pm 1,4$ mg/l, 6 pazienti in GII con hsCRP $24,2 \pm 23,3$ mg/l. Nessuna differenza significativa è stata riscontrata nei dati demografici, sintomi, fattori di rischio cardiovascolare e terapia in atto (Tab. 2). Placche disomogenee sono state identificate in 6 (42%) pazienti, 1 (12%) in GI e 5 (83%) in GII ($p < 0.005$). Il successo tecnico è stato raggiunto per tutte le procedure senza lo sviluppo di complicanze cliniche in entrambi i gruppi.

Tabella 2: caratteristiche generali della popolazione esaminata.

Caratteristiche*	GI % (n)	GII % (n)	p value
Età, anni	77,0 \pm 5,3	72,3 \pm 11,3	ns
Maschi	62 (5)	100 (6)	ns
Fattori di rischio vascolari			
Ipertensione	100 (8)	100 (6)	ns
Cardiopatìa ischemica	75 (6)	66 (4)	ns
Broncopneumopatia cronica ostruttiva	12 (1)	66 (4)	ns
Dislipidemia	62 (5)	50 (3)	ns
Fumo	12 (1)	0 (0)	ns
Insufficienza renale cronica (GFR <60 ml/min)	12 (1)	50 (3)	ns
Sintomi			
Amaurosis fugax	12 (1)	0 (0)	ns
Attacco ischemico transitorio	37 (3)	33 (2)	ns
Minor e major stroke	25 (2)	33 (2)	ns
Terapia			
ASA	87 (7)	100 (8)	ns
TAO	0 (0)	0 (0)	ns
Statine	50 (4)	33 (2)	ns

**Variabili continue sono espresse come media e deviazione standard, ns: non significativo, GFR: glomerular filtration rate, ASA: Acido acetilsalicilico, TAO: terapia anticoagulante orale*

Analisi dei filtri al microscopio ottico

L'osservazione microscopica dei filtri ha dimostrato la presenza di materiale embolizzato (Foto 1). Due filtri hanno presentato chiari depositi lipidici apicali (Foto 2 e 3). Materiale embolizzato è stato riscontrato in tutti i filtri: %SI $28,8\% \pm 8,1$ e PO $27,3\% \pm 9,5$. GII ha presentato maggiore PO e un trend verso un maggiore %SI rispetto a GI ($35,7\% \pm 11,7$ contro $23,9\% \pm 6,7$ $p=0,049$ e $33,3\% \pm 7,7$ contro $25,4\% \pm 7,0$ $p=0,07$ rispettivamente). (Fig.14)

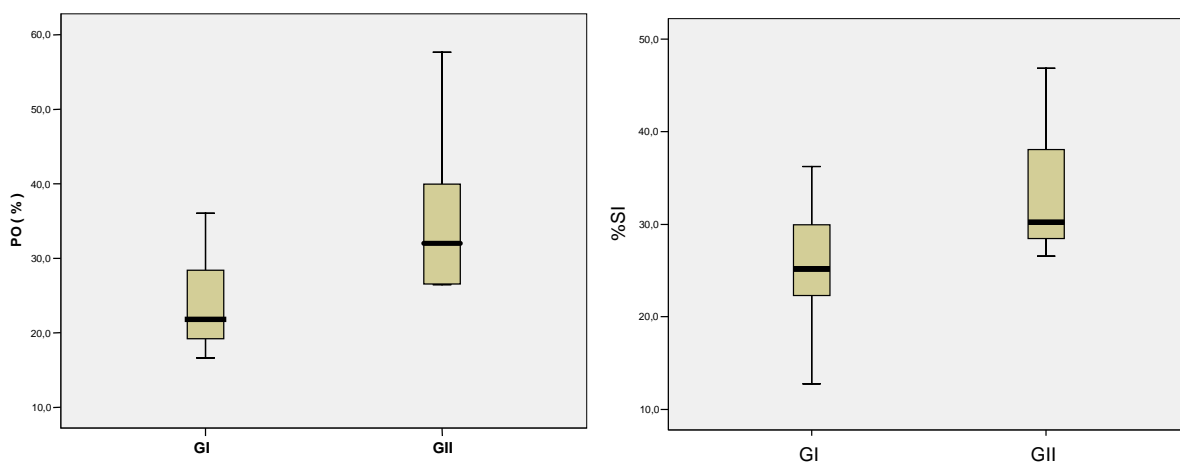


Figura 14: differenza tra GI e GII in PO e %SI.

In funzione del tipo di placca, i pazienti con placca disomogenea (n. 6) hanno presentato una %SI significativamente maggiore rispetto a coloro con placca omogenea (n. 8), ($33,9 \pm 7,1$ contro $23,7 \pm 5,6$ rispettivamente, $p=0,01$), ed un trend verso un maggiore PO ($34,2 \pm 11,8$ contro $23,8 \pm 6,7$ $p=0,07$). I pazienti in GII con placca disomogenea hanno presentato un PO e %SI significativamente maggiore rispetto ai pazienti in GI con placca omogenea (%SI: $40,4 \pm 12,0$ contro $19,7 \pm 2,8$ $p=0,04$ e PO: $35,7 \pm 8,7$ contro $20,2 \pm 5,1$ $p=0,04$). (Fig.15)

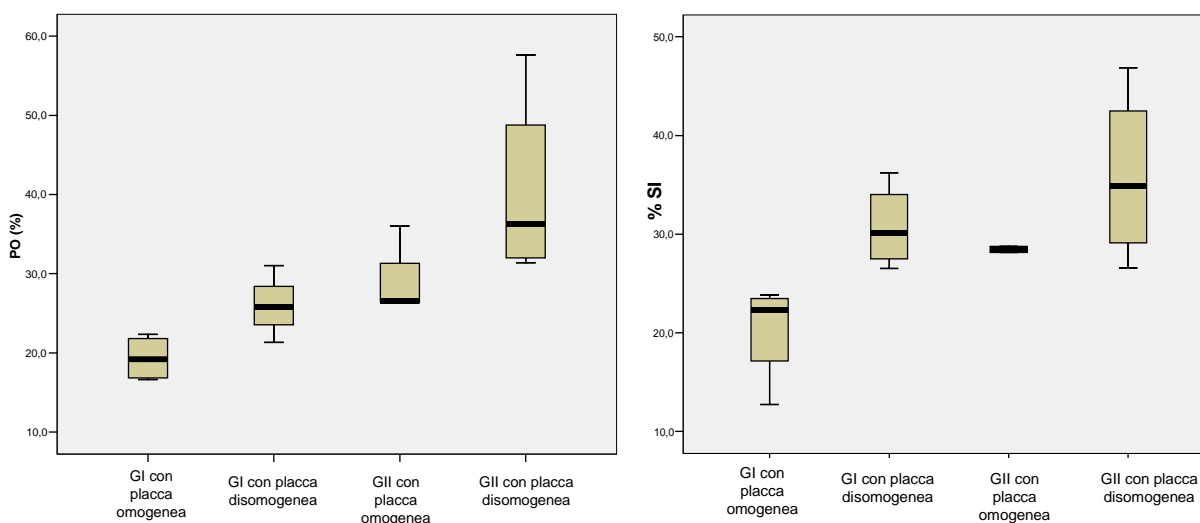


Figura 15: differenze in PO e in %SI tra i vari gruppi di pazienti.

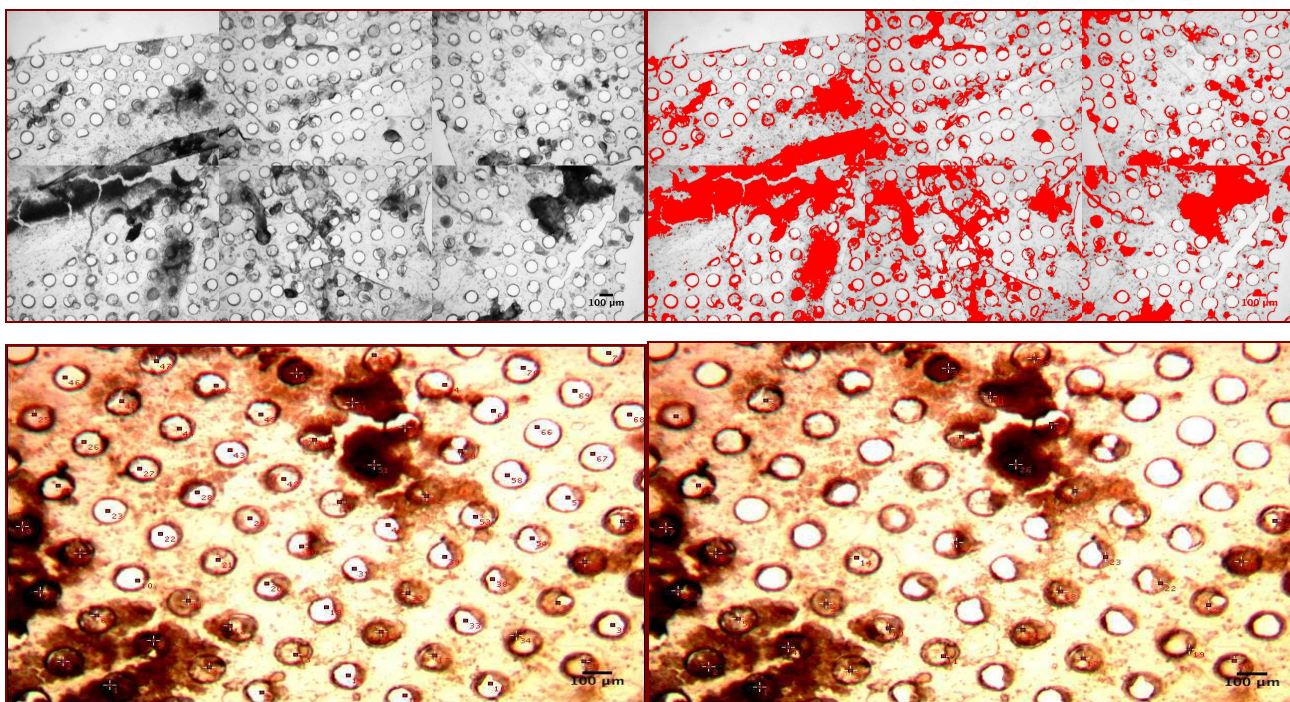


Foto 1: metodica di valutazione della %SI e PO attraverso il software ImageJ

Analisi dei filtri alla microscopia a scansione elettronica

Per chiarire ulteriormente la composizione e le dimensioni medie del materiale aderente alla superficie interna del filtro è stata eseguita l'analisi SEM. Tutta l'area dei filtri era coperta da elementi di dimensione variabile tra 30 e 2000 µm (Tab.3). La distribuzione del materiale era eterogenea nella superficie dei filtri con un maggiore %SI a livello del punto apicale del filtro. Tutti i filtri si sono presentati ricoperti da uno strato di biofilm tipico dei biomateriali. I pori si sono presentati occlusi da aggregati di globuli rossi, materiale embolico e frammenti di placca. La SEM ha permesso di individuare aggregati di piastrine attivate. La valutazione all'ematossilina-eosina ha confermato la presenza a livello del punto distale del filtro di elementi di placca e materiale trombotico (Foto 4). non è stata riscontrata nessuna differenza in volume e composizione degli elementi embolici tra GI e GII e tra i pazienti con placca omogenea o disomogenea.

Tabella 3: analisi morfometrica mediante SEM del materiale riscontrato a livello dei filtri.

Materiale	Dimensioni medie AM µ	± DS
Emboli	161	128
Biofilm	713	398
Materiale tromboembolico	876	689
Frammenti di placca	1419	650

AM: asse maggiore, DS: deviazione standard

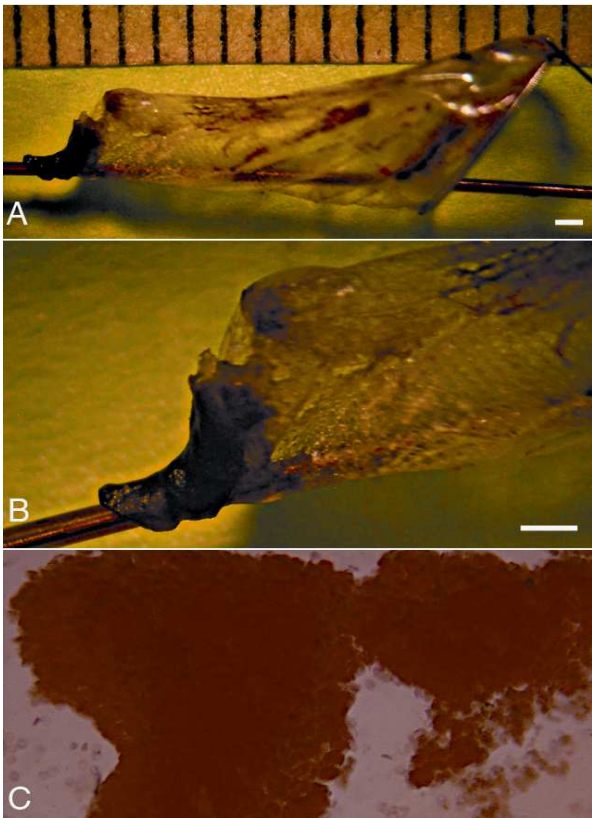


Foto 2: A) materiale embolico all'apice del filtro B) ingrandimento, scala 1 mm, C) valutazione al microscopio ottico.

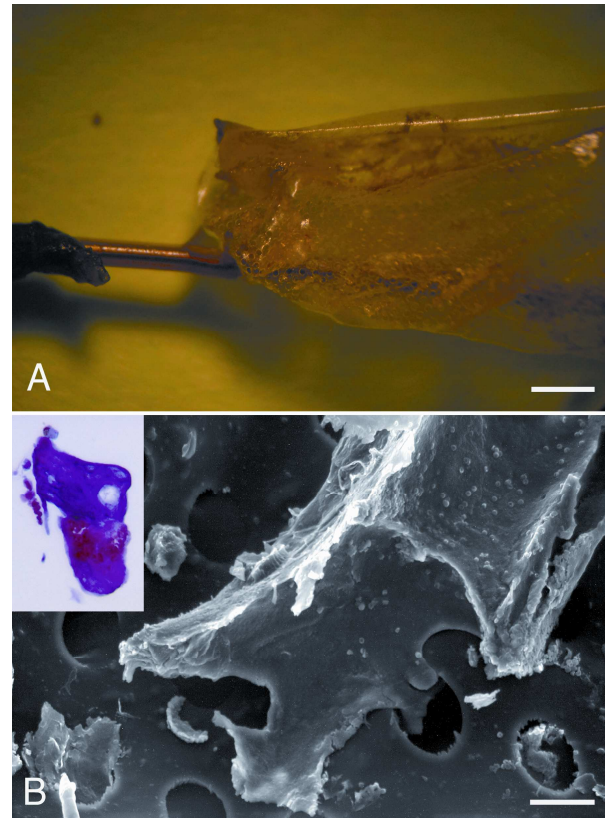


Foto 3: A) materiale embolico all'apice del filtro, scala 1mm B) valutazione mediante SEM, scala 100µm.

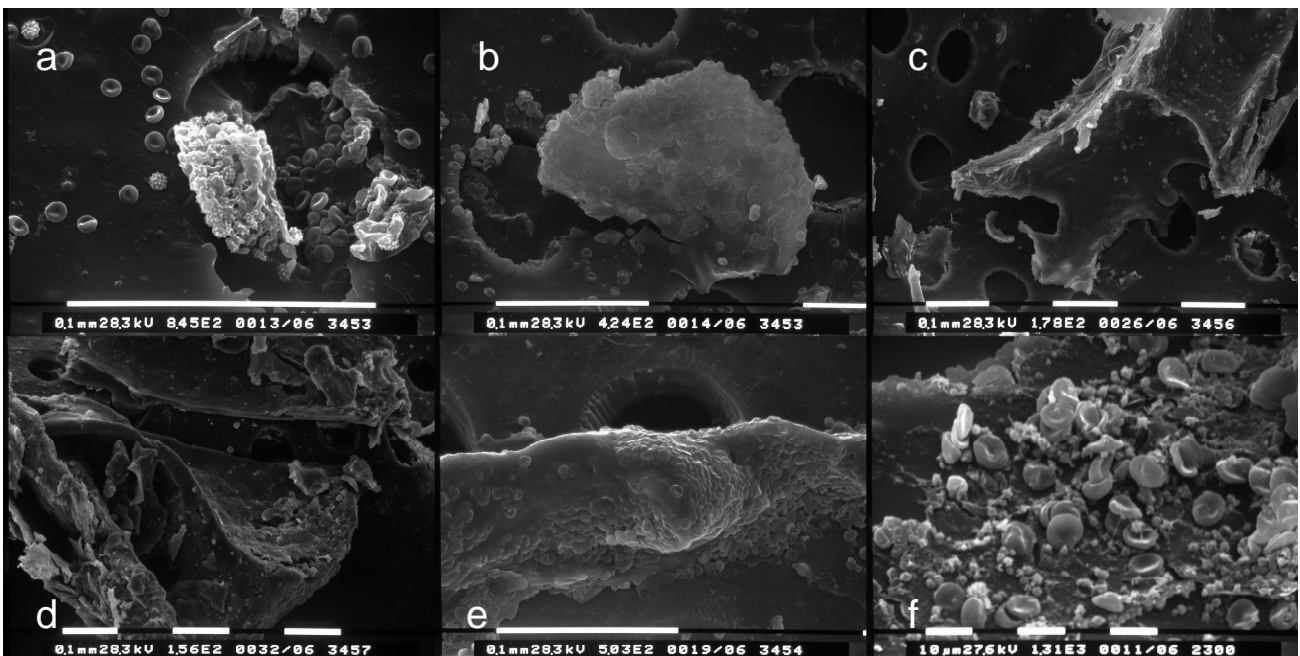


Foto 4: dettagli di elementi riscontrati a livello del filtro di protezione cerebrale attraverso la SEM. a) trombo di globuli rossi piastrine e acantociti, b) trombo, c) materiale tromboembolico, d) frammenti di placca, e) piastrine attivate, f) diversi elementi cellulari: globuli rossi, acantociti e piastrine.

6.2 Identificazione della placca carotidea vulnerabile attraverso l'uso dell'ecografia con mezzo di contrasto

OBIETTIVO

Valutazione del possibile utilizzo dell'ecografia con mezzo di contrasto (contrast enhanced ultrasonography: CEUS) nell'individuazione di placche carotidee vulnerabili analizzandone le caratteristiche istologiche.

MATERIALI E METODI

Pazienti

Nel periodo tra Settembre 2009 e Gennaio 2010 una serie di pazienti consecutivi sia sintomatici che asintomatici con stenosi carotidea $\geq 70\%$ sono stati sottoposti ad endoarterectomia secondo le raccomandazioni della Society of Vascular Surgery.¹⁶⁹ I dati demografici, i sintomi (amaurosis fugax, Transient Ischemic Attack, minor e major Stroke), i fattori di rischio cardiovascolare (ipertensione, cardiopatia ischemica, broncopneumopatia cronica ostruttiva, dislipidemia, diabete mellito, fumo e insufficienza renale cronica), la terapia medica in atto (statine) sono stati raccolti e immessi in un database. Prima dell'intervento chirurgico è stata eseguita una valutazione mediante Tomografia Computerizzata (TC) per l'identificazione di possibili precedenti lesioni ischemiche. La valutazione CEUS è stata eseguita durante l'ospedalizzazione prima dell'intervento. Tutti i pazienti diedero il consenso informato prima della procedura.

Valutazione CEUS

La valutazione ecografica della stenosi carotidea è stata eseguita mediante un'ecografia (Philips IU 22) utilizzando una sonda Lineare da 6 o 8 MHz da parte di un operatore esperto. La carotide comune, la biforcazione e la carotide interna sono state visualizzate sul piano longitudinale e trasversale mentre il paziente era in posizione supina. Le immagini della placca in B, Power e Color Mode sono state salvate per la successiva analisi. La valutazione CEUS è stata eseguita mediante l'iniezione di una dose (25 mg) di contrasto ecografico SonoVue con 5 ml di soluzione salina (Bracco Altana Pharma, Konstanz, Germany) in vena anticubitale mediante due boli da $\frac{1}{2}$ dose (2,5 ml). Ogni bolo è stato seguito da un flushing di soluzione salina. Le immagini della presenza massima di microbolle all'interno del lume carotideo ed eventualmente nella placca sono state salvate

per la successiva analisi cieca da parte di operatori esperti. La valutazione del grado di vascolarizzazione della placca è stata eseguita mediante l'utilizzo del software QLab® identificando la regione di interesse nella placca e ricavando il dato di vascolarizzazione espresso in dB.

Tecnica chirurgica

La rimozione della placca carotidea è stata eseguita mediante la tecnica di semieversione al fine di mantenere intatta la struttura della placca per la successiva valutazione istologica. In anestesia generale è stato eseguito accesso chirurgico longitudinale anteriormente al muscolo sternocleidomastoideo. Sezionate le fibre del platisma e la fascia sottostante, spostato lateralmente il muscolo sternocleidomastoideo e sezionato il ramo linguale della vena Giugulare interna si ha la possibilità di esporre la biforcazione carotidea. Prima del clampaggio dell'arteria si attua eparinizzazione sistemica. L'arteriotomia si esegue a livello del bulbo carotideo, il distacco della placca secondo il proprio piano di clivaggio sottoavventiziale a livello della carotide comune si esegue allungando l'arteriotomia prossimalmente, mentre a livello della carotide interna mediante eversione della placca fino al raggiungimento di una regione indenne. Lo shunt (Bard, Temple AZ, USA) di mantenimento della perfusione cerebrale è stato utilizzato routinariamente. Dopo la completa eliminazione di ogni frammento di placca e di eventuali lembi intimali, l'arteriotomia si sutura (polene 6-0 o 7-0) direttamente o con l'apposizione di un patch in Dacron di allargamento, ove ritenuto necessario. La ferita chirurgica si richiude mediante sutura della fascia e cutanea.

Analisi istologica

Le placche carotidee post-endoarterectomia sono state conservate in formalina (10%) decalcificate per 24h e successivamente fissate in paraffina. Le sezioni di placca a livello del punto di maggiore stenosi sono state analizzate. Sezioni di 5µm sono state trattate con Ematossilina-Eosina ed osservate al microscopio ottico (LM, Olympus CX42). Le lesioni aterosclerotiche sono state definite secondo la classificazione dell'American Heart Association¹⁷⁰ da tipo I a tipo VI in funzione dell'evoluzione della lesione aterosclerotica. L'analisi istologica è stata eseguita da un esperto istopatologo. L'estensione della calcificazione e del core lipidico è stata valutata misurandone l'area coinvolta. L'estensione è stata riportata secondo un valore numerico ordinale da 0 a 4 (0 nessuna presenza fino a 4 presenza massima). Lo spessore del fibrous cap è stato misurato e la lesione classificata

in placca con fibrous cap sottile (<200 µm) o spesso (>200 µm). È stata valutata la presenza o meno di emorragia all'interno della placca ateromatose (0: assenza di emorragia; 1: presenza di emorragia). La valutazione della presenza dell'infiltrato flogistico è stata determinata mediante analisi immunohistochimica: CD68 come marker macrofagico, Tryptasi come marker di mastociti e CD3 come marker di linfociti. La valutazione della densità dei microvasi interni alla placca è stata eseguita attraverso l'utilizzo del marcatore endoteliale CD34. Anticorpi anti-Alfa actina delle cellule muscolari lisce sono stati utilizzati per avere una visione d'insieme della cellularità all'interno della placca.

Analisi immunohistochimica

Le sezioni fissate in paraffina sono state reidratate attraverso soluzione con etanolo (Xilol 30 min, 100% 10 min, 95% 5 min, 70% 5 min). L'antigen retrieval è stato eseguito nel metodo heat mediated a 1 atm, 120°C per 20 min in una soluzione di citrato (pH 6) e raffreddato per 20 min. L'attività della perossidasi endogena è stata bloccata con 3% di H₂O₂ in absolute metanolo per 10 min a temperatura ambiente al buio. La reazione antigene anticorpo è stata eseguita mediante NovoLink Polymer Detection Kit (Novocastra, NewCastle, UK). Le sezioni sono state incubate a 4°C con antigeni monoclonali CD3 (1:100, Rabbit monoclonal antibody, SP7 clone, Neomarker, Fremont, California, USA), CD68 (1:200, Monoclonal Mouse Anti-Human, PG-M1 clone; Dako A/S, Copenhagen, Denmark), Tryptase (1:50, Monoclonal Mouse Anti-Human mast cell tryptase, AA1 clone; Dako A/S, Copenhagen, Denmark), CD34 (1:80, Monoclonal Mouse Anti-Human, Q-BEnd-10 clone; Dako A/S, Copenhagen, Denmark), ACML (1:9000, Monoclonal Anti-alfa smooth muscle actin, 1A4 clone, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA), successivamente le sezioni sono state incubate con NovoLinkTM Polymer per 30 min a temperatura ambiente e successivamente con diaminobenzinide (NovoLinkTM DAB Substrate Buffer) per un minuto. I nuclei cellulari sono stati fissati con Mayer's hematoxylin (Sigma Chemicals). In fine le sezioni sono state deidratate con passaggi graduali di etanolo e montati su vetrini con Canada Balsam (Sigma-Aldrich C1795). Le sezioni sono state osservate al microscopio ottico (Leitz Wetzlak, Germany 12 V max, 100W) connesso con CCD camera Olympus CX42. Le immagini sono state acquisite mediante Image-Pro Plus software (Media Cybernetics <http://www.mediacy.com>) e analizzate con ImageJ free software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Mediamente sono state analizzate 5 sezioni l'area studiata è stata di 0,12 mm² e ingrandita a 10X. Un patologo non informato sulle caratteristiche cliniche del paziente ha analizzato tutte le componenti istocitologiche delle placche. La

positività per ogni anticorpo è stata espressa con un valore semiquantitativo (massimo 3+, moderato 2+, minimo 1+ ed assente 0). La quantificazione dell'infiltrato infiammatorio è stata eseguita con la somma della positività ai markers CD34, CD68 e Tritasi: lo score minore di 8+ è stato considerato non infiammato (0) mentre con valore maggiore di 8+ infiammato (1). La vascolarizzazione all'interno della placca è stata espressa come densità di microvasi identificati con CD34. Le 5 immagini sono state convertite in stack, trasformate in montage, convertite da immagini a colori a immagini in bianco e nero a 8 bit e la scala è stata settata a 1600px/mm. Per ogni stack è stato contato il numero totale di microvasi, il loro diametro, e la superficie occupata dai vasi per ciascuna foto. La densità media di vasi è stata espressa in numero di microvasi per mm².

Analisi statistica

Variabili quantitative sono state espresse come media e deviazione standard (DS), variabili qualitative come frequenze assolute e relative. Il test T di Student è stato utilizzato per confrontare le medie di due gruppi per dati espressi in variabili quantitative. Il test esatto di Fisher è stato utilizzato per confrontare le differenti frequenze tra due gruppi. La valutazione mediante test di Spearman's è stata eseguita per correlare linearmente i valori in dB della CEUS e il grado di instabilità. L'analisi statistica è stata eseguita mediante l'utilizzo del software SPSS® 13.0 for Windows® (SPSS, Chicago, Illinois, USA). La significatività statistica è stata posta per $P < 0,05$.

RISULTATI

Pazienti

Ventidue pazienti sono entrati nello studio. L'età media è di 72 ± 8 anni, le caratteristiche epidemiologiche sono riportate in Tabella 4. Tredici (59%) hanno presentato manifestazioni cliniche nei sei mesi precedenti all'intervento: 7 pazienti hanno sviluppato un TIA, 6 uno stroke. L'esame TC ha messo in evidenza in 9 pazienti almeno un pregresso danno cerebrale focale di tipo ischemico. La valutazione mediante CEUS ha evidenziato una variabile componente vascolare: il valore medio di dB-Enhanced (dB-E) nella placca è stato di $4,85 \pm 1,9$ con un minimo di 2 ed un massimo di 7,8 dB-E. In tutti e 22 i pazienti l'intervento di endarterectomia è andato a buon fine e non si sono presentate complicanze maggiori o minori nel periodo postoperatorio. Le 22 placche aterosclerotiche ricavate dall'intervento si sono presentate in condizione idonee per l'analisi istologica.

Tabella 4: caratteristiche generali della popolazione esaminata

Caratteristiche*	% (n)
Età, anni	72,3±8,5
Maschi	66,7 (14)
Fattori di rischio vascolari	
Ipertensione	95,0 (20)
Cardiopatía ischemica	28,6 (6)
Broncopneumopatía cronica ostruttiva	33,3 (7)
Dislipidemia	57,0 (12)
Fumo	23,8 (5)
Insufficienza renale cronica (GFR <60 ml/min)	19,0 (4)
Sintomi	59,0(13)
Attacco ischemico transitorio	33,3 (7)
Minor e major stroke	28,6 (6)
TC positiva	42,9 (9)
Terapia	
Statine	50,0 (10)

*: Variabili continue sono espresse come media e deviazione standard GFR: glomerular filtration rate, TC: tomografia computerizzata

Analisi istologica e immunoistochimica

La valutazione istologica ha evidenziato 4 (18%) placche di classe 5a, 5 (22%) di classe 5b e 13 (60%) di classe 6, secondo la classificazione dell'AHA.¹⁷⁰ Sette (33%) placche si sono dimostrate francamente instabili. Le caratteristiche generali della struttura della placca sono riportate in Tabella 5. (Foto 5)

Tabella 5: caratteristiche generali delle placche esaminate

Caratteristiche della placca	% (n)
Fibrous cap sottile (< 200 µm)	59 (13)
Calcificazione +++	36 (8)
Infiltrato infiammatorio +++	31 (7)
Core lipidico +++	31 (7)
Densità vascolare +++	18 (4)

Analisi CEUS e placca instabile

Pazienti che hanno presentato un sintomo cerebro-ischemico (TIA o stroke) la valutazione mediante CEUS della placca carotidea ha evidenziato valori di dB-E significativamente

maggiori rispetto ai pazienti asintomatici: $7,4 \pm 0,56$ dB-E in pazienti sintomatici contro $3,56 \pm 1,42$ nei pazienti asintomatici, $p < 0,05$. (Fig.16)

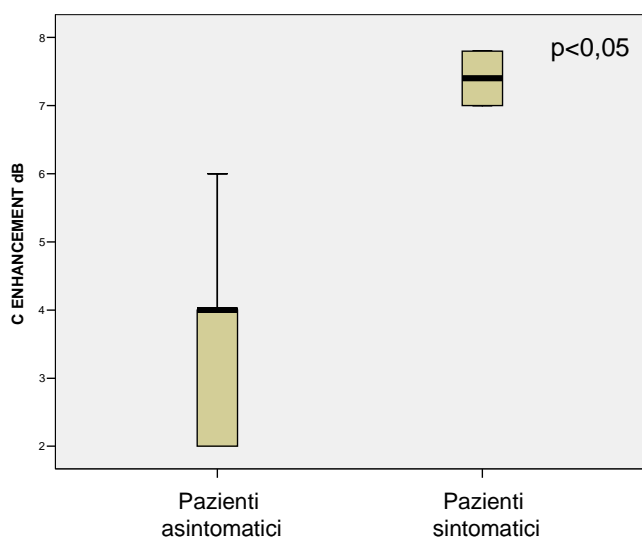


Figura 16: differenza in dB-E della placca carotidea tra pazienti asintomatici ($3,56 \pm 1,42$) e pazienti sintomatici ($7,4 \pm 0,56$.)

Pazienti con TC cerebrale positiva per lesioni ischemiche focali hanno presentato valori di dB-E significativamente maggiori rispetto ai pazienti senza il riscontro di lesioni: $5,47 \pm 1,8$ dB-E in TC+ contro $2,8 \pm 1,0$ dB-E in TC-. (Fig.16)

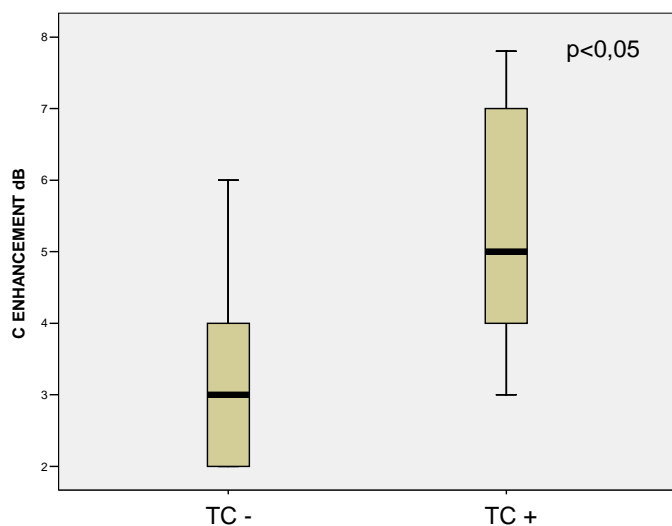


Figura 16: differenza in dB-E della placca carotidea tra pazienti con TC cerebrale positiva (+) ($5,47 \pm 1,8$) o negativa (-) per lesioni ischemiche focali ($2,8 \pm 1,0$).

Livelli di dB-E elevati sono associati alla presenza di un fibrous cap $<200 \mu\text{m}$ ($5,96 \pm 1,5$ contro $3,0 \pm 1,0$ dB-E in placche con fibrous cap $>200 \mu\text{m}$, $p=0,01$) ed ad un maggiore infiltrato flogistico ($6,4 \pm 1,2$ contro $3,2 \pm 0,9$ dB-E $p<0,05$), mentre non si sono presentate differenze in dB-E tra placche in funzione dell'estensione del core lipidico, di emorragia interna, di calcificazione o di concentrazione microvascolare. (Foto 6)

È stata individuata una buona correlazione tra i livelli di dB-E e in grado di instabilità di placca ($r^2= 0,83$).

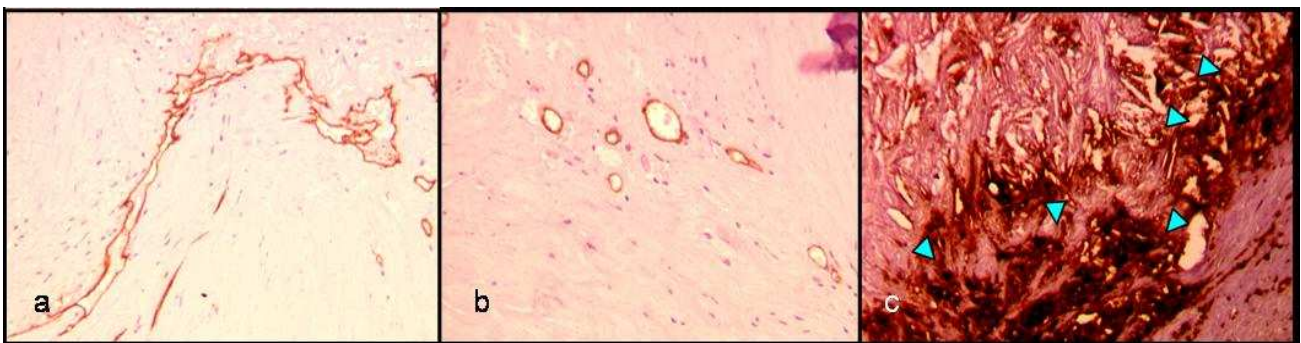


Foto 5: immagini di preparati istologici di placca carotidea: a) identificazione mediante marcatore CD34 di strutture vascolari irregolari e di grandi dimensioni, b) identificazione di strutture vascolari piccole e regolari, c) identificazione mediante marcatore CD68 di abbondante (+++) infiltrato flogistico alla base del core della placca carotidea

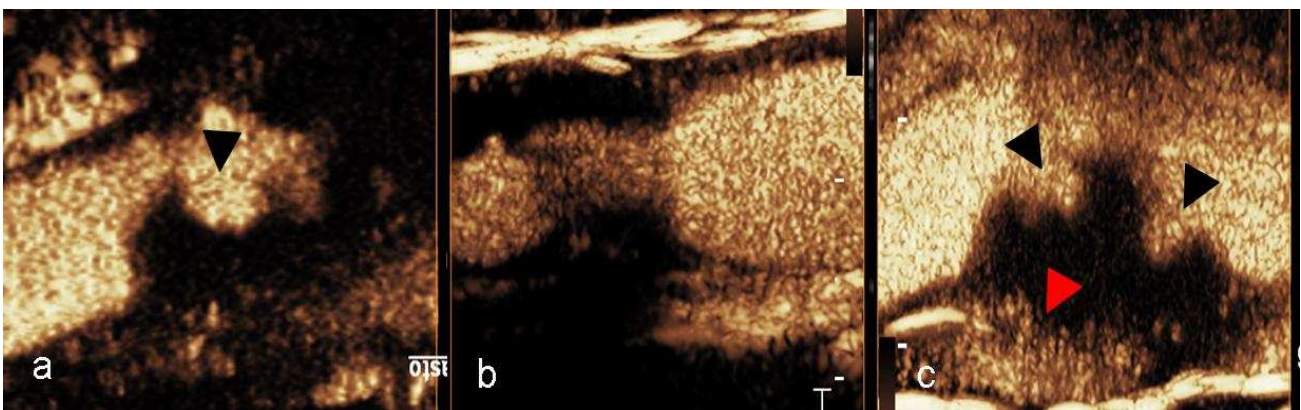


Foto 6: valutazione mediante CEUS di tre differenti placche carotidee: a) placca scarsamente vascolarizzata ma ulcerata (freccia nera), b) placca regolare e scarsamente vascolarizzata, c) placca con due ulcere nella sua superficie (freccie nere) e con abbondante vascolarizzazione alla base (freccia rossa).

6.3 Discussione

PCR e embolizzazione durante stenting carotideo

E' dimostrato che livelli elevati di PCR sono associati ad un maggiore grado di embolizzazione durante lo stenting carotideo, rilevato da una presenza maggiore di frammenti di placca a livello del filtro di protezione cerebrale. La maggiore percentuale di pori occlusi nei pazienti con livelli di PCR elevati può rappresentare una maggiore predisposizione della placca a frammentarsi - per una condizione di instabilità strutturale - rilasciando così materiale embolico di dimensioni superiori a 100 µm (diametro di un poro). Lo stato di instabilità, evidenziato dai livelli elevati di PCR, risulta essere un elemento aggiuntivo per la valutazione della placca, permettendo oltre all'analisi ecografica della placca, l'identificazione di gruppi di pazienti maggiormente a rischio. I livelli di PCR hanno permesso così un'ulteriore stratificazione del rischio di embolizzazione rispetto a quella offerta dalla valutazione del GSM.

CEUS e l'identificazione della placca vulnerabile

Nello studio condotto, l'identificazione della placca carotidea instabile mediante CEUS (per elevati valori di dB-E), si è associata alla presenza di sintomi cerebro-ischemici ed alla presenza di lesioni cerebrali focali ischemiche rilevate alla TC. È stata riscontrata anche l'associazione tra CEUS e le caratteristiche di instabilità all'istologia: presenza di un fibrous cap sottile o maggiore infiltrato infiammatorio. La metodica di valutazione della placca carotidea attraverso l'ecografia con mezzo di contrasto si è quindi rilevata altamente efficace nell'identificazione dei pazienti maggiormente a rischio di possibili eventi cerebro-ischemici.

Nonostante i possibili limiti di questi studi - determinati principalmente dalla scarsa numerosità del campione in esame - si è dimostrato che è possibile identificare lesioni carotidee maggiormente a rischio, permettendo successivamente una ulteriore valutazione del rischio cerebrovascolare nel paziente con stenosi carotidea.

7. CONCLUSIONI

La stenosi carotidea è una condizione di rischio per lo sviluppo di uno stroke. Il grado di stenosi è oggi l'elemento principale sul quale si basa l'indicazione al trattamento chirurgico di queste lesioni. Le stenosi carotidee asintomatiche in grado di determinare una riduzione del lume di oltre il 70% sono associate ad un rischio dell' 11% per lo sviluppo di eventi cerebrali in 5 anni. Lo sviluppo di attacchi ischemici transitori è determinato da iniziali alterazioni strutturali all'interno della placca - ulcerazioni, rottura del fibrous cap - e a questi episodi può far seguito un evento cerebrale maggiore. Il rischio che si presenti uno stroke nei primi giorni successivi a un TIA è di oltre il 20%. Il TIA è quindi la manifestazione clinica di una placca carotidea instabile che impone un trattamento nel più breve tempo possibile. Lo sviluppo di un TIA però non è sempre di facile individuazione. L'evento ischemico può svilupparsi in aree cerebrali secondarie - senza quindi i classici sintomi motori o sensitivi - può essere sottovalutato dal paziente oppure può svilupparsi durante il sonno e passare così del tutto inosservato. Sarebbe quindi di grande utilità clinica la possibilità di individuare in maniera strumentale o laboratoristica le placche che si associano ad un rischio maggiore così da avere uno strumento oggettivo nella valutazione del rischio.¹⁶⁻¹⁹

La placca carotidea è una struttura dinamica: presenta al suo interno depositi lipidici, leucociti e strutture vascolari che concorrono nella genesi dell'instabilità della placca aterosclerotica. Il core lipidico determina il grado di stenosi, permette il richiamo dei macrofagi, che ne causano l'ossidazione, ed è la componente più trombigena all'interno della placca. Le strutture vascolari che si sviluppano all'interno della lesione carotidea permettono un maggiore deposito dei lipidi e dei macrofagi e sono la causa di fenomeni di emorragia interna. L'emorragia all'interno della placca causa un rapido incremento del suo volume, potendo determinare l'occlusione acuta della carotide; oppure con l'incremento della pressione interna può portare alla rottura del fibrous cap, determinando il contatto con gli elementi circolanti del core della placca causando fenomeni trombotici. L'attività dei macrofagi attivati sta alla base delle possibili alterazioni che si possono sviluppare. La liberazione di MMP porta alla riduzione delle componenti della matrice e alla formazione del "thin fibrous cap". I leucociti determinano anche l'instabilità delle strutture vascolari - favorendo emorragie - e richiamano altre cellule dell'infiammazione stimolando un processo in grado di autoalimentarsi fino allo sviluppo di alterazioni della placca che portano all'insorgenza dello stroke.²⁶

Al fine di stabilire la presenza o meno nella placca di questi elementi destabilizzanti possono venire impiegate diverse metodiche.

- Il GSM, valutando l'ecogenicità della placca, considera lesioni a maggiore rischio emboligeno quelle con valori inferiori a 50 e considera lesioni a maggiore rischio di complicanze durante il CAS quelle con valori al di sotto di 25.^{24, 148}
- La RM è in grado di evidenziare presenza nella placca di emorragie o di un abbondante core lipidico.^{73, 74}
- Le concentrazioni sieriche di colesterolo maggiori di 250 mg/dl sono state associate a maggiori rischi cerebrovascolari in pazienti con stenosi carotidea.¹⁶
- La PCR è già stata dimostrata a livello coronarico un marker di rischio e anche a livello carotideo si associa a maggiore rischio di eventi ed a maggiore infiltrato flogistico all'interno della placca.^{79-82, 123, 125, 126}
- La PET è in grado di evidenziare placche carotidee con maggiore attività metabolica, con maggiore componente flogistica strutturalmente più instabili.⁵⁸⁻⁶⁰
- Nuovi markers sierici (PAPP-A e VEGF) si stanno dimostrando in grado associarsi alla presenza di lesioni carotidee maggiormente complicate.^{95-98, 103, 104}
- La CEUS è in grado di valutare la presenza di elementi vascolari all'interno della placca, condizione di maggiore rischio di instabilità.^{167, 168}

Tutte queste nuove metodiche si sono dimostrate capaci di identificare quella che è la placca instabile, tuttavia necessitano ancora di una completa conferma scientifica. Il possibile ruolo di queste valutazioni nella pratica clinica risulterà essere dipendente anche dai costi, dalla rapidità di esecuzione e dai tempi impiegati dall'esame e per questo non tutte le metodiche sopracitate potranno essere utilizzate routinariamente.

Sono necessari nuovi mezzi per l'identificazione dell'instabilità della placca per permettere una migliore stratificazione del rischio del paziente con stenosi carotidea. I possibili approcci terapeutici (medici e chirurgici) potranno essere riservati ai pazienti più appropriati, il tutto per un migliore utilizzo delle risorse e per il migliore trattamento possibile del malato.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Hennerici M, Aulich A, Sandmann W, Freund HJ: Incidence of asymptomatic extracranial arterial disease. *Stroke* 1981; :750–758
2. Hennerici M, Hulsbomer HB, Hefter H, Lammerts D, Rautenberg W: Natural history of asymptomatic extracranial arterial disease: results of a long-term prospective study. *Brain* 1987; 110: 777–79
3. Klop RB, Eikelboom BC, Taks AC: Screening of the internal carotid arteries in patients with peripheral vascular disease by colourflow duplex scanning. *Eur J Vasc Surg* 1991; 5: 41–45
4. Ellis MR, Franks PJ, Cuming R, Powell JT, Greenhalgh RM: Prevalence, progression and natural history of asymptomatic carotid stenosis: is there a place for carotid endarterectomy? *Eur J Vasc Surg* 1992; 6: 172–177.
5. Ascher E, DePippo P, Salles-Cunha S, Marchese J, Yorkovich W: Carotid screening with duplex ultrasound in elderly asymptomatic patients referred to a vascular surgeon: is it worthwhile? *Ann Vasc Surg* 1999; 13: 164–168.
6. Gentile AT, Taylor LM Jr, Moneta GL, Porter JM: Prevalence of asymptomatic carotid stenosis in patients undergoing infrainguinal bypass surgery. *Arch Surg* 1995; 130: 900–904
7. Marek J, Mills JL, Harvich J, Cui H, Fujitani RM: Utility of routine carotid duplex screening in patients who have claudication. *J Vasc Surg* 1996; 24: 572–577
8. House AK, Bell R, House J, Mastaglia F, Kumar A, D'Antuono M: Asymptomatic carotid artery stenosis associated with peripheral vascular disease: a prospective study. *Cardiovasc Surg* 1999; 7: 44–49
9. Cheng SW, Wu LL, Lau H, Ting AC, Wong J: Prevalence of significant carotid stenosis in Chinese patients with peripheral and coronary artery disease. *Aust NZ J Surg* 1999; 69: 44–47.
10. Cina CS, Safar HA, Maggisano R, Bailey R, Clase CM: Prevalence and progression of internal carotid artery stenosis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *J Vasc Surg* 2002; 36: 75–82.
11. Cheng C., Tempel D., van Haperen R. et al.: Atherosclerotic Lesion Size and Vulnerability Are Determined by Patterns of Fluid Shear Stress. *Circulation* 2006; 113:2744-2753

12. Cichaa I., Beronovb K., Lopez Ramirezb E. et al.:Shear stress preconditioning modulates endothelial susceptibility to circulating TNF- and monocytic cell recruitment in a simplified model of arterial bifurcations. *Atherosclerosis* 2009
13. Cunningham S. K. and Gotlieb A. I.:The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Laboratory Investigation* 2005; 85, 9–23
14. Glagov S., Zarnis C.K. and Giddens D.P.: Fattori emodinamicie reattività tissutali durante l'aterogenesi nell'uomo. *G Ital Cardiol* 1990; 20: 1070-1074
15. Johnston s. c., Rothwell P. M., Nguyen-Huynh M. N. et al.:Validation and refi nement of scores to predict very early stroke risk after transient ischaemic attack. *Lancet* 2007; 369: 283–92.
16. Executive Committee for the Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study: Endarterectomy for Asymptomatic carotid Artery Stenosis. *JAMA* 1995;273:1421-1428
17. MRC Asymptomatic Carotid Surgery Trial (ACST) Collaborative Group: Prevention of disabling and fatal strokes by successful carotid endarterectomy in patients without recent neurological symptoms: randomised controlled trial. *Lancet* 2004; 363: 1491–502
18. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade stenosis. *N Engl J Med* 1991; 325: 445–53.
19. European Carotid Surgery Trialists' Collaborative Group. MRC European Carotid Surgery Trial: interim results for symptomatic patients with severe (70–99%) or with mild (0–29%) carotid stenosis. *Lancet* 1991; 337: 1235–43
20. Bluth E. I., Wetzner S. M., Stavros A. T. et al.: Carotid duplex sonography A multicenter recommendation for standardized imaging and Doppler criteria. *RadioGraphics* 1988; 8: (3) 487-506
21. Kern R., Szabo K., Hennerici M. and Meairs S.: Characterization of Carotid Artery Plaques Using Real-time Compound B-mode Ultrasound. *Stroke* 2004; 35:870
22. Grant E., Benson C. B., Moneta G. L. et al.: Carotid Artery Stenosis: Gray-Scale and Doppler US Diagnosis—Society of Radiologists in Ultrasound Consensus Conference. *Radiology* 2003; 229:340–346
23. El-Barghouty N., Geroulakos G., Nicolaidis A. et al.: Computer-Assisted Carotid Plaque Characterisation. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1995; 9:389-393
24. Biasi G. M., Sampaolo A., Mingazzini P. et al.: Computer analysis of yltrasonic plaque echolucency in identifying high risk carotid bifurcation lesion. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1999; 17:476-479

25. Cotran, Kumar and Collins "Robbins" VI Ed.: Le basi patologiche delle malattie. Piccin nuova libreria p 583-595.
26. Ross R.: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 801-809
27. O'Brien et al.: Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation* 1996; 93:672
28. Cybulsky M. I. and Gimbrone M. A.: Endothelial expression of mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991; 251:788
29. Gimbrone M. A., Nagel T., and Topper J. N.: Biochemical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology. *J Clin Invest* 1997; 99:1809
30. Mauriello A, Sangiorgi G. M., Virmanid R. et al.: A pathobiologic link between risk factors profile and morphological markers of carotid instability. *Atherosclerosis* 2010; 208:572–580
- 31 Bui Q. T., Prempeh M. and Wilensky R. L.: Atherosclerotic plaque development. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2009; 41:2109–2113
32. Steiberg D.: Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 1997; 95:1062
33. Libby P., Ridker P. M. and Maseri A.: Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation* 2002;105: 1135-1143
34. Kolodgie F. D., Burke A. P., Farb A. et al.:The thin-cap fibroatheroma: a type of vulnerable plaque The major precursor lesion to acute coronary syndromes. *Curr Opin Cardiol* 2001; 16:285–292
35. Redgrave J.N.E., Lovett J. K., Gallagher P. J. and Rothwell P. M.:Histological Assessment of 526 Symptomatic Carotid Plaques in Relation to the Nature and Timing of Ischemic Symptoms: The Oxford Plaque Study. *Circulation* 2006;113:2320-2328
36. Virmani R. et al.: Pathology of the Thin-Cap Fibroatheroma: A Type of Vulnerable Plaque. *Journal of Interventional Cardiology* 2003; 16:267
37. Virmani R., Burke A., Farb A. et al.: Pathology of the Vulnerable Plaque. *Journal of the American College of Cardiology* 2006; 47:C13
38. Lovett J. K., Gallagher P. J., Hands L. J. et al.:Histological Correlates of Carotid Plaque Surface Morphology on Lumen Contrast Imaging. *Circulation* 2004;110:2190-2197
39. Wasserman B. A., Sharrett A. R., Lai S. et al.: Risk Factor Associations With the Presence of a Lipid Core in Carotid Plaque of Asymptomatic Individuals Using High-

Resolution MRI: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Stroke* 2008;39:329-335

40. Takaya N. , Yuan C., Chu B. et al.: Association Between Carotid Plaque Characteristics and Subsequent Ischemic Cerebrovascular Events: A Prospective Assessment With MRI--Initial Results. *Stroke* 2006;37:818-823

41. Doherty T. M., Fitzpatrick L. A., Inoue D. et al.: Molecular, Endocrine, and Genetic Mechanisms of Arterial Calcification *Endocrine Reviews* 2004; 25(4):629–672

42. Abedin M., Tintut Y. and Demer L. L.: Vascular Calcification: Mechanisms and Clinical Ramifications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1161-1170

43. Demer L. L. and Tintut Y.: Mineral Exploration: Search for the Mechanism of Vascular Calcification and Beyond: The 2003 Jeffrey M. Hoeg Award Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1739-1743

44. Huang H., Virmani R., Younis H. et al.: The Impact of Calcification on the Biomechanical Stability of Atherosclerotic Plaques. *Circulation* 2001;103:1051-1056

45. Shaalan W. E., Cheng H., Gewertz B. et al.: Degree of carotid plaque calcification in relation to symptomatic outcome and plaque inflammation. *J Vasc Surg* 2004;40:262-9

46. Redgrave J.N.E., Lovett J. K., Gallagher P. J. and Rothwell P. M.: Histological Assessment of 526 Symptomatic Carotid Plaques in Relation to the Nature and Timing of Ischemic Symptoms: The Oxford Plaque Study. *Circulation* 2006;113:2320-2328

47. Bui Q. T., Prempeh M. and Wilensky R. L.: Atherosclerotic plaque development. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2009; 41:2109–2113

48. Takaya N., Yuan C., Chu B. et al.: Cerebrovascular Events: A Prospective Assessment With MRI--Initial Results Association Between Carotid Plaque Characteristics and Subsequent Ischemic Cerebrovascular Events: A Prospective Assessment With MRI--Initial Results. *Stroke* 2006;37:818-823

49. Cappendijk V. C., Kessels A. G. H., Heeneman S. et al.: Comparison of Lipid-Rich Necrotic Core Size in Symptomatic and Asymptomatic Carotid Atherosclerotic Plaque: Initial Results. *J Magn Reson Imaging* 2008;27:1356–1361.

50. Kadoglou NP, Sailer N, Moumtzouoglou A, Kapelouzou A, Gerasimidis T, Liapis CD: Aggressive lipid-lowering is more effective than moderate lipid-lowering treatment in carotid plaque stabilization. *J Vasc Surg* 2010;51:114-21

51. Tang TY, Howarth SP, Miller SR, Graves MJ et al.: The ATHEROMA (Atorvastatin Therapy: Effects on Reduction of Macrophage Activity) Study. Evaluation using ultrasmall

superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging in carotid disease. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Jun 2;53(22):2039-50.

52. Treasure C. B., et al.: Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *N Eng J Med* 1995; 332:481

53. Anderson T. J. et al.: The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. *N Eng J Med* 1995; 332:488

54. Bui Q. T., Prempeh M. and Wilensky R. L.: Atherosclerotic plaque development. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2009; 41:2109–2113

55. Steiberg D.: Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 1997; 95:1062

56. Libby P., Ridker P. M. and Maseri A.: Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation* 2002;105: 1135-1143

57. Takahashi K., Takeya M. and Sakashita N.: Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals. *Med Electron Microsc* 2002; 35:179–203

58. Ogawa M., Magata Y., Kato T. et al.: Application of ¹⁸F-FDG PET for Monitoring the Therapeutic Effect of antiinflammatory Drugs on Stabilization of Vulnerable Atherosclerotic Plaques. *J Nucl Med* 2006; 47:1845–1850

59. Tawakol A., Migrino R. Q., Bashian G. G. et al.: In Vivo ¹⁸F-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography Imaging Provides a Noninvasive Measure of Carotid Plaque Inflammation in Patients. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:1818 –24

60. Græbe M., Pedersen S. F., Borgwardt L. et al.: Molecular Pathology in Vulnerable Carotid Plaques: Correlation with [¹⁸]-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography (FDG-PET). *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2009; 37:714-721

61. Langheinrich A. C., Kampschulte M., Buch T. and Bohle R. M.: Vasa vasorum and atherosclerosis – Quid novi?. *Thromb Haemost* 2007; 97: 873–879

62. Carmeliet P.: Angiogenesis in health and disease. *Nature Med* 2003; 9:653

63. Moreno P. R. et al.: Neovascularization in Human Atherosclerosis. *Circulation* 2006;113;2245-2252

64. Kockx M., Cromheeke K. M. , Knaapen M. et al.: Phagocytosis and Macrophage Activation Associated With Hemorrhagic Microvessels in Human Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23;440-446

Sluimer J. C. and Daemen M. J.: Novel concepts in atherogenesis: angiogenesis and hypoxia in atherosclerosis. *J Pathol* 2009; 218: 7–29

65. Milei J., Parodi J. C., Alonso G. F. et al.: Carotid rupture and intraplaque hemorrhage: Immunophenotype and role of cells involved. *Am Heart J* 1998;136:1096-1105
66. Virmani R. et al.: Atherosclerotic Plaque Progression and Vulnerability to Rupture: Angiogenesis as a Source of Intraplaque Hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2054-2061
67. Kolodgie F. D., Gold H. K., Burke A. P. et al.: Intraplaque Hemorrhage and Progression of Coronary Atheroma. *N Engl J Med* 2003;349:2316-25
68. McCarthy M., Loftus I., Thompson M. M. et al.: Angiogenesis and the atherosclerotic carotid plaque: An association between symptomatology and plaque morphology. *J Vasc Surg* 1999;30:261-8.
69. Reilly L. M., Lusby R. J., Hughes L. et al.: Carotid plaque histology using real-time ultrasonography. Clinical and therapeutic implications. *Am J Surg* 1983;146(2):188-93
70. O'Donnell T.F. Jr, Erdoes L., Mackey W. C. et al.: Correlation of B-mode ultrasound imaging and arteriography with pathologic findings at carotid endarterectomy. *Arch Surg*. 1985;120(4):443-9
71. Bluth E.I., Kay D., Merritt C.R. et al.: Sonographic characterization of carotid plaque: detection of hemorrhage. *Am J Roentgenol*. 1986;146(5):1061-5.
72. Widder B., Paulat K., Hackspacher J. et al.: Morphological characterization of carotid artery stenoses by ultrasound duplex scanning. *Ultrasound Med Biol*. 1990;16(4):349-54.
73. Takaya N., Yuan C., Chu B. et al.: Cerebrovascular Events: A Prospective Assessment With MRI--Initial Results Association Between Carotid Plaque Characteristics and Subsequent Ischemic Cerebrovascular Events: A Prospective Assessment With MRI--Initial Results. *Stroke* 2006;37:818-823
74. Takaya N., Yuan C., Chu B. et al.: Presence of Intraplaque Hemorrhage Stimulates Progression of Carotid Atherosclerotic Plaques: A High-Resolution Magnetic Resonance Imaging Study. *Circulation* 2005;111:2768-2775
75. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420:868–874.
76. Thompson D, Pepys MB, Wood SP. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure*. 1999;7:169–177
77. Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL. Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol*. 2001;158:1039–1051.
78. Jabs WJ, Logering BA, Gerke P, Kreft B, Wolber EM, Klinger MH, Fricke L, Steinhoff J. The kidney as a second site of human C-reactive protein formation in vivo. *Eur J Immunol*. 2003;33:152–161.

79. Ridker PM. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation*. 2003;107:363–369
80. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med*. 2000;342:836–843
81. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, Criqui M, Fadl Y, Fortmann SP, Hong Y, Myers GL, Rifai N, Smith SC, Taubert K, Tracy RP, Vinicor F. Markers of inflammation and cardiovascular disease-application to clinical and public health practice. *Circulation*. 2003;107:499–511.
82. Jialal I, Devaraj S. Role of C-reactive protein in the assessment of cardiovascular risk. *Am J Cardiol*. 2003;91:200–202.
83. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation*. 2000;102:2165–2168
84. Fichtlscherer S, Rosenberger G, Walter DH, Breuer S, Dimmeler S, Zeiher AM. Elevated C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2000;102:1000–1006.
85. Venugopal SK, Devaraj S, Yuhanna I, Shaul P, Jialal I. Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. *Circulation*. 2002;106:1439–1441.
86. Venugopal SK, Devaraj S, Jialal I. C-reactive protein decreases prostacyclin release from human aortic endothelial cells. *Circulation*. 2003;108: 1676–1678.
87. Devaraj S, Xu DY, Jialal I. C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells: implications for the metabolic syndrome and atherothrombosis. *Circulation*. 2003;107:398–404.
88. Tebo JF, Mortensen RF. Internalization and degradation of receptor bound C-reactive protein by U-937 cells: induction of H₂O₂ production and tumoricidal activity. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1095:210–216.
89. Ballou SP, Lozanski G. Induction of inflammatory cytokine release from cultured human monocytes by C-reactive protein. *Cytokine*. 1992;4:361–368.
90. Williams TN, Zhang CX, Game BA, He L, Huang Y. C-reactive protein stimulates MMP-1 expression in U937 histiocytes through Fc[gamma]RII and extracellular signal-regulated kinase pathway: an implication of CRP involvement in plaque destabilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:61–66.

91. Chang MK, Binder CJ, Torzewski M, Witztum JL. C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: Phosphorylcholine of oxidized phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:13043–13048.
92. Nickenig G, Harrison DG. The AT1-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis: part I: oxidative stress and atherogenesis. *Circulation.*2002;105:393–396.
93. Hattori Y, Matsumura M, Kasai K. Vascular smooth muscle cell activation by C-reactive protein. *Cardiovasc Res.* 2003;58:186–195.
94. Herrmann J., Lerman L. O., Mukhopadhyay D. et al.:Angiogenesis in Atherogenesis.*Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1948-1957
95. Couffinhal T., Kearney M.and Witzendichler B. et al.:Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor (VEGF/VPF) in Normal and Atherosclerotic Human Arteries.*AmJ Pathol* 1997, 150:1673-1685
96. Daniel M. Birk, Joel Barbato, Leila Mureebe and Rabih A. Chaer: Basic Science Review: Current Insights on the Biology and Clinical Aspects of VEGF Regulation.*Vasc Endovascular Surg* 2009; 42; 517
97. Russell D. A., AbbottC. R. and Gough M. J.:Vascular endothelial growth factor is associated with histological instability of carotid plaques.*British Journal of Surgery* 2008; 95: 576–581
98. Inoue M., Itoh H., Ueda M. et al.: Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression in Human Coronary Atherosclerotic Lesions : Possible Pathophysiological Significance of VEGF in Progression of Atherosclerosis. *Circulation* 1998;98:2108-2116
99. Doyle B. and Caplice N.: Plaque Neovascularization and Antiangiogenic Therapy for Atherosclerosis.*J Am Coll Cardiol* 2007;49:2073–80
100. Ayes-Genis A. et al.: PREGNANCY-ASSOCIATED PLASMA PROTEIN A AS A MARKER OF ACUTE CORONARY SYNDROMES. *N Engl J Med* 2001;345:1022-9
101. Cosin-Sale J. et al.:Relationship among pregnancy associated plasma protein-A levels, clinical characteristics, and coronary artery disease extent in patients with chronic stable angina pectoris. *European Heart Journal* 2005;26, 2093–2098
102. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, Fichtlscherer S, Simoons ML, Zeiher AM. Pregnancy-associated plasma protein-A levels in patients with acute coronary syndromes: comparison with markers of systemic inflammation, platelet activation, and myocardial necrosis. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:229 –37

103. Sangiorgi G., Mauriello A., Bonanno E. et al.:Pregnancy-Associated Plasma Protein-A Is Markedly Expressed by Monocyte-Macrophage Cells in Vulnerable and Ruptured Carotid Atherosclerotic Plaques A Link Between Inflammation and Cerebrovascular Events. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:2201–11
104. Beaudoux JL, Burc L, Imbert-Bismut F, et al. Serum plasma pregnancy-associated protein A: a potential marker of echogenic carotid atherosclerotic plaques in asymptomatic hyperlipidemic subjects at high cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:e7–10
105. Bots ML, Launer LJ, Lindemans J, et al. Homocysteine and short-term risk of myocardial infarction and stroke in the elderly. *Arch Intern Med* 1999; 159:38-44
106. Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. *Lancet* 1999; 354:407-413
- G. J. Hankey and J. W. Eikelboom: Homocysteine and stroke. *Current Opinion in Neurology* 2001, 14:95-102
107. Dudman N.P.: An alternative view of homocysteine. *Lancet* 1999; 354: 2072–74
- William G., A. Ajani, R. J. Glynn, C. H. Hennekens: Blood Levels of Homocysteine and Increased Risks of Cardiovascular Disease Causal or Casual? *Arch Intern Med.* 2000;160:422-434
108. Reddy GSR, Wilcken DEL. Experimental homocystinuria in pigs: comparison with studies in sixteen homocystinuric patients. *Metabolism* 1982; 31: 778–83
109. Bonna KH, Njolstad I, Ueland PM, Schirmer H, Tverdal A, Steigen T, Wang H, Nordrehaug JE, Arnesen E, Rasmussen K. Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;354:1578–1588.
110. Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ, Sheridan P, Pogue J, Micks M, McQueen MJ, Probstfield J, Fodor G, Held C, Genest J Jr. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med* 2006;354:1567–1577
111. Toole JF, Malinow MR, Chambless LE, Spence JD, Pettigrew LC, Howard VJ, Sides EG, Wang CH, Stampfer M. Lowering Homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death: the Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) randomized controlled trial. *JAMA* 2004;291:565–575.
112. Christine M. Albert; Nancy R. Cook; J. Michael Gaziano et al.: Effect of Folic Acid and B Vitamins on Risk of Cardiovascular Events and Total Mortality Among Women at High Risk for Cardiovascular Disease: A Randomized Trial. *JAMA.* 2008;299(17):2027-2036

113. Rex L. Jamison; Pamela Hartigan; James S. Kaufman et al.: Effect of Homocysteine Lowering on Mortality and Vascular Disease in Advanced Chronic Kidney Disease and End-stage Renal Disease: A Randomized Controlled Trial. *JAMA*. 2007;298(10):1163-1170
114. Johannes F. E. Mann, Patrick Sheridan, Matthew J. McQueen et al. on behalf of the HOPE-2 investigators: Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in people with chronic kidney disease—results of the renal Hope-2 study. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 645–653
115. www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=4677
116. Danesh J, Whincup P, Walker M, Lennon L, Thomson A, Appleby P, Gallimore JR, Pepys MB. Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. *BMJ*. 2000;321: 199–204
117. Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy Am women. *Circulation*. 2003;107:391–397.
118. RIDKER P. M., CUSHMAN M., STAMPFER M. J. et al.: INFLAMMATION, ASPIRIN, AND THE RISK OF CARDIOVASCULAR DISEASE IN APPARENTLY HEALTHY MEN. *N Engl J Med* 1997;336:973-9
119. Danesh J., Collins R. Appleby P. et al.: Association of Fibrinogen, C-reactive Protein, Albumin, or Leukocyte Count With Coronary Heart Disease. Meta-analyses of Prospective Studies. *JAMA*. 1998;279:1477-1482
120. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, III, Criqui M, Fadl YY, Fortmann SP, Hong Y, Myers GL, Rifai N, Smith SC, Jr., Taubert K, Tracy RP, Vinicor F. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the Am Heart Association. *Circulation*. 2003;107:499 –511.
121. Hoshi T., Kitagawa K., Yamagami H. et al.: Relations of Serum High-Sensitivity C-Reactive Protein and Interleukin-6 Levels With Silent Brain Infarction. *Stroke* 2005;36;768-772
122. Rost N. S., Wolf P. A., Kase C. S. et al.: Plasma Concentration of C-Reactive Protein and Risk of Ischemic Stroke and Transient Ischemic Attack: The Framingham Study. *Stroke* 2001;32;2575-2579
123. Di Napoli M., Schwaninger M., Cappelli R. et al.: Evaluation of C-Reactive Protein Measurement for Assessing the Risk and Prognosis in Ischemic Stroke: A Statement for

Health Care Professionals From the CRP Pooling Project Members. *Stroke* 2005;36:1316-1329

124. Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy Am women. *Circulation*. 2003;107:391–397

125. Mullenix P. S, Steele S. R, Matthew S.: C-reactive Protein Level and Traditional Vascular Risk Factors in the Prediction of Carotid Stenosis. *Arch Surg*. 2007;142(11):1066-1071

126. Schlager O., Exner M., Mlekusch W. et al.: C-Reactive Protein Predicts Future Cardiovascular Events in Patients With Carotid Stenosis. *Stroke* 2007;38;1263-1268

127. Sever PS, et al. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial—Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2003;361:1149–1158

128. Colhoun HM, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multicentre randomised placebocontrolled trial. *Lancet* 2004;364:685–696.

129. Sacco R. L. and Liao J. K.: statins and stroke. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2005; 2(11): 576–584

Heart Protection Study Collaborative Group. Effects of cholesterol-lowering with simvastatin on stroke and other major vascular events in 20 536 people with cerebrovascular disease or other high-risk conditions. *Lancet* 2004; 363: 757–67

130. Ridker P. M, Christopher M., Cannon P. et al. for the Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy—Thrombolysis in Myocardial Infarction 22 (PROVE IT—TIMI 22) Investigators: C-Reactive Protein Levels and Outcomes after Statin Therapy. *N Engl J Med* 2005;352:20-8.

131. Schlager O., Exner M., Mlekusch W. et al.: C-Reactive Protein Predicts Future Cardiovascular Events in Patients With Carotid Stenosis. *Stroke* 2007;38;1263-1268

132. Schillinger M., Exner M., Mlekusch W.: Inflammation and Carotid Artery—Risk for Atherosclerosis Study (ICARAS). *Circulation* 2005;111;2203-2209

133. Muluk S. C., Muluk V. S., Sugimoto H. et al.: Progression of asymptomatic carotid stenosis: A natural history study in 1004 patients. *J Vasc Surg* 1999;29:208-16

134. Garvey L., Makaroun M. S., Muluk V. S. et al.: Etiologic factors in progression of carotid stenosis: A 10-year study in 905 patients. *J Vasc Surg* 2000;31:31-8

135. Arthurs Z. M., Andersen M. C., Starnes B. W. et al.: A prospective evaluation of C-reactive protein in the progression of carotid artery stenosis. *J Vasc Surg* 2008;47:744-51
136. Hashimoto H., Kitagawa K., Hougaku H. et al.: C-Reactive Protein Is an Independent Predictor of the Rate of Increase in Early Carotid Atherosclerosis. *Circulation* 2001;104:63-67
137. Ridker P. M, Christopher M., Cannon P. et al.for the Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy–Thrombolysis in Myocardial Infarction 22 (PROVE IT–TIMI 22) Investigators: C-Reactive Protein Levels and Outcomes after Statin Therapy. *N Engl J Med* 2005;352:20-8
138. Hegland O., Dickstein K., Larsen J. P.: Effect of Simvastatin in Preventing Progression of Carotid Artery Stenosis. *The American Journal of Cardiology* Vol. 87 March 1, 2001
139. Hegland O., Kurz M W., Munk P. S.: The effect of statin therapy on the progression of carotid artery stenosis in relation to stenosis severity. *Acta Neurol Scand* 2010: 121: 11–15
140. Ridker P. M, Christopher M., Cannon P. et al.for the Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy–Thrombolysis in Myocardial Infarction 22 (PROVE IT–TIMI 22) Investigators: C-Reactive Protein Levels and Outcomes after Statin Therapy. *N Engl J Med* 2005;352:20-8.
141. Saama T., Yuan C., Chua B. et al.: Predictors of carotid atherosclerotic plaque progression as measured by noninvasive magnetic resonance imaging. *Atherosclerosis* 2007; 194:e34–e42
142. Underhill H., Yuan C., Zhao X. et al.: Effect of rosuvastatin therapy on carotid plaque morphology and composition in moderately hypercholesterolemic patients: A high-resolution magnetic resonance imaging trial. *Am Heart J* 2008;155:584.e1-584.e8
143. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26
144. Alvarez Garcia B., Ruiz C.,Chacon P. et al.:High-sensitivity C-reactive protein in high-grade carotid stenosis: Risk marker for unstable carotid plaque. *J Vasc Surg* 2003;38:1018-24
145. Papas T. T., Maltezos K. C., Papanas N. et al.: High-Sensitivity CRP Is Correlated With Neurologic Symptoms and Plaque Instability in Patients With Severe Stenosis of the Carotid Bifurcation. *Vasc Endovascular Surg* 2008; 42; 249
146. Rerkasem K., Shearman C. P., Williams J. A. et al.: C-reactive Protein is Elevated in Symptomatic Compared with Asymptomatic Patients with Carotid Artery Disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2002; 23, 505-509

147. Buffon A, Liuzzo G, Biasucci LM, et al. Preprocedural serum levels of C-reactive protein predict early complications and late restenosis after coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:1512–21
148. Biasi G. M., Froio A., Diethrich E.D. et al.: Carotid Plaque Echolucency Increases the Risk of Stroke in Carotid Stenting: The Imaging in Carotid Angioplasty and Risk of Stroke (ICAROS) Study. *Circulation* 2004;110:756-762
149. Biasi G. M., Ferrari S. A., Nicolaidis A. N. et al.: The ICAROS Registry of Carotid Artery Stenting. *J Endovasc Ther* 2001;8:46–52
150. Groschel K., Ernemann U., Larsen J. et al.: Preprocedural C-Reactive Protein Levels Predict Stroke and Death in Patients Undergoing Carotid Stenting. *Am J Neuroradiol* 2007;28:1743– 46
151. Gupta R., Bhatt A., Kassab M. et al.: Elevated Levels of Pre-Procedural High-Sensitivity C-Reactive Protein Is Associated with Midterm Restenosis after Extra- and Intracranial Stenting. *J Neuroimaging* 2010;20:74-77
152. Schillinger M., Exner M., Sabeti S. et al.: Excessive Carotid In-Stent Neointimal Formation Predicts Late Cardiovascular Events. *J Endovasc Ther* 2004;11:229–239
153. Heider P., Poppert H., Wolf O. et al.: Fibrinogen and high-sensitive C-reactive protein as serologic predictors for perioperative cerebral microembolic lesions after carotid endarterectomy. *J Vasc Surg* 2007;46: 449-54
154. Dunmore B. J., McCarthy M. J., Naylor R. et al.: Carotid plaque instability and ischemic symptoms are linked to immaturity of microvessels within plaques. *J Vasc Surg* 2007;45:155-9
155. Mofidi R., Powell T., Crotty T. et al.: Angiogenesis in Carotid Atherosclerotic Lesions Is Associated with Timing of Ischemic Neurological Events and Presence of Computed tomographic Cerebral Infarction in the Ipsilateral Cerebral Hemisphere. *Annals of Vascular Surgery* 2008: 266-272
156. Mofidi R., Crotty T. B., McCarthy P. et al.: Association between plaque instability, angiogenesis and symptomatic carotid occlusive disease. *British Journal of Surgery* 2001: 88; 945-950
157. McCarthy M. J., Loftus I. M., Thompson M. M. et al.: Angiogenesis and the atherosclerotic carotid plaque: An association between symptomatology and plaque morphology. *J Vasc Surg* 1999;30:261-8
158. Moreno P. R. et al.: Neovascularization in Human Atherosclerosis. *Circulation* 2006;113;2245-2252

159. Couffinhal T., Kearney M. and Witzendichler B. et al.: Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor (VEGF/VPF) in Normal and Atherosclerotic Human Arteries. *Am J Pathol* 1997, 150:1673-1685
160. Daniel M. Birk, Joel Barbato, Leila Mureebe and Rabih A. Chaer: Basic Science Review: Current Insights on the Biology and Clinical Aspects of VEGF Regulation. *Vasc Endovascular Surg* 2009; 42; 517
161. Russell D. A., Abbott C. R. and Gough M. J.: Vascular endothelial growth factor is associated with histological instability of carotid plaques. *British Journal of Surgery* 2008; 95: 576–581
162. Heliopulos H., Papazogluo D., Piperidou H. et al.: Carotid plaque echomorphology and serum vascular endothelial growth factor levels. *Eur Neurol* 2004: 51;104-108
163. Feinstein S. B.: Contrast Ultrasound Imaging of the Carotid Artery Vasa Vasorum and Atherosclerotic Plaque Neovascularization. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:236–43
164. Vicenzini E., Giannoni M. F., Puccinelli F. et al.: Detection of Carotid Adventitial Vasa Vasorum and Plaque Vascularization With Ultrasound Cadence Contrast Pulse Sequencing Technique and Echo-Contrast Agent. *Stroke* 2007;38;2841-2843
165. Coli s., Magnoni M., Sangiorgi G. et al.: Contrast-Enhanced Ultrasound Imaging of Intraplaque Neovascularization in Carotid Arteries Correlation With Histology and Plaque Echogenicity. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:223–30.
166. Shah F., Balan P., Weinberg M. et al: Contrast-enhanced ultrasound imaging of atherosclerotic carotid plaque neovascularization: a new surrogate marker of atherosclerosis? *Vasc Med* 2007; 12; 291
167. Giannoni M. F., Vicenzini E., Citone M. et al.: Contrast Carotid Ultrasound for the Detection of Unstable Plaques with Neoangiogenesis: A Pilot Study. *Eur J Vasc Endovasc Surg* (2009) 37, 722e727
168. Xiong L., Deng Y., Zhu Y. et al.: Correlation of Carotid Plaque Neovascularization Detected by Using Contrast-enhanced US with Clinical Symptoms. *Radiology* 2009: 251;583-592
169. R W. Hobson, W C. Mackey, E Ascher et al Management of atherosclerotic carotid artery disease: Clinical practice guidelines of the Society for Vascular Surgery *J Vasc Surg* 2008;48:480-6
170. H. C. Stary, A. B. Chandler, R. E. Dinsmore et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis *Circulation* 1995; 92:1355-1374

9. RINGRAZIAMENTI

Il primo pensiero è rivolto al Prof. Stella, il mio mentore e ispiratore.. l'uomo che più di ogni altro sia stato in grado, durante questi anni di studio, di stimolare la mia ambizione e il mio coraggio... e al quale sono legata da un affetto profondissimo, che non conosce limiti.

Grazie a Silvia, a Francesco e al Prof. Pasquinelli, per tutto il lavoro fatto assieme...

Grazie a Gianluca Faggioli, docente e amico, per tutto quello che di buono siamo stati capaci di costruire, con spontanea stima ed affetto reciproci.

Grazie al Prof. Gargiulo e al Prof. Freyrie, baluardi di esperienza e di rigore.. esempi di costanza ed applicazione.. solidissimi riferimenti professionali, per avermi permesso di crescere.

Grazie a Rodolfo... grandissimo amico mio... per la saggezza e per gli insegnamenti sul campo; grazie per il sostanziale sostegno morale e pratico!

Alla mia famiglia celeste e terrena.. un grazie dal più profondo del cuore!