

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

METODOLOGIE DI RICERCA NELLE MALATTIE VASCOLARI

Ciclo XXI

Settore scientifico disciplinare di afferenza:
Area 06 – Scienze mediche – Med/22 Chirurgia vascolare

ISCHEMIA CEREBRALE SILENTE
IN CORSO DI TEA CAROTIDEA:
RICERCA DI UN NUOVO MARKER DI DANNO NEUROLOGICO

Presentata da: Dott. ODERO Andrea, matr 265399

Coordinatore Dottorato

C.mo Prof. STELLA Andrea

Relatore

C.mo Prof. ODERO Attilio Nicolò

INDICE

INTRODUZIONE	3
Ischemia Cerebrale in corso di TEA carotidea	7
Markers di danno ischemico e Barriera Ematoencefalica	10
Proteina S-100B	12
Enolasi Specifica Neuronale (NSE)	13
Fatty Acid Binding Proteins (FABPs)	15
Pentraxina-3 (PTX3)	19
Proteina C Reattiva (CRP-16)	21
SCOPO DELLA RICERCA	23
End Points e Campi di Applicazione	25
MATERIALE E METODI	26
Popolazione	26
Neuroimaging	31
Raccolta dei campioni	32
H-FABPs ELISA Kit	33
B-FABPs ELISA diretto – Home Made	34
PTX-3 ELISA – Home Made	35
Raccolta Dati e Analisi Statistiche	35
RISULTATI	36
DISCUSSIONE	49
BIBLIOGRAFIA	54

INTRODUZIONE

L'ictus è ad oggi la terza causa di morte nei paesi occidentali e colpisce circa 600 mila persone all'anno¹; nell'80% dei casi l'etiologia è ischemica: negli Stati Uniti le ischemie cerebrali sono responsabili di un decesso ogni tre minuti circa ². La patologia stenotante dei tronchi sovraortici è responsabile dell'ictus ischemico nel 25% dei casi. L'incidenza di malattia carotidea significativa si attesta intorno allo 0,5% nelle popolazioni di sessantenni per impennarsi al 10% negli ottuagenari ³.

Dalla sua introduzione ad opera di Eastcot nel 1952 l'intervento di tromboendarterectomia (TEA) della carotide ha avuto, negli anni, fortune alterne, delatori e detrattori, con opinioni discordi sulla sua reale utilità ed efficacia nella prevenzione primaria e secondaria dell'ictus ischemico.

Ad oggi l'intervento di TEA carotidea è considerato lo standard di riferimento per la prevenzione primaria e secondaria dell'ictus correlato alla stenosi carotidea ⁴: tale evidenza di Classe I deriva dall'esperienza maturata dai principali studi internazionali degli anni ottanta e novanta sia Europei che d'Oltreoceano.

Il NASCET (North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial)⁵ già nel 1991 ha dimostrato in pazienti sintomatici entro i sei mesi precedenti l'arruolamento e randomizzati a terapia medica che, per stenosi misurate con metodo angiografico dal 50 al 70% a due anni dalla randomizzazione il tasso di stroke era del 14,6%, mentre per stenosi superiori al 70% il rate è stato del 24,5%⁵.

ECST (European Carotid Surgery Trial)⁶ si differenzia essenzialmente dal NASCET dal metodo di misura della stenosi, utilizzato oggi con le metodiche di diagnostica non invasive ecografiche: un 50% NASCET equivale ad un 70% ECST ed un 70% NASCET equivale ad un 82% ECST.

Lo studio ha evidenziato che dal 70% di stenosi (ECST) il rischio di stroke/death a 3 anni è del 22% se non sottoposto a chirurgia. Negli stessi anni, per quanto riguarda le stenosi sintomatiche, è iniziato e interrotto perché dai risultati sovrapponibili, il Veterans Affairs Study ⁷.

I pazienti neurologicamente asintomatici sono stati studiati in tre studi internazionali: il Veterans Affairs Study⁷, l'ACAS (Asymptomatic Carotid Artery Stenosis)⁸ e l'ACST

(Asymptomatic Carotid Surgery Trial)⁹. Il MACE (Mayo Asymptomatic Carotid Endarterectomy) è stato interrotto prima del termine per l'elevato numero di infarti miocardici intraoperatori (22%)¹⁰.

Per quanto riguarda l'ACAS dopo meno di tre anni è stato interrotto in quanto il trattamento medico comportava un rischio di stroke del 11% mentre il braccio chirurgico solo del 5,1%; questo è il primo studio internazionale in cui si sia ridotta l'incidenza di stroke/death a 30 giorni al 2,3%: tale "buona condotta" è stata ottenuta mediante l'eliminazione dallo studio dei chirurghi che avessero causato uno stroke postoperatorio ¹¹.

L'ACST dal canto dei 3120 pazienti arruolati con stenosi carotidea asintomatica superiore al 60% ECST non ha dimostrato differenze significative per quanto riguarda gli outcome considerati per grado di stenosi, ma ha evidenziato beneficio a 5 anni della chirurgia rispetto al trattamento medico (6,4 vs 11,8%) e simile differenza per stroke mortale o disabilitante con incidenza di 3,5 nel postoperatorio vs 6,1% nei pazienti non operati⁹.

Tutti questi studi multicentrici randomizzati e di classe I hanno permesso di definire sia le opportunità terapeutiche mediche ¹² vs chirurgia, che le corrette indicazioni al trattamento sia in relazione alla sintomatologia neurologica che al grado di stenosi della placca che al rischio operatorio del paziente.

Con l'avvento dell'endovascolare si sono sviluppati nuovi trials sia per quanto riguarda i pazienti sintomatici (SPACE ¹³, EVA-3S¹⁴) che per quanto riguarda gli asintomatici con lo SAPPHIRE ¹⁵

Il trial SPACE (Stent Protected Angioplasty versus Carotid Endarterectomy) ha dimostrato nel 2006 la non inferiorità delle due tecniche con una percentuale di stroke pari a 6,8 per il trattamento endovascolare e del 6,3% per il trattamento chirurgico convenzionale ed il rischio a 30 giorni dalla procedura si è attestato a 6,5% vs 5,1% a favore della chirurgia: sebbene non vi siano differenze statisticamente significative, il trend positivo dei risultati dell'intervento di TEA non ha autorizzato ad equiparare i due trattamenti¹³.

L'EVA-3S (Endarterectomy versus Angioplasty Stenting in Patients with Symptomatic Severe Carotid Stenosis) pubblicato su New England Journal of Medicine nel 2006 raccoglie 527 pazienti trattati in 30 Istituti Francesi è stato sospeso per ineticità del braccio di trattamento endovascolare ¹⁴ con un rischio di nuovi eventi del 9,6% contro il 3,9% del trattamento chirurgico.

Lo SAPPHERE 2004 (Stent and Angioplasty with Protection in Patients at High Risk for Endarterectomy) ha coinvolto 334 pazienti asintomatici ed ad alto rischio randomizzati tra chirurgia e stenting protetto: è stata garantita la possibilità all'operatore di non arruolare un paziente allo stenting qualora le caratteristiche anatomiche o di placca non fossero favorevoli. Sono stati considerati ad alto rischio chirurgico i pazienti con severa cardiopatia o BPCO, paralisi laringea controlaterale, restenosi ed età >80 anni: considerando il grado di stenosi sono stati trattati pazienti con stenosi asintomatiche >80% e sintomatiche >50% (NASCET). L'incidenza di stroke ad un anno è stata del 6,2 vs 7,9% rispettivamente per lo stenting e la chirurgia; ed il rischio ad un anno è stato del 12,2 del braccio endovascolare contro il 20,1% della chirurgia: tale evidenza ha permesso di affermare la non inferiorità del trattamento endovascolare rispetto alla chirurgia introducendo come variabile anche l'infarto miocardico acuto che non è mai stato inserito negli endpoints dei precedenti studi di classe I¹⁵. Il follow up di questo studio non tiene conto delle differenze nel tempo che si possono verificare tra i due gruppi di trattamento come invece i più popolosi studi del passato NASCET, ECAS ed ACST.

È quindi possibile affermare che l'intervento di TEA carotidea rimane ad oggi il gold standard nel trattamento della stenosi carotidea sia asintomatica che sintomatica sebbene sia da preferire lo stenting per il trattamento delle lesioni nei colli ostili, per le restenosi, nei casi di paralisi cordale controlaterale e nei pazienti con elevato rischio chirurgico.

Le linee guida Italiane SICVE dividono i pazienti sia per quanto riguarda la sintomatologia che per quanto riguarda il rischio chirurgico.

Asintomatici: i pazienti con stenosi del 60% ECST possono essere tratti se il rischio chirurgico si attesta al di sotto del 3 %; dal 3 al 5% di rischio chirurgico dovrebbero essere trattati pazienti con stenosi del 75% bilaterali o complicate; per rischio chirurgico compreso tra il 5 ed il 10% non ci sono indicazioni dimostrate sull'utilità della TEA.

A differenza dei pazienti asintomatici per quanto riguarda il gruppo dei sintomatici non si pongono differenze sul maggiore o minore rischio chirurgico e l'intervento risulta sempre giustificato per stenosi serrate in caso di TIA, stroke con lesioni stabilizzate, crescendo TIA, trombosi acuta di carotide entro le sei ore. Esiti incerti permangono per stenosi comprese tra il 50% ed il 70%¹⁶.

Un terzo degli stroke perioperatori si verifica intraoperatoriamente su base emodinamica, embolica o iatrogena: la riduzione dello stroke su base emodinamica si ottiene mediante

l'impiego di shunt¹⁷, routinario o selettivo in ragione delle informazioni che il metodo di monitoraggio cerebrale fornisce sullo stato di sofferenza cerebrale. In assenza di metodi di monitoraggio, per evidenziare la sofferenza neurologica è possibile condurre l'intervento chirurgico in anestesia loco regionale (monitoraggio clinico)¹⁸.

La conduzione dell'intervento in anesetesia generale necessita di una valutazione oggettiva strumentale diretta od indiretta: la valutazione della funzionalità cerebrale diretta si ottiene mediante l'EEG (poco sensibile, molto specifico), EEG Computerizzato (elevata sensibilità bassa specificità), SEPs potenziali somatosensoriali (sensibilità 100% specificità 93%). Delle metodiche indirette fanno parte la misurazione della Stump Pressure (poco sensibile e specifica), la misurazione dei flussi in ACM mediante TDC Doppler Transcranico (TDC) che presenta sensibilità del 100% e specificità al 98% ma di difficile applicazione routinaria e la misura del flusso ematico cerebrale regionale mediante spettroscopia a raggi infrarossi (Near Infra Red Spettroscopy -NIRS)¹⁹.

Ischemia cerebrale in corso di clampaggio carotideo.

Sebbene la percentuale di complicanze neurologiche nei centri di provata esperienza sia ridotta al di sotto del 3%, questo dato rappresenta solo la punta dell'iceberg per quanto riguarda il reale rischio di complicanze neurologiche silenti che è molto più alto²⁰. L'ischemia cerebrale che si sviluppa in corso di TEA carotidea ha una duplice origine: emodinamica ed embolica in Letteratura ha un'incidenza che varia dal 5 al 26 - 33%^{21, 22} per la chirurgia e raggiunge il 37-62% in caso di PTA stent²³.

L'ischemia indotta da deficit emodinamico si manifesta tipicamente all'atto del clampaggio ed è dovuta a una ridotta perfusione o tolleranza dell'emisfero cerebrale all'ischemia. Due sono le tattiche chirurgiche per ridurre questa complicanza: lo shunting di principio oppure lo shunting selettivo²⁴. L'individuazione dei pazienti che necessitano di metodi di perfusione cerebrale temporanei è resa possibile dalla monitorizzazione dei flussi (TDC) e della perfusione cerebrale regionale (NIRS) o delle funzioni cerebrali (anestesia locale)¹⁸.

La spettroscopia NIRS rileva la saturazione dell'emoglobina presente a livello delle vene dei lobi frontali: presumendo che il metabolismo cerebrale non subisca modificazioni, ogni deflessione del valore di saturazione dell'emoglobina indica che sia in aumento l'estrazione di O₂ da parte delle cellule cerebrali secondaria alla riduzione del flusso ematico locale e quindi a sofferenza ischemica²⁵

L'utilizzo di metodi di monitoraggio è in grado di ridurre l'incidenza di danni neurologici sebbene non sia in grado di azzerarla completamente; studi clinici condotti con la monitorizzazione dei flussi in arteria cerebrale media mediante Doppler Transcranico (TCD) hanno dimostrato il passaggio di microemboli nelle fasi preoperatorie ed in corso di dissezione chirurgica e nelle prime ore postoperatorie²² anche in assenza di nuovi eventi neurologici clinici. Sono necessari circa 10 microemboli perché si possa avere una sintomatologia clinicamente evidente²⁶. Il limite del TDC risiede nel non essere in grado di definire le dimensioni dell'embolo che viene rilevato²⁵, oltre che alla poco pratica applicabilità nella routine clinica.

Il danno neurologico in corso di TEA è perciò mediato da due variabili, la prima emodinamica, individuabile e correggibile con l'utilizzo dello shunt, e la seconda, correggibile

solo in parte, rappresentata dall'embolia il cui rischio maggiore è in corso di manovre di dissezione. È stato infatti proposto il clampaggio precoce della carotide interna prima di portare a termine l'esposizione dell'intero asse²⁷ praticata da Bourke solamente in anestesia locale. Il rischio di embolia però è aumentato con l'utilizzo dello shunt²³.

Il danno neurologico è funzione della gravità e della durata dell'ischemia cerebrale indotta dall'embolizzazione, dalla bassa pressione di perfusione distrettuale in corso di clampaggio e dalla trombosi dei vasi cerebrali distali.

In corso di stroke, il focolaio ischemico o core è circondato da una zona, definita *penumbra ischemica* che risulta ancora perfusa sebbene in quantità ridotta rispetto a quanto normalmente necessario per il mantenimento dell'integrità neuronale; le cellule di questa zona, al contrario di quelle che si trovano nella parte centrale del territorio ischemico, rimangono vitali ma per un tempo limitato. La zona della penombra è in grado di riacquistare le sue funzioni in caso di riperfusione.

D'altra parte, è accertato da numerosi studi, condotti con monitoraggio TDC che nuove lesioni cerebrali compaiano in seguito a chirurgia della carotide, sebbene asintomatiche²². Tali lesioni sono state quantificate con studio RMN pre e postoperatorio con metodica diffusione/perfusione (DWI/PWI) e sembra che la loro etiologia sia principalmente embolica²⁸: dall'analisi della letteratura si evince che sia possibile identificare nuove lesioni cerebrali nel 33% dei pazienti sottoposti a TEA sebbene clinicamente asintomatici²².

Nel 2008 Schnaudigel²³ ha meta analizzato 2117 pazienti sottoposti a TEA carotidea ed a stentig con successivo controllo RMN DWI: l'analisi del tasso stroke/death è stato del 2,12 vs 3,45% a favore dell'intervento quando paragonato allo stenting ($p=0,085$). L'incidenza di nuove lesioni cerebrali omolaterali rilevate alla RMN DWI è stata rispettivamente del 10% per gli interventi di TEA contro il 37% per le procedure di PTA stenting. Inoltre la PTA ha evidenziato un tasso del 14% per nuove lesioni controlaterali rispetto al 0,01% della TEA.

Per quanto riguarda l'intervento di TEA carotidea l'unica differenza si è vista analizzando i pazienti sottoposti a shunting di principio (16% di nuove lesioni) vs quelli in cui lo shunt è stato posizionato solo dopo sofferenza cerebrale (6%) $p<0,01$.

Bendus (2006) meta-analizzando le procedure endovascolari ha evidenziato una correlazione con la quantità di mezzo di contrasto utilizzata, il tempo di fluoroscopia e la difficoltà all'incannulamento dei vasi²⁰.

Il maggior rischio sia per quanto riguarda il trattamento chirurgico che per quello endovascolare risiede nella possibile embolizzazione di detriti sia durante le manovre di cateterismo che la manipolazione chirurgica in prima istanza ma la liberazione di detriti prosegue anche nel periodo peri e post procedurale. Per quanto riguarda i tipi di stents: gli stents a celle chiuse possono prevenire in qualche modo la continua embolizzazione dalle piccole particelle fuoriuscite dalla placca fratturata nel circolo cerebrale²⁹

Quindi l'incidenza di nuove lesioni cerebrali analizzate con la RMN DWI sono maggiori con le procedure endovascolari che con la chirurgia. Inoltre la meta analisi ha dimostrato che la procedura di stenting con protezione cerebrale e utilizzo di stents a maglie chiuse riduce in modo significativo l'evenienza di nuove lesioni cerebrali; in chirurgia l'utilizzo di shunt di principio è legata ad una maggiore insorgenza di nuove lesioni.

La reale incidenza delle microembolie cerebrali è perciò sconosciuta o misconosciuta³⁰ per le capacità di recupero del tessuto danneggiato dopo il declampaggio: la apparente asintomaticità clinica è stata correlata a progressivo decadimento delle funzioni neuropsicologiche (che incidono in circa un terzo di pazienti sottoposti a TEA carotidea)³¹,³².

I test neuropsicologici riportati in letteratura portano a conclusioni controverse: Bomstein ed Antonelli Incalzi dimostrano miglioramenti dopo TEA carotidea, mentre Iddon, Pearson non dimostrano alcun miglioramento; Sinforiani e Monomen evidenziano addirittura un peggioramento ad alcuni tests³³.

È evidente come una sofferenza cerebrale comporti uno stato di infiammazione e la liberazione degli enzimi e proteine cellulari in caso di morte neuronale.

In ogni caso, il danneggiamento delle cellule cerebrali o la loro sofferenza comporta la liberazione da parte di queste di citochine ed IL-2 cui consegue uno stato di infiammazione; in caso di morte cellulare si verifica la liberazione di ioni, proteine ed enzimi cellulari: i presupposti per la ricerca di neuromarkers in chirurgia carotidea.

Markers di danno ischemico e Barriera Ematoencefalica.

Negli anni passati sono stati proposti numerosi markers neurobiochimici per la monitorizzazione delle lesioni cerebrali. Quelli maggiormente studiati sono stati la enolasi specifica neuronale (NSE), l'isoenzima BB della creatin Kinasi, la proteina 14-3-3, la proteina basica mielinica, la proteina tau, la poliammide, le proteine gliali fibrillari acide e la proteina S100B. Tali markers sono comunque stati generalmente testati ed individuati in pazienti con stroke già in atto o traumi cerebrali^{34,35,36}.

In numerosi studi la ricerca di un marcatore di morte cellulare non è andata a buon fine per la presenza della membrana ematoencefalica integra che non ha permesso il passaggio in circolo del metabolita ricercato^{33,37}.

La scoperta della barriera ematoencefalica è opera di Ehrlich nel 1880 che ha evidenziato come l'anilina permeasse tutti i tessuti tranne il cervello e nel midollo spinale³⁸. L'istologia dimostra che i vasi superficiali e di diametro maggiore hanno le giunzioni intracellulari più lasse e quindi sono più permissive al passaggio molecolare mentre i vasi piali e quelli intraparenchimali hanno un endotelio con le tight junction più serrate e pertanto una maggiore funzione di barriera³⁷.

Numerosi esperimenti hanno dimostrato che una quota delle proteine esistenti solo nel liquor passano nel sangue ad ogni distruzione dell'integrità della barriera ematoencefalica e viceversa anche le proteine del sangue di maggiori dimensioni (albumina) si riversano tra i neuroni. Pertanto la determinazione sierica di proteine presenti esclusivamente nel liquor rappresenta un metodo non invasivo per la valutazione dell'integrità della barriera ematoencefalica stessa³⁷. Marchi nel 2004 ha evidenziato due differenti scenari:

- a. Iniziale danno alla cellula neuronale o gliale con barriera ematoencefalica integra comporta un lento rilascio in circolo della sostanza (proteina, membrana cellulare o enzima) che è dipendente dalle dimensioni molecolari fino a quando non viene danneggiata anche la membrana e tutta la sostanza viene rilasciata in circolo;
- b. Danno principalmente a carico dell'integrità della membrana con rapida morte neuronale e rapida commistione delle proteine sieriche con quelle di pertinenza cerebrale ³⁷.

Nelle neoplasie, nell'ipertensione, nella demenza, nell'epilessia, nelle encefaliti, nella sclerosi multipla e nel trauma la funzione di barriera viene meno e l'epitelio vascolare assomiglia a quello della periferia con aumento del trasporto vescicolare ed aumento della permeabilità delle tight junction che risultano anomale: a tale evento consegue maggior trasporto di sostanze in entrambe le direzioni che innescano una serie di reazioni a catena che comportano la progressione del danno neuronale ³⁷.

La possibilità di determinare o modulare "l'apertura" della barriera ematocefalica permette di veicolare all'interno dei neuroni dei farmaci, che a barriera integra non potrebbero mai entrare in contatto con i neuroni, che permettano di ridurre il danno stesso ³⁹; nell'insulto ischemico, il tempo che intercorre tra l'insulto neuronale e la morte irreversibile delle cellule garantirebbe una potenziale finestra terapeutica per interventi con farmaci neuroprotettivi.

Qualora la barriera si aprisse appena dopo l'occlusione arteriosa ⁴⁰ si avrebbe un'irripetibile occasione per somministrare farmaci che sono normalmente impermeabili alla membrana (come il Nerve Growth Factor) prima della morte cerebrale: la possibilità di determinare tale momento con un test di laboratorio apre chiaramente infinite strade alla terapia.

Secondo Marchi et al. il neuro-marker ideale deve avere le seguenti caratteristiche: 1) irrintracciabile nel sano; 2) deve essere alterato in presenza di danno neuronale; 3) la sua concentrazione sierica deve essere correlata all'estensione del danno.

In numerosi studi si è tentato di correlare la gravità dei sintomi di numerose patologie con la presenza di promettenti proteine di derivazione cerebrale nel circolo ematico: tali studi non hanno avuto successo per la presenza della barriera funzionante³⁷. Mentre invece, per altre patologie che abbiano comportato il danneggiamento anche della barriera tali markers sierologici aumentano di concentrazione anche nel siero ⁴¹.

Negli ultimi anni in Letteratura sono comparsi numerosi articoli che valutano il danno neurologico clinico e subclinico in corso di TEA carotidea sia dal punto di vista della neuroimaging²⁰ analizzando i risultati di più o meno complessi esami neuropsicologici, ma è acquisizione solo recente che possa essere identificato, valutato e quantificato anche biochimicamente.

In questo caso solamente pochi studi hanno correlato la possibilità di danno neurologico in corso di TEA carotidea con un marker biochimico: nel 2001 Connolly ⁴² ha evidenziato un aumento dei valori della proteina S 100 dopo TEA carotidea. Analogo lavoro è stato condotto nel 2003 dal gruppo di Benedetti Valentini e Coll. ³⁰ mediante l'analisi delle

concentrazioni sieriche della proteina S100 β che ha evidenziato un innalzamento dei valori di S100 in assenza di alterazioni ai test psicologici. Nel 2007 Palombo ha studiato la proteina S100, la NSE e il marker di infiammazione IL-6 randomizzando i pazienti allo shunt o meno: non ha evidenziato alcuna differenza tra i due gruppi né dal punto di vista biochimico né dal punto di vista neuro psicometrico ma non ha condotto uno studio di neuroimaging³³.

Per quanto riguarda l'ischemia cerebrale silente da microembolizzazione e da ischemia da clampaggio, in assenza di danno della barriera ematoencefalica, in corso di chirurgia carotidea l'optimum risiede in proteine che abbiano una struttura molecolare tale da poter attraversare anche la barriera ematoencefalica integra: tali proteine appartengono alla promettente famiglia delle Fatty Acid Binding Proteins: le Brain ed Heart FABPs.

Proteina S100b:

La proteina S100b è stata da tempo studiata ed identificata come marker di danno nervoso centrale.

Iniziali esperienze hanno riportato che la proteina S100 fosse presente in abbondanza nel SNC; studi più recenti hanno dimostrato che questa proteina, nella sua isoforma S100A1 e S100B è presente anche in tessuti differenti dal sistema nervoso centrale come il cuore o l'aorta⁴³.

La proteina S100, infatti, è una proteina dimerica legante il calcio composta da due subunità immunologicamente distinguibili, la α e la β . È la forma dimerica $\beta\beta$ ad essere abbondante a livello cerebrale: tale dimero è denominato S100B⁴⁴. La S100 β è prodotta dalle cellule gliali ed in basse concentrazioni ha effetto trofico sui neuroni, l'aumento della concentrazione locale è dovuta ad un evento citotossico a carico delle cellule gliali o neuronali⁴⁵. L'aumento dei livelli di proteina S100 β nel fluido cerebrospinale e nel siero sono correlati alla gliosi ed alla morte degli astrociti e perciò è stata utilizzata come marker nello studio dell'ictus ischemico acuto⁴⁶, oltre che nell'arresto cardiaco e in cardiocirurgia⁴⁵.

La proteina S100B, nel soggetto normale e neurologicamente asintomatico, è presente in concentrazioni molto basse nel siero periferico con valore massimo di 0,12 $\mu\text{g}/\text{L}$ ^{47,48}. La subunità 100 β è misurabile, se presente, sia nel sangue arterioso che venoso, ed è poco influenzata dall'emolisi del campione, inoltre rimane relativamente stabile anche dopo alcune

ore dal prelievo. La sua emivita in vivo è relativamente breve, pari a 198 minuti: tale caratteristica la rende un marker affidabile di danno neurologico anche in caso di emergenza⁴⁹.

È stata considerata un marker quantitativo dell'estensione del danno del sistema nervoso centrale ⁵⁰ oltre che un indice prognostico nello stroke ischemico⁵¹.

È dimostrato che la proteina S100B è direttamente correlata con l'integrità della BE piuttosto che al danno encefalico: il fatto che la S100B sia espressione di apertura delle giunzioni della BE è stato dimostrato mediante la rilevazione in circolo in soggetti che sono stati sottoposti a ripetuta succussione cerebrale (boxers, joggers) e non si innalza per sports statici³⁷.

In letteratura è stata già studiata la proteina S100β nella chirurgia della carotide dal gruppo di Benedetti Valentini³⁰ un gruppo di 28 pazienti sottoposti a TEA della carotide è stato studiato tramite sei prelievi ematici atti alla determinazione della proteina S100β e, nella fattispecie, nel preoperatorio, al clampaggio, 10 minuti dopo il clampaggio, al declampaggio, nel postoperatorio a 24-48 ore e a 11-12 settimane dalla TEA carotidea. L'aumento dei valori basali è stato correlato con anamnesi di sintomatologia neurologica preoperatoria nel 90% dei pazienti con anamnesi di TIA o Stroke pregresso (p=0.005), riduzione del punteggio al mini mental state (p=0.02), e evidenza TC di lesioni encefaliche stabilizzate (p=0.03). Aumento dei valori di concentrazione della S100β in corso e dopo chirurgia della carotide sono stati rilevati nel 39% dei soggetti sottoposti a TEA, in assenza di segni neurologici di eventi all'esame obiettivo: gli Autori ipotizzano che la causa dell'innalzamento dei valori di S100β sia dovuta ad un deficit di compenso emodinamico o metabolico nelle aree di penumbra ischemia, in corso di clampaggio. Non sono state valutate eventuali correlazioni tra l'innalzamento dei valori della S100β e lesioni cerebrali identificabili mediante neuroimaging né con gli effetti cognitivi a lungo termine.

Enolasi Specifica Neuronale (NSE):

L'enolasi (2-fosfo-D gliceropiruvato idratasi) è un enzima glicolitico che converte il 2-fosfoenolglicerato in fosfoenolpiruvato; funzionalmente è una proteina attiva come eterodimero formato dall'associazione di tre subunità alfa, beta e gamma ⁵²: gli isoenzimi γγ e

$\alpha\gamma$ sono stati considerati specifici per cellule cerebrali fino alla completa comprensione che l'isoenzima $\alpha\gamma$ ha una provenienza prettamente non neuronale: solo l'isoenzima $\gamma\gamma$ può essere considerata l'enolasi specifica neuronale (NSE) ⁵³.

Negli scorsi anni l'NSE è stato considerato un marcatore di danno neurologico in quanto rilasciata dai neuroni in corso di ischemia.

Testato come marker di sofferenza ischemica in corso di TEA carotidea ha avuto fortune alterne: a seconda della condotta anestesiológica (anestesia generale vs locale) ha dimostrato un picco alla seconda ora dopo il clampaggio nei pazienti sottoposti a anestesia generale ⁵⁴.

Secondo Falkensammer (2008) l'Enolasi Specifica Neuronale non risulta affidabile come marker di ischemia in corso di TEA carotidea sebbene possa essere correlata se testata insieme alla S100B al declino delle condizioni psicologiche nel postoperatorio^{55, 56}

Secondo Palumbo è un marker di ischemia affidabile ma nella sua serie di pazienti non vi sono stati spostamenti dei valori medi tra i pazienti sottoposti a shunt e quelli operati senza shunt ³³.

Le maggiori concentrazioni di NSE si riscontrano nella sostanza grigia mentre la sostanza bianca come fascio piramidale e corpo calloso ne contengono una minor percentuale. Risulta pertanto un indicatore specifico per il danno della sostanza grigia.

La NSE ($\gamma\gamma$) è, d'altra parte, contenuta anche negli eritrociti e nelle piastrine tale fatto rende conto della necessità della perfetta purificazione dei campioni di siero da analizzare una modesta emolisi pari al 2% innalza i valori della enolase sierica sNSE di 5 volte per questa caratteristica l'NSE si presenta poco maneggevole per avere funzioni di marker di danno ischemico ³⁶.

Il secondo limite alla sua utilizzazione come marker ischemico cerebrale è che l'NSE è poco specifica per la sostanza bianca cerebrale, che può andare incontro a lesione tanto quanto la sostanza grigia ⁵⁷.

Non è quindi da ritenere un marker di rilevazione di ischemia cerebrale affidabile e maneggevole.

Fatty Acid Binding Proteins FABP:

Le FABPs (Cytoplasmatic Fatty Acid Binding Proteins) sono piccole proteine di soli 15-kDa identificate inizialmente in tessuti con un attivo metabolismo degli acidi grassi come cuore e fegato ⁵⁸. Ad oggi ne sono state identificate diciannove isoforme; inizialmente sono stati attribuiti i nomi dai tessuti da cui erano state isolate per la prima volta, più recentemente sono state numerate.

La loro funzione principale è quella di facilitare il trasporto intracellulare di acidi grassi a lunga catena, ma le loro funzioni secondarie sono anche quelle di regolare l'espressione genica e la protezione della cellula (principalmente studiata quella di derivazione miocardica) dall'azione detergente degli acidi grassi in corso di ischemia ⁵⁸. La trascrizione delle FABPs è regolata principalmente dal metabolismo dei lipidi intracellulari ed indotta da stimoli patofisiologici come l'ischemia⁵⁹, l'allenamento o farmaci ipolipemizzanti⁶⁰

La prima ad essere stata identificata è stata la H-FABP rilasciata dal miocardio danneggiato dal meccanismo dell'ischemia/riperfusion nel 1988 ad opera di Glatz; successivamente questa proteina è stata studiata per il monitoraggio del danno miocardio in corso di ischemia. Le successive sono state identificate nei diversi mediante anticorpi policlonali con alcune cross reattività tra tessuti differenti: recentemente lo sviluppo di anticorpi monoclonali ha permesso di meglio identificare l'origine delle proteine ⁶¹.

Il Sistema Nervoso Centrale esprime sia le B-FABP, tessuto specifiche, che discrete quantità anche di H-FABP (cosiddette cardiache). Le B-FABP sono presenti solamente a livello cerebrale mentre le H-FABP presenti a livello cerebrale hanno una concentrazione in $\mu\text{g/g}$ di tessuto a secco di circa 20 volte inferiore di quelle presenti a livello miocardico (media di 27,61 $\mu\text{g/g ww}$ vs 563 $\mu\text{g/g ww}$). In ogni parte di encefalo analizzata da Pelsers ⁶² H-FABS è espressa circa 10 volte di più che la B-FABP

La sofferenza ischemica cerebrale rilascia in circolo sia la B-FABP che la H-FABP.

In parallelo all'attuale interesse nel determinare biomarkers neuronale come le S100 β , l'enolasi specifica neuronale, le proteine basiche mieliniche e le proteine fibrillari acide nei pazienti con trauma cerebrale, stroke od altro insulto cerebrale^{63,64,51,65,66} è in forte espansione allo studio delle FABPs.

Per quanto riguarda l'encefalo l'andamento delle concentrazioni plasmatiche di B-FABPs e di H-FABPs viene considerato, qualora siano strettamente associate, predittivo di danno cerebrale: entrambe le proteine sono presenti a tale livello con differenti concentrazioni in ogni differente area cerebrale^{67,68}.

Nei soggetti sani non esiste un valore rilevabile di B-FABP.

L'innalzamento delle due proteine è stato correlato, in modo più specifico della S100B, a danno cerebrale. Come dimostrato da studi comparativi su moderati traumi cerebrali ove la B-FABP era risultata elevata nel 68% e la H-FABP nel 70% confrontata con la S100B elevata solo nel 45% e la NSE del 51%; la terapia elettroconvulsiva ha innalzato la B-FABP nel 6% dei pz, la H-FABP nel 17%, mentre la S100B si è innalzata solo nello 0,4% dei pz⁶⁷: perciò nonostante vi siano attualmente limitati dati in letteratura su tali proteine queste risultano essere maggiormente sensibili e specifiche di danno cerebrale rispetto all'S100B ed all'NSE nello studio dello stroke e dell'ischemia cerebrale⁶⁹.

Zimmermann-Ivol⁶⁹ hanno valutato 22 pazienti con diagnosi di ammissione in pronto soccorso di Stroke e 22 controlli determinando solamente le H-FABP che hanno mostrato una rapida ascesa con picco introno alla 12-24 ora.

Wunderlich MT e Pelters⁷⁰ hanno studiato 42 pazienti entro le 6 ore dall'insorgenza di stroke. Il cutoff per H-FABP è stato mantenuto a 6 microlitri e per B-FABP è stato al limite di determinazione della metodica di 5 microlitri poiché la proteina non è identificabile nei soggetti sani: con questi cutoff si è identificato il 45 e 52% dei pazienti per la Heart & Brain FABPs. Entrambe le proteine hanno mostrato un picco alla 2-3 ora dal sintomo mantenendosi elevate per 5 giorni dopo. Le maggiori concentrazioni di H si sono evidenziate per infarti cerebrali di maggior dimensione (150 ml), mentre piccoli infarti lacunari o sottocorticali di 1-mL sono correlati ad un elevata concentrazione di B FABP nel siero.

Dal 1994 al 2000 sono state introdotte nella pratica clinica solo dieci nuove proteine: la H-FABP è un esempio di come sia difficile introdurre in pratica un nuovo marker validato; al contrario dell'infarto miocardico acuto non esiste ad oggi una proteina che sia in grado di identificare un danno cerebrale⁷¹.

La rapidità con cui H-FABP è rilasciata in circolo dopo IMA: 3 ore con picco di concentrazione a 4-6 ore, e ritorno alla normalità a 24 ore. Nei pazienti non trattati il ritorno ai valori normali è posticipato di 8-36 ore. Una rapida riperfusione coronarica con stent o

terapia trombolitica è in grado di limitare la grandezza dell'infarto: un marker plasmatico è uno strumento utile in associazione alla clinica ed alle modificazioni elettrocardiografiche⁷¹.

H-FABP sono presenti in una vasta varietà di tessuti: maggiormente nei miocardiociti (563 µg/g ww), ma sono state rilevate anche nel cervello, nella placenta⁷² e nelle cellule del tubulo distale renale^{71, 73}. Piccole quantità di H-FABPs sono presenti anche nei muscoli striati e rilasciati in seguito a trauma⁷⁴

La H-FABP è escreta a livello renale: de Groot ha elaborato formula utilizzando la clearance individuale per correggere gli effetti di insufficienza renale⁷⁵.

LABORATORIO: sono stati sviluppati numerosi metodi (la maggior parte in commercio) per la quantificazione plasmatica e sierica delle H-FABP: mediante l'utilizzo degli anticorpi mono e policlonali e tests assay immunoistochimici e immunologici: fino alla realizzazione sperimentale di un sensore per il monitoraggio continuo dei valori per la diagnosi ed il monitoraggio dell'infarto miocardico^{63,61,76}.

Per quanto riguarda la determinazione delle B-FABP l'unico Autore che ha descritto un metodo di quantificazione per la B-FABP nel siero è Pelsers la metodica è descritta nell'articolo pubblicato su *Clinical Chemistry* nel 2004⁶² dopo aver ottenuto per centrifugazione da parenchima cerebrale la proteina ne ha immunizzato dei topi e ne ha estratto degli anticorpi policlonali contro BFABP. Ha così sviluppato un test immunoenzimatico ELISA ed ha potuto creare una curva di taratura con diverse concentrazioni di proteina.

Ad oggi l'industria mette a disposizione solamente degli anticorpi policlonali contro Human B-FABP: non viene fornito alcun test ELISA premontato che permetta la quantificazione della proteina nel siero.

I limiti di riferimento delle H-FABP sono stati studiati e con il 99% di intervallo di confidenza (± 3 DS) sono stati fissati a 6µg/L⁶³; i limiti della B-FABP non sono definiti in quanto questa proteina non può essere identificata nel sangue circolante nei soggetti sani⁶⁷.

Attualmente l'unico limite all'aumento della concentrazione dei marcatori bioumorali nel sangue periferico risulta essere la curva di rilascio in circolo e la permeabilità della barriera emato-encefalica, della cui integrità risentono maggiormente gli altri markers identificati precedentemente³⁷. Utilizzare le FABPs come markers significa ricercare proteine di

membrana, relativamente piccole che, in caso di lesione di un parenchima o tessuto, venga rilasciata abbastanza rapidamente, diffondendo anche a livello della barriera ematoencefalica: il picco plasmatico che ogni isoforma raggiunge nel sangue periferico è funzione sia della quantità del danno, dal tempo trascorso dall'insulto e del volume di distribuzione che l'isoforma ha al di fuori del comparto extravascolare. Le dimensioni relativamente piccole di queste proteine permettono infatti la diffusione anche attraverso una barriera ematoencefalica pressoché intatta ⁶³.

PENTRAXINA-3: PTX3

La molecola dell'infiammazione maggiormente nota è la CRP-16 (Proteina C Reattiva) che appartiene alla famiglia delle pentraxine, proteine caratterizzate dalla struttura pentamerica. Negli ultimi anni sono state scoperte numerose proteine appartenenti alla famiglia tra le quali la PTX3: ha omologie con la CRP all'estremità C-terminale ma differisce da questa all'estremità N-terminale.

L'espressione della PTX3 è attivata dallo stimolo infiammatorio: TNF, IL-1 e Lipopolisaccaride (LPS). È prodotta da numerosi tipi di cellule tra le quali i monociti/macrofagi, le cellule endoteliali, i fibroblasti, ma non gli epatociti che sono produttori di CRP ⁷⁷. Nell'immunità innata si lega alla frazione C1q e attiva o inibisce la via classica del complemento ⁷⁸: numerosi studi hanno evidenziato che il suo ruolo sia a livello locale il medesimo svolto dalla CRP a livello sistemico ⁷⁹.

La PTX3 è in grado di interferire con la stabilità delle placche mediante il legame al FGF2 (Fibroblast Growth Factor): infatti il FGF2 ha un ruolo chiave nella induzione, proliferazione, migrazione sopravvivenza delle SMC vascolari e nell'induzione e nella crescita eccessiva delle SMC nelle placche ⁸⁰. Inoltre le foam cells sono in grado di stimolare l'espressione della PTX3 nelle placche aterosclerotiche generando infiammazione acuta ⁸¹. Quindi per quanto riguarda il processo aterosclerotico la pentraxina è implicata nel processo con molti meccanismi: interazione con le lipoproteine modificate (oxLDL), formazione di foam cell ed attivazione della cascata del complemento⁸².

I livelli di pentraxina3 sono elevati in pazienti con malattie cardiovascolari e valori elevati nella popolazione generale sono considerati predittivi di malattia cardiovascolare⁸¹.

Rolph e Coll hanno evidenziato nel 2002 la presenza di PTX3 in specimen prelevati in corso di TEA carotidea (non presente invece in arterie mammarie interne sane) ed hanno quindi supposto che la PTX3 sia coinvolta nel processo infiammatorio implicato nella aterosclerosi⁷⁷.

Nel 2000 è stato dimostrato come la PTX3 in qualità di molecola dell'infiammazione si innalzi nei sieri di pazienti con infarto miocardico acuto⁸³.

La PTX3 nel soggetto sano ha valore di $0,99 \pm 51$ ng/ml⁸³, il cut-off è comunemente conderato pari a 2 ng/ml; in condizioni patologiche come infezioni, autoimmunità e degenerazione cellulare i valori di PTX3 raggiungono i 200-800 ng /mL.

Il primo studio chirurgico condotto sull'andamento della PTX3 dopo chirurgia è basato su pazienti sani donatori di rene: i valori di CRP sono aumentati di 80 volte e lo stesso hanno fatto i valori di PTX3 con un aumento di 70 volte ed un picco al terzo giorno ⁸⁴.

La PTX3 è stata anche studiata come indice di infiammazione in cardiocirurgia da Kunes 2007⁸⁵ che ha evidenziato un incremento significativo dei valori di PTX3 pre e post operatori con un picco massimo alla prima giornata dell'intervento: i pazienti operati in CEC hanno evidenziato un maggior picco post operatorio ed un elevazione più pronunciata nel tempo.

Ad oggi non sono presenti altri studi che correlino i valori di PTX3 pre e post operatori; non sono mai stati condotte analisi dell'andamento delle pentraxine in chirurgia carotidea.

PROTEINA C REATTIVA (CRP-16)

La proteina C reattiva (CRP-16) è il capostipite delle proteine dell'infiammazione costituita da 5 catene polipeptidiche, ciascuna formata da 206 aminoacidi con un peso totale di 105 kD. Scoperta nel 1930 e così chiamata per la capacità di legare e far precipitare il polisaccaride C dello pneumococco⁸⁶: tale legame avviene tra i residui di fosfatidilcolina presenti nel polisaccaride C e la CRP-16. La PCR lega anche altre molecole, fosfolipidi, lipoproteine plasmatiche, o membrane cellulari danneggiate.

La CRP-16 è principalmente prodotta dagli epatociti ma anche dalle cellule endoteliali nelle placche aterosclerotiche⁸⁷.

In seguito ad un insulto o ad una noxa patogena la concentrazione di CRP-16 aumenta dopo 6-12 h e raggiunge i livelli massimi entro 48 ore. Al cessare del danno i valori rientrano nella norma entro 96 ore.

Dopo un intervento chirurgico, un IMA od uno stroke la CRP-16 può raggiungere i 300mg/l. Recenti studi indicano come la CRP-16 sia implicata nella genesi dell'aterosclerosi inducendo l'espressione di alcune molecole di adesione vascolare come la E-selectina oltre a stimolare una down regulation della sintesi dell'ossido nitrico ed incrementare la sintesi di endotelina 1. Numerosi studi scientifici hanno dimostrato come la CRP-16 possa avere una valenza prognostica e venga considerato un fattore di rischio indipendente nella valutazione del rischio cardiovascolare rispetto ai tradizionali⁷⁷.

I risultati del Physician's Health Study, effettuato su 22701 uomini, hanno evidenziato come il rischio di IMA e di ictus fosse correlato alla concentrazione plasmatica di CRP-16⁸⁸ (inserisci tabella 2) con un OR di 1,7 per valori di CRP-16 compresi tra 0,56 e 1,14 e OR di 1,9 per valori > 1,15.

Anche Hashimoto ha dimostrato una correlazione tra i valori di CRP-16 e la presenza di stenosi carotidea nei paziente con diabete mellito (in assenza di DM non vi è correlazione significativa). Tale evidenza è stata associata alla presenza di uno stato di infiammazione che promuove la progressione della aterosclerosi carotidea⁸⁹.

In altri studi i livelli di CRP-16 sono stati considerati dei fattori di rischio per progressione dell'IMT, la comparsa di stenosi carotidea e l'insorgenza di ictus⁹⁰. La prevenzione

cardiovascolare con statine e aspirina potrebbe agire come evidenziato da alcuni studi sulla riduzione del colesterolo e dello stato di infiammazione totale^{90,88}.

L'aterosclerosi è una malattia caratterizzata dal deposito di lipidi e dalla contemporanea presenza di un processo infiammatorio che avvia e precipita le ultime fasi aterotrombotiche. Macrofagi e linfociti T sono presenti nella placca e nella parete vasale, da queste cellule derivano una serie di enzimi che rendono instabile l'impalcatura collagenica della placca e dall'altra le citochine ad azione pro infiammatoria che a loro volta incrementano l'espressione di alcune proteine della fase acuta, quali la CRP-16 che viene prodotta dal fegato, oltre al fibrinogeno e molecole di adesione leucocitari⁹⁰.

Nuove ricerche stanno evidenziando come l'associazione tra CRP e aterosclerosi sia ancora più complessa in quanto la CRP possa direttamente alimentare l'aterosclerosi infatti la riduzione dei valori di CRP è in grado di ridurre l'estensione del tessuto necrotico nell'infarto miocardico nei ratti⁹¹

L'American Heart Association (AHA) nel 2003 ha pubblicato nelle linee guida l'opportunità di determinazione della PCR quale marcatore di flogosi come strumento aggiuntivo nella determinazione del rischio cardiovascolare ⁹²: i valori decisionali sono: basso rischio < 1 mg/l, intermedio 1-3 mg/l, elevato >3 mg/l (classe II a, livello B).

Pertanto il razionale dell'analisi dei valori di CRP-16 nei pazienti sottoposti a chirurgia carotidea risiede sia nell'identificazione dell'infiammazione prodotto dall'atto chirurgico; inoltre secondo la Letteratura uno stato di attivazione infiammatoria potrebbe essere già in qualche modo presente prima dell'intervento chirurgico.

SCOPO DELLA RICERCA

Questo studio monocentrico osservazionale ha come scopo l'identificazione e la quantificazione del danno neurologico cerebrale in corso di TEA carotidea da microembolizzazione o ipoperfusione e la sua correlazione con markers bioumorali circolanti nel sangue periferico. Lo studio è di tipo primario osservazionale e non ha lo scopo di alterare in alcun modo la prognosi od il trattamento dei pazienti arruolati.

La ricerca si applica ai pazienti affetti da stenosi carotidea con indicazione chirurgica e si sviluppa sul piano clinico, strumentale (neuroradiologico) e biochimico ed implica la raccolta e lo stoccaggio di sangue periferico.

La ricerca si è articolata sul piano clinico, chirurgico, neuro-radiologico e laboratoristico.

Clinico: analisi e raccolta dei fattori di rischio preoperatorio, anamnesi farmacologica e neurologica.

Chirurgia della carotide: Tromboendoarterectomia (TEA) della carotide interna in pazienti affetti da stenosi con indicazione chirurgica (asintomatici >80% ECST, sintomatici >65% ECST).

Neuroimaging preoperatorio e postoperatorio: studio del parenchima cerebrale mediante RMN encefalo con acquisizione diffusione/perfusione per la valutazione di aree di ischemia pregressa silente o aree di penumbra ischemica e confronto con lo stato postoperatorio (24 ore) per l'identificazione di nuovi eventi.

Identificazione del biomarker di danno neuronale che deve presentare le seguenti caratteristiche: assenza nel soggetto sano, organo specificità, a rapida comparsa nel siero in seguito ad insulto, breve emivita. La metodica sviluppata deve avere contenuti costi di rilevazione, sensibilità e specificità elevate, riproducibilità e standardizzazione della procedura (ELISA).

Le sub unità B(rain) e H(eart) delle fatty acid binding preteins si sono dimostrate in letteratura dei validi biomarkers di danno neurologico.

Stress Chirurgico: valutazione e quantificazione dello stress chirurgico e dell'infiammazione conseguente a TEA della carotide mediante dosaggio delle proteine dell'infiammazione CRP-16 (preteina C reattiva) e PTX3 (Pentraxina 3) per identificare l'attivazione

dell'infiammazione sistemica e locale preoperatoria e postoperatoria e correlazione con il quadro clinico e strumentale di neuroimaging.

Creazione di un metodo HOME MADE per la determinazione dei valori di B-FABP circolanti su siero.

Studio dei valori basali delle fatty acid binding proteins in soggetti sani, sottoposti a intervento di chirurgia vascolare venosa (controllo negativo) e determinazione in pazienti con sicuro danno cerebrale (postoperatorio neuro-chirurgia).

Correlazione degli andamenti dei valori del biomarker identificato con la condotta chirurgica e con gli eventi intraoperatori di sofferenza cerebrale (monitorizzazione NIRS) shunting, tempi di clampaggio, angioplastica mediante patch; eventuali eventi cardiaci intraoperatori.

Correlazione dell'andamento dei biomarkers B e H FABPs e delle PTX3 e CRP con il quadro clinico neurologico e con la RMN postoperatoria.

End Points e Campi di Applicazione

Gli endpoints sono quindi la determinazione mediante neuroimaging di danno cerebrale; la creazione di una nuova metodica ELISA home made per la determinazione del valore delle B-FABPs; la validazione di H e B-FABPS, PTX3 e PCR come biomarkers in chirurgia carotidea; correlazione tra i valori di questi biomarkers, la sintomatologia ed il quadro RMN sia preoperatoria che postoperatorio.

I valori di PCR e PTX3 nei medesimi sieri raccolti hanno lo scopo di identificare lo stato di infiammazione sistemico e neurologico pre e post-operatorio.

I campi di applicazione teorica identificati sono i seguenti:

- Studio della sintomaticità/asintomaticità con metodica non radiologica del paziente con placca carotidea a rischio e suo follow up nel tempo.
- Studio comparativo dei pazienti sottoposti a TEA carotidea vs stenting.
- Follow up del paziente sottoposto a TEA carotidea/ stenting nel tempo.
- Miglioramento della tecnica operatoria.
- Confronto tra diversi operatori.
- Valutazione degli eventi avversi correlati all'atto chirurgico.
- Studio di farmaci o fattori con proprietà neuroprotettive in corso di chirurgia carotidea o cardiaca.
- Chirurgia coronarica.
- Cardiologia.
- Neurologia d'urgenza e stroke units.
- Neurochirurgia.

MATERIALI E METODI

Popolazione

Lo studio ha ricevuto l'approvazione del Comitato Etico (ASL Milano 2 – Melegnano - Mi) nel Dicembre 2006 ed ha avuto lo start up nel gennaio 2007. Tutti i pazienti per poter entrare nello studio hanno firmato il consenso informato.

Tutti i pazienti arruolati sono giunti all'osservazione presso l'U.O. di Chirurgia Vascolare 1 dell'IRCCS - Istituto Clinico Humanitas di Rozzano- Milano (Dott. PL.Giorgetti).

I criteri di arruolamento sono così riassunti:

Stenosi carotidea > 65% ECST sintomatica

Stenosi carotidea > 80% ECST asintomatica

Firma del consenso informato da parte del paziente o del legale rappresentante.

Età superiore ai 50 anni.

Se paziente neurologicamente instabile in assenza di evidenza RMN/Tc di sanguinamento.

I pazienti sono stati esclusi o sono usciti dallo studio qualora:

Recente trauma cerebrale od intervento neurochirurgico.

Evidenza RMN di sanguinamento acuto

Assenza o ritiro del consenso informato da parte del paziente o legale rappresentante.

Sono stati compresi nello studio i pazienti neurologicamente instabili (Crescendo TIA, impending stroke e stroke acuto).

I pazienti neurologicamente asintomatici ma con lesione ischemica rilevata dalla RMN preoperatoria o postoperatoria sono considerati positivi per ischemia recente al fine della correlazione ai valori di biomarker.

La popolazione complessivamente arruolata nello studio consiste in 98 pazienti con diagnosi di stenosi carotidea sia sintomatica che asintomatica con indicazione al trattamento chirurgico.

27 pazienti sono stati eliminati dallo studio per revoca del consenso informato, deterioramento dei campioni di siero nella sieroteca, perdita in laboratorio del prelievo pre o postoperatorio (27 RMN preoperatorie e 13 RMN DWI postoperatorie).

Quindi la popolazione generale valida ai fini dello studio che abbiamo considerato è costituita da 71 pazienti con sierologia completa, 57 le RMN preoperatorie e 41 le RMN DWI postoperatorie.

Tutti i pazienti oggetto dello studio sono stati sottoposti ad intervento chirurgico di tromboendoarterectomia (TEA) carotidea con monitoraggio transtecale della saturazione di O₂ mediante Near Infrared Spettroscopy (NIRS).

Sono stati arruolati 2 pazienti sottoposti a PTA Stent carotideo per restenosi.

Sono stati arruolati 5 studenti volontari sani come controlli negativi.

Abbiamo arruolato anche 4 pazienti sottoposti a chirurgia venosa in anestesia spinale presso l' U.O. di Chirurgia Vascolare 1 come controlli negativi e per controllo degli indici di infiammazione nel pre e nel postoperatorio.

In collaborazione con l'U.O. di Neurochirurgia (dott. Rodriguez y Baena) IRCCS – Humanitas Rozzano sono stati arruolati 4 pazienti in esiti di intervento neurochirurgico per emorragia cerebrale come controlli positivi.

Le caratteristiche della popolazione (71 pazienti) sono riassunte in Tabella 1; la distribuzione del campione per sesso è descritta in Figura 1:

I pazienti sintomatici entro 6 mesi per un evento cerebrale sono stati 17, tale dato si riduce a 7 considerando la sintomatologia recente (7 gg).

L'età media della popolazione è stata di 72,8 anni ($\pm 7,8$) Figura 4

I pazienti sottoposti ad intervento di TEA carotidea destra in 34 casi e sinistra in 37: la arteriorrafia con sutura diretta è stata confezionata in 24 pazienti (35%) mentre nel 65% dei pazienti (45) è stata praticata un'angioplastica di allargamento con patch in pericardio bovino Figura 2.

I pazienti che hanno evidenziato una sofferenza cerebrale che ha richiesto l'inserimento di uno shunt di Pruitt sono stati 16 (23%) Figura 3

Il tempo medio di intervento è stato di 69,5 minuti (± 15) Figura 5.

Tabella 1: Fattori di rischio popolazione studiata

Fattori di rischio	Presente		Assente	
	n	%	n	%
Anamnesi positiva Fumo	39	55%	32	54%
Fumatori attuali	18	25%	53	75%
Iperensione	63	89%	8	11%
Ipercolesterolemia	49	69%	22	31%
Diabete	16	22%	55	78%
Terapia con statina	32	46%	37	53%
Insufficienza Renale	4	5%	65	94%
Cardiopatìa	19	27%	51	73%
Sintomatologia Neurologica	17	24%	54	76%
Sintomatologia Recente	7	9,8%	64	90,2%

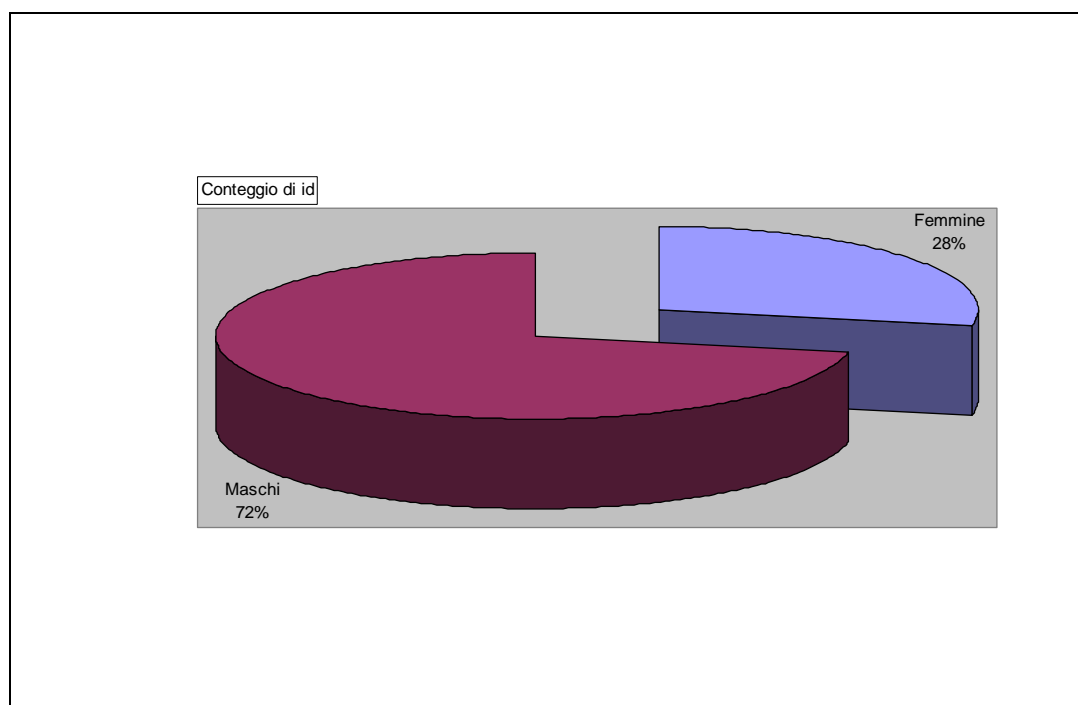


Figura 1: SESSO

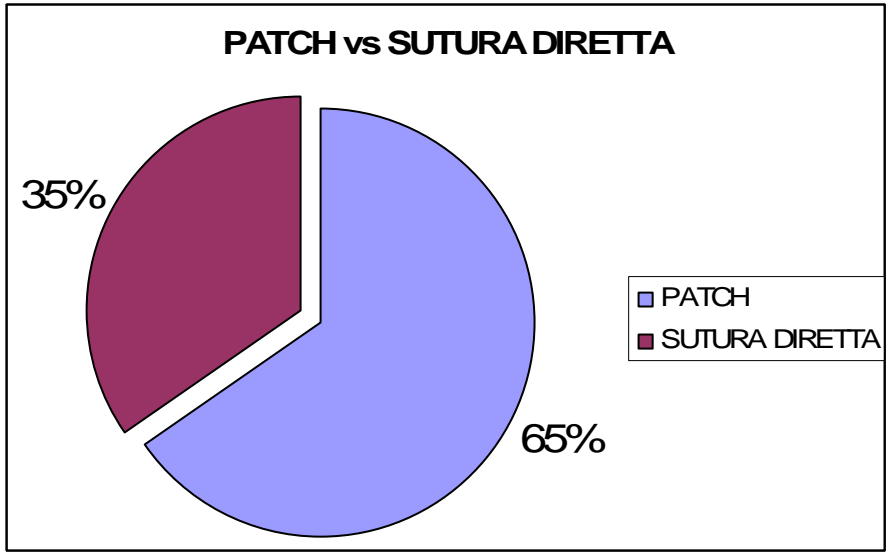


Figura 2: PATCH Vs Sutura Diretta

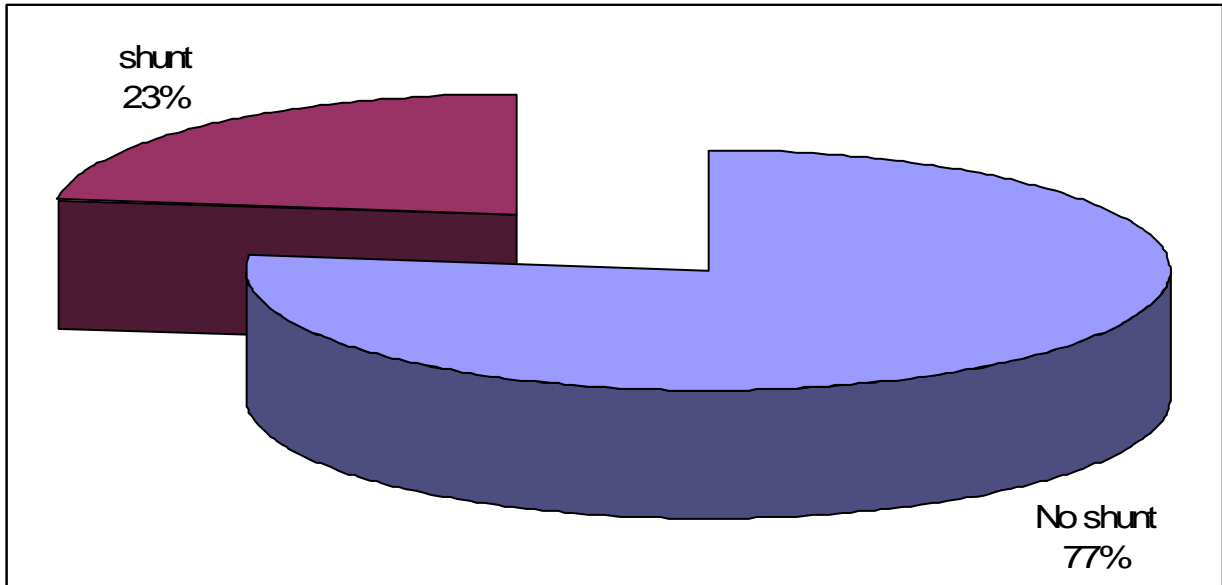


Figura 3: SHUNT

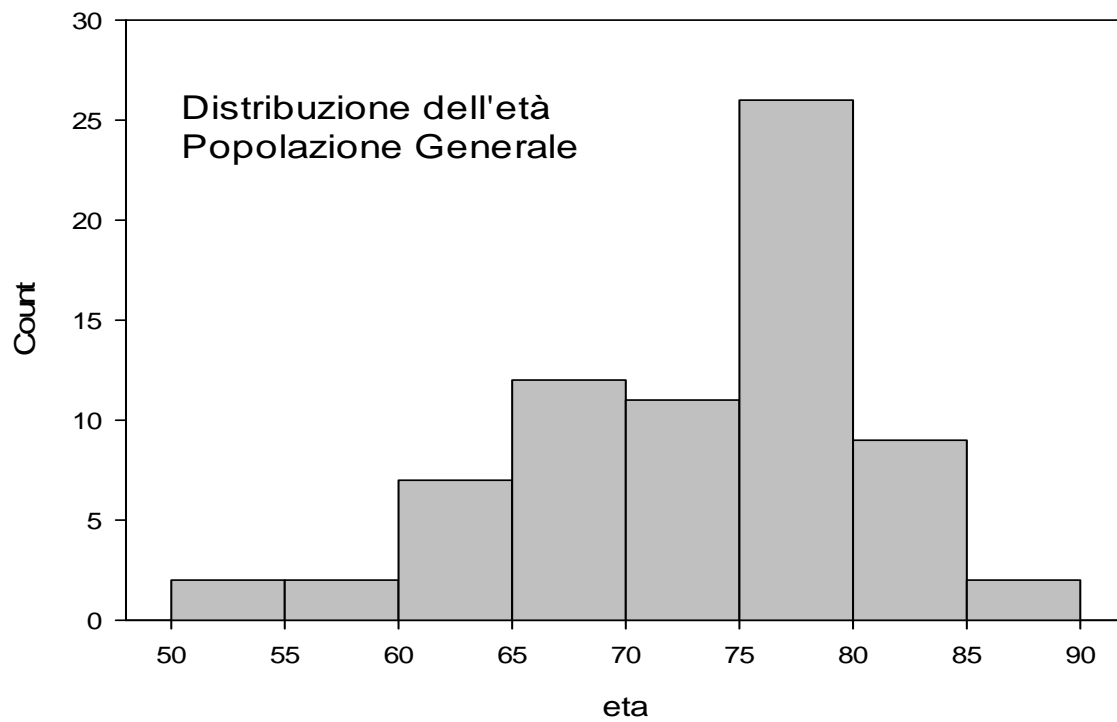


Figura 4: Età della popolazione

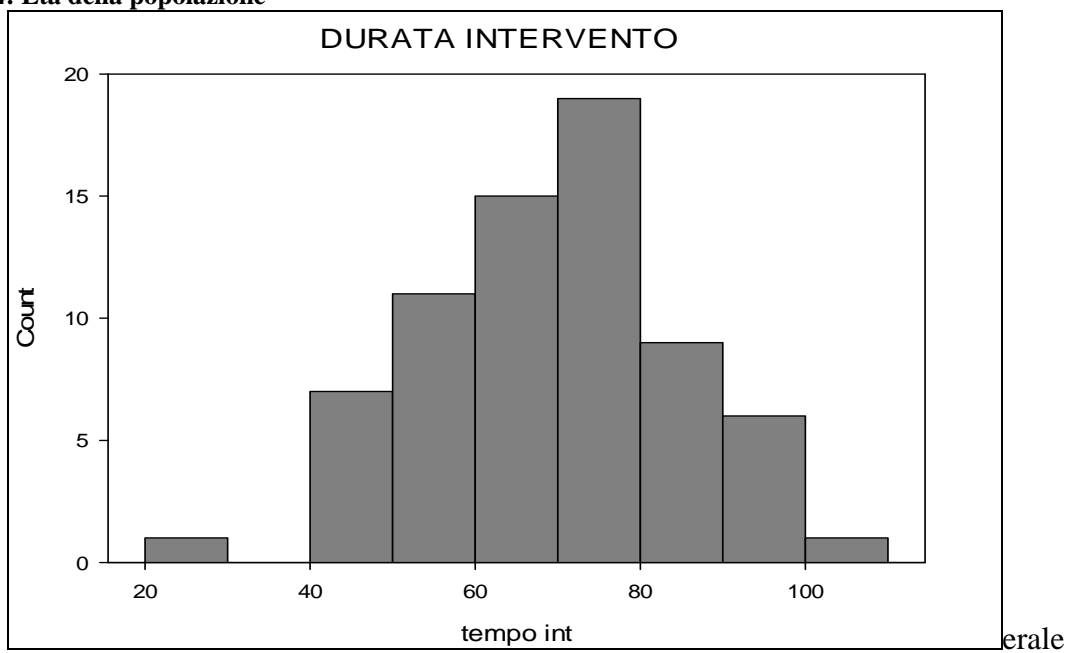


Figura 5: TEMPO INTERVENTO

Neuroimaging:

I pazienti arruolati nello studio sono stati sottoposti a risonanza magnetica nucleare (RMN Philips 1,5 T) presso la Radiologia dell'Istituto Clinico Humanitas, IRCCS Rozzano (dott. Blazarini L, Rognone F) e le immagini sono state refertate da due differenti neuroradiologi in cieco rispetto alla clinica dei pazienti. I parametri di RMN sono i seguenti: Immagini pesate in perfusione con sequenze isotropiche echo planari. Studio sagittale, coronale, trasversale ciascuno con valore di b di 0, 500, 1000 s/mm², TR 4006 ms TE 83 ms, gradiente quantum 30mT/m, slew rate_125mTm⁻¹ms⁻¹, rising time 240 ms, spessore di 4-6 mm, gap 1,5 mm, matrice 128x128; field of view_220X220 mm² Immagini pesate in diffusione single shot echoplanar con le seguenti caratteristiche: tempo di ripetizione (TR)= 0,8 ms; tempo di echo (TE)=123 ms; tempo di acquisizione 4 sec; b=1100 s/mm².

Il timing delle RMN è così schematizzato: 1) RMN PW-DW (pesata in perfusione ed in diffusione) il giorno precedente l'intervento chirurgico, dopo la firma del consenso informato. In questo momento al paziente viene eseguito il primo prelievo ematico. Tale indagine ha lo scopo di verificare lo stato del parenchima cerebrale e di identificare aree di sofferenza cerebrale, ischemia pregressa o recente, datando le lesioni in croniche, subacute o recenti.

2° RMN DW a 24 ore dall'intervento chirurgico, per la valutazione della restrizione molecolare di H₂O: tale indagine identifica eventuali nuove lesioni ischemiche anche di pochi mm³ di encefalo che possano essersi verificate in seguito a microembolia in corso di TEA.

Le immagini sono state definite come lesioni ischemiche di vecchia data o subacute caratterizzate da aree iperintense nella sequenza FLAIR. Le aree di gliosi sono state considerate come esiti stabilizzati di fatti ischemici. Lesioni ischemiche acute qualora si evidenziasse alterazione della diffusività molecolare nelle sequenze diffusione.

Alle lesioni di gliosi cronica non è stato attribuito alcun significato ai fini della valutazione della permeabilità della barriera ematoencefalica né ai fini della presenza di un danno cerebrale acuto che possa determinare il rilascio in circolo di FABPs o rappresentare un'area di aumentata infiammazione locale. Al contrario, in considerazione del rilascio sistemico di eventuali markers di morte cellulare, sono state definite come positive le RMN che avessero identificato nuove lesioni cerebrali controlaterali al lato operato.

Raccolta dei campioni

Sono stati raccolti campioni di siero e plasma ottenuti da sangue intero (10 ml) mediante venipuntura: i campioni di siero sono stati raccolti in provette BD Vacutainer (tappo blu); i campioni di plasma in provette BD Vacutainer con Na citrato 1:10 (tappo azzurro).

I campioni, entro un ora dal prelievo, sono stati centrifugati a 4000 g per 10 minuti a 4 °C per separare la componente cellulare dal siero e dal plasma. Questi ultimi, sono stati quindi conservati in provette Eppendorf con l'etichetta con ID del paziente a -20° C in una sieroteca appositamente creata.

Il timing dei prelievi è stato così schematizzato:

1° prelievo il giorno precedente l'intervento chirurgico al momento dell'esecuzione di Risonanza Magnetica Nucleare pesata in diffusione-perfusione.

2° prelievo a 24 ore dall'intervento chirurgico, in concomitanza della RMN di controllo, pesata in diffusione.

Lo stoccaggio dei sieri dei pazienti e le analisi Biochimiche (PCR) ed immuno enzimatiche (H-FABPs e B-FABPs) sono state eseguite dal laboratorio analisi cliniche dell'Istituto Clinico Humanitas IRCCS Rozzano (dott. A. Montanelli). L'analisi dei campioni per le PTX3 sono state eseguite presso il laboratorio di Ricerca Fondazione Humanitas Rozzano (Prof. A. Mantovani). Sia il personale tecnico che medico del laboratorio non era a conoscenza dei dati dei pazienti che ha analizzato.

I campioni di siero raccolti sono quindi stati sottoposti alla determinazione di Heart –FABPs mediante un kit ELISA reperibile in commercio (CTHK402; 2 x 96; HyCult biotechnology) e seguendo le istruzioni fornite dal Produttore.

La determinazione di Brain-FABPs ha richiesto la messa a punto di metodica *HOME MADE* che prevede l'utilizzo di anticorpi policlonali contro le Human- BFABPs (HP9029 100 micg) commercializzata dalla HyCult biotechnology.

La determinazione dei valori di PTX3 è avvenuta mediante una metodica home made come già precedentemente descritto.

La determinazione dei valori di CRP 16 è avvenuta mediante la metodica standard di laboratorio: determinazione immunoturbidimetrica quantitativa su siero. Reagente Sentinel Diagnostic su strumento Abbot Architect.

Human Heart Fatty Acid Binding Protein ELISA KIT (HyCult Biotechnology, NL)

Il kit ELISA commercializzato dalla HyCult Biotechnology è un kit completo con una concentrazione dello standard a 118 ng/ml ed una curva di taratura ad 8 punti per diluizioni progressive dello standard.

Il metodo analitico prevede la diluizione del siero con *Dilution Buffer* in proporzione di 40 µl siero e 160 µl di Dilution buffer.

Successiva aggiunta del tracciante fornito in quantità di 50µl.

Incubazione per 60 min a 20°C. Lavaggio per 3 volte.

Addizionamento cromogeno 100 µl TMB ed incubazione per 15 min a 18-25 °C al buio

Addizionamento di 100 µl di *stop solution* e rilevazione dell'assorbanza a 450 nm

I risultati sono espressi in pg /mL e la curva di riferimento è evidenziata in Figura 6

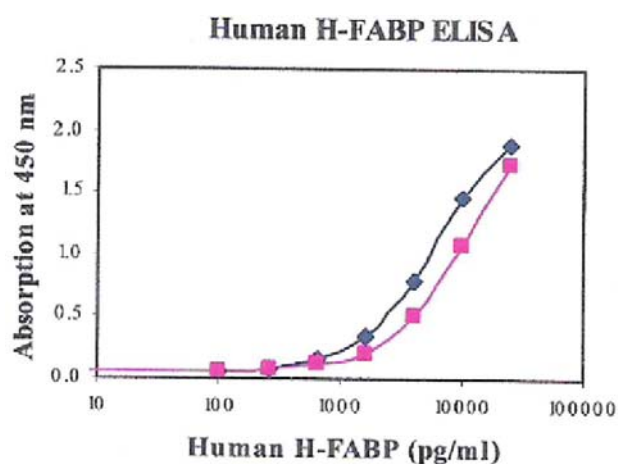


Figura 6: standard di riferimento H-FABP (HyCult Biotechnology, NL)

ELISA diretto Ab policlonale Human Brain Fatty Acid Binding Protein HOME MADE

(Dott. Baldassarre Eleonora Laboratorio Analisi Cliniche IRCCS Humanitas –Rozzano)

Per quanto riguarda la Brain Fatty Acid Binding Protein, l'Industria fornisce solamente l'anticorpo primario IgG policlonale di coniglio contro le B-FABPs e l'anticorpo secondario necessario alla realizzazione del complesso antigene anticorpo ma non è in grado di fornire un procedimento per la sua utilizzazione; inoltre non è ad oggi disponibile sul mercato la proteina BFABP per poter tarare la metodica a per diluizioni successive.

In letteratura non sono descritte precedenti esperienze per la determinazione delle B-FABPs a partire dagli anticorpi policlonali. L'unico Autore che ha isolato da omogenato di cervello umano la BFABP l'ha utilizzata per determinare queste proteine con una metodica home made⁶².

Su piastre ELISA vergini è stato preparato un coating di 100 µl mediante 20µl di siero addizionato di 80 µl di coating buffer (tampone carbonato) che è stato incubato overnight a 4°C.

Lavaggio con 300 µl di Wash buffer (PBS 0.05%/v/v tween 20) per 3 volte e blocco della reazione con 150 µl di Block solution (PBS BSA 1%). Nuova incubazione per 60 min a 37°C.

Lavaggio con 300 µl di Wash buffer per 3 volte.

Aggiunta al pozzetto dell'*anticorpo primario policlonale* (HP9029:Rabbit IgG, *policlonal antibody against human B-FABP*; HyCult Biotechnology, NL) in quantità di 100 µl (1 mL policl.: 19 mL (PBS/BSA .01%)= 20 mL]: 650 µl: 12.35mL=13 mL. Incubazione per 90 min. a 37°C e successivo lavaggio con 300 µl Wash buffer per 4 volte.

Ai pozzetti è stato aggiunto 100 µl di *anticorpo secondario* (di riconoscimento del complesso antigene anticorpo) (Goat Anti- Rabbit IgG HRP-labeled) (1 mL sec.: mL (PBS/BSA .01%)=100 mL) 130 µl sec.: 12.90 mL= 13 mL.

Nuova incubazione per 90 min. a 37°C e successivo lavaggio con 300 µl Wash buffer per 3 volte. Aggiunta del *cromogeno* 100 µl TMB (Tetrametilbenzidina in dimetilsolfossido) per 30 min. Arresto della reazione con 100 µl di stop solution e lettura dell'assorbanza a 450 nm.

ELISA Ab policlonale Human PTX-3 - HOME MADE

(Prof. Mantovani Alberto Laboratorio Ricerca IRCCS Humanitas –Rozzano)

La metodica Home Made ideata e brevettata dal Prof. A. Mantovani^{79, 82}, Direttore Scientifico dell'IRCC Humanitas prevede:

COATING: 100 ng Ab monoclonale anti PTX3 + coating buffer (tampone carbonato)

INCUBAZIONE: overnight a 4°C. Lavaggio con Wash buffer (PBS 0.05%)

BLOCKING SOLUTION: 2 ore con 300 µl di DRY MILK 5% e lavaggio Wash buffer

ANTICORPO PRIMARIO: 50 µl Recombinant Human PTX3 + plasma da campionare

Incubare 120 min. a 37°C. Lavaggio con Wash buffer 5 volte

ANTICORPO POLICLONALE DI CONIGLIO ANTI PTX 3 CONIUGATO CON BIOTINA:

Incubare 60 min. a 37°C . Lavaggio Wash buffer 3 volte

100 µl STREPTAVIDINA

Incubare 60 min a 37°C Lavaggio 5 volte

CROMOGENO: 100 µl TMB per 10 min.

STOP SOLUTION : 100 µl acido solforico

Leggere assorbanza a 450 nm

I valori normali sono 3 mcg/ml

Raccolta dati e analisi statistiche:

I dati inerenti la storia clinica dei pazienti, le comorbilità, i farmaci assunti nel preoperatorio, la tecnica chirurgica, lo shunting, la sintomatologia postoperatoria, eventuali eventi cardiaci e neurologici ed il quadro RMN sono stati raccolti mediante un apposito database in ambiente Excel di Microsoft dopo firma dell'apposito consenso informato.

Le analisi statistiche sono state eseguite con il programma Sigmastat.

RISULTATI

BFABPs: La metodica home made non presenta una curva di calibrazione standardizzata in quanto non esiste in commercio la proteina B-FABP di riferimento: abbiamo quindi utilizzato delle arbitrarie Unità/microlitro (UA/mL) riferite all'assorbanza del legame tra l'anticorpo ed il siero dei pazienti.

Non essendo possibile stabilire con la nostra metodica il cutoff tra il positivo ed il negativo abbiamo analizzato campioni sicuramente negativi per danno cerebrale in studenti sani (0,04 UA/mL \pm 0,004); mentre come campioni sicuramente positivi per danno cerebrale abbiamo preso in esame il siero di pazienti sottoposti a interventi neurochirurgici (2,15 UA/mL \pm 0,33) - Figura 7.

Abbiamo inoltre analizzato 4 pazienti sottoposti chirurgia venosa sia per quanto riguarda il preoperatorio che per quanto riguarda il postoperatorio (entrambe dopo anestesia spinale): i valori di BFABPs sono stati 1,9 UA/mL (\pm 0,4) a 30 minuti dall'anestesia spinale e 2,04 UA/mL (\pm 0,2) a 24 ore. I valori medi di PTX3 e CRP non mostrano differenze significative tra il pre ed il post operatorio: tali dati evidenziano una positività delle BFABP in esiti di anestesia spinale con un trend di aumento non significativo.

La nostra popolazione presa in esame (71 soggetti) ha quindi mostrato una media di assorbanza preoperatoria di 1,71 UA/mL (\pm 0,25), una media postoperatoria a 24 ore di 1,74 UA/mL (\pm 0,25) ed una media postoperatoria a 48 ore di 1,78 UA/mL (\pm 0,28) Figura 8.

Alla luce dei valori di positività e di negatività possiamo dire che la nostra popolazione in preoperatorio è comunque positiva e non evidenzia variazioni tra il pre ed il post operatorio.

H-FABPs: la metodica utilizzata prevede un kit preconfezionato commercializzato dalla ditta HyCult Biothecnology: la curva di calibrazione da noi ottenuta è ad 8 punti (Figura 9).

L'analisi della media della popolazione generale ha dimostrato dei valori pari a 221 Pg/mL (\pm 167,7), una media postoperatoria a 24 ore di 497 Pg/mL (\pm 1388,4) ed a 48 di 375 Pg/mL (\pm 487,7).

I valori preoperatori sono statisticamente inferiori rispetto al postoperatorio (Wilcoxon test $p < 0,001$) Figura 10.

CRP 16: L'analisi della media della popolazione generale ha dimostrato dei valori pari a 0,9 ($\pm 1,16$), una media postoperatoria a 24 ore di 2,3 ($\pm 2,76$); a 48 ore la media è 2,25 ($\pm 1,3$).

Rispetto ai valori di cutoff della metodica (pari a 1 mg/dl) la nostra popolazione risulta negativa nel preoperatorio ed i valori di CRP 16 salgono tra il pre ed il postoperatorio con una differenza che risulta statisticamente significativa ($p < 0,001$). Figura 11

Per la CRP 16 l'effetto infiammatorio dell'intervento chirurgico rimane costantemente presente a 48 con valori che mostrano un valore alterato.

PTX 3: la metodica Home made del prof. A. Mantovani è già stata ampiamente pubblicata e validata in letteratura^{79, 82}. La curva di calibrazione dell'analisi delle PTX nella nostra popolazione è rappresentata in Figura 12

L'analisi della media della popolazione generale ha dimostrato dei valori pari a 7,08 ng/mL ($\pm 11,6$), una media postoperatoria a 24 ore di 11,21 ng/mL ($\pm 13,28$); a 48 ore la media è 7,9 ng/mL (± 5). Il cutoff per questa metodica è pari a 2 ng/mL Figura 13.

Anche in questo caso la nostra popolazione risulta già positiva nel preoperatorio rispetto alla media della popolazione sana.

Le media dei valori tra il pre ed il postoperatorio al t-Test è statisticamente significativa ($p < 0,001$).

Mentre i prelievi a 48 ore evidenziano un rientro ai valori preoperatori della PTX3.

Abbiamo analizzato i valori dei markers in una sottopopolazione di pazienti asintomatici per eventi neurologici, sia clinici che di neuroimaging (nel pre e nel postoperatorio: clinica muta e RMN DWI negativa per nuovi eventi nelle 24 ore precedenti). Per eliminare il fattore confondente della cardiopatia ischemica sulle H-FABPs, in considerazione della cross-reattività, la popolazione è stata scremata in modo che non fosse presente in anamnesi alcuna storia di cardiopatia ischemica pregressa o già rivascolarizzata. I sieri disponibili per questa sottopopolazione sono stati 4 per il preoperatorio e 5 per il postoperatorio.

BFABPs: Confrontando i sieri di questo gruppo di pazienti con i sieri della popolazione generale per quanto riguarda i valori di BFABPs non abbiamo evidenziato differenza statistica pre 1,573 UA/mL ($\pm 0,12$) vs 1,71 UA/mL ($\pm 0,25$) e post 1,66 UA/mL ($\pm 0,25$) vs 1,74 UA/mL $\pm 0,25$ ma semplicemente un trend in diminuzione per la popolazione priva di fattori di rischio ($p = 0,08$) Figura 14.

Per quanto riguarda le H FABPs, si evidenzia unicamente una riduzione dei valori dei marcatori per la sottopopolazione scevra da fattori che potrebbero alterare il campione sia dal punto di vista neurologico che cardiaco (175 Pg/mL vs 486 Pg/mL; t test n.s. $p=0,14$).

Anche in questa popolazione come nelle popolazione generale sono variati i valori di PTX3 e CRP 16 con lo stesso trend di crescita del postoperatorio.

Per valutare come fosse l'andamento dei markers preoperatori nella popolazione di pazienti sintomatici abbiamo considerato sia i pazienti con fatti ischemici preoperatori (TIA o Stroke acuto) sia i pazienti con lesioni ischemiche asintomatiche alla RMN preoperatoria. Sia le BFABPs che le H FABPs di questa sottopopolazione non hanno mostrato una differenza statistica rispetto al preoperatorio della popolazione generale.

Le PTX3 hanno mostrato valori maggiori indicando un trend in aumento ma non significativi.

Selezionando solo i pazienti positivi per una sintomatologia postoperatoria clinica abbiamo un campione di sieri troppo poco numeroso (1 paziente con emorragia ed 1 con ictus con sierologia completa ed 1 paziente con afasia ed 1 con amaurosi in I gta con solo RMN valide e prelievi degradati). Non è stato possibile pertanto fare alcuna analisi su questa sottopopolazione. I valori di H e B FABPs sono stati rispettivamente di 2,02 e 2,64 UA/mL per B-FABP e 572 e 238 Pg/mL per H-FABP –(Figura 15 Figura 16).

L'analisi nel tempo dei valori di siero del paziente con stroke postoperatorio ha rilevato i seguenti valori: 1,8 UA/mL a sei ore dall'evento, 2,64 UA/mL a 24 ore di postoperatorio e 2,14 UA/mL a 48 ore. Non è possibile stabilire se vi sia un reale aumento nel postoperatorio di questi due marcatori ma il dato riportato è fortemente suggestivo Figura 17.

La categoria di pazienti sintomatici e con positività della RMN postoperatoria anche se asintomatici presentavano una media di B FABP 1,64 UA/mL ($\pm 0,23$) nel preoperatorio, 1,75 UA/mL ($\pm 0,46$) nel postoperatorio a 24 ore e 1,9 UA/mL ($\pm 0,2$) a 48 ore con un trend all'incremento che non raggiunge la significatività statistica.

Le H FABPS hanno mostrato un moderato incremento dei valori medi al primo postoperatorio ma senza una significatività statistica Figura 18.

Per quanto riguarda le PTX3 la media del gruppo nel postoperatorio è stata 16 ng/mL ($\pm 9,47$) ma non si è raggiunta una differenza statistica con la popolazione generale - 11,21 ng/mL ($\pm 13,28$).

Le CRP 16 con una media postoperatoria di $1,88 \pm 1,63$ risulta inferiore ai valori della popolazione generale in assenza di significatività.

Per evidenziare la specificità dal marker per eventi ischemici cerebrali abbiamo analizzato i pazienti che sicuramente non presentano motivo di innalzamento dei valori (sottopopolazione neurologicamente asintomatica sia pre che postoperatoria, RMN preoperatoria e postoperatoria negativa; nessuna storia di cardiopatia (IMA, stent, angor) senza shunt) Vs il sottogruppo di pazienti che hanno evidenziato o lesioni clinicamente evidenti o evidenti solo alle indagini di neuroimaging (DWI +).

Per quanto riguarda le B FABPS: nei pazienti negativi la media era $1,66 \text{ UA/mL} (\pm 0,25)$ mentre per i pazienti positivi la media era $2,09 \text{ UA/mL} (\pm 0,32)$: si evidenzia sicuramente un trend con aumento dei valori medi nei pazienti che hanno patito un sintomo postoperatorio ma non si raggiunge la potenza richiesta del test per avere una significatività statistica (t test) Figura 19.

L'analisi delle HFABPS in questo gruppo di pazienti dimostra una media nel postoperatorio di $175,83 \text{ Pg/mL} (\pm 62,2)$ per i pazienti asintomatici e di $440,33 \text{ Pg/mL} (\pm 177,86)$ per i sintomatici con una significatività statistica al t test ($p=0,011$): evidentemente dimostrano un aumentato stress cardiologico intraoperatorio od una cross reattività nei pazienti che hanno patito un danno cerebrale.

Paragonando il gruppo di pazienti che hanno richiesto il posizionamento dello shunt intraoperatorio per riduzione dei valori di ossimetria cerebrale alla NIRS al di sotto del 20% (con una media di popolazione pari a -30,4% -22 pazienti-) con la sottopopolazione che non ha richiesto il posizionamento dello shunt (-75 pazienti -) si sono evidenziate alla RMN DWI un 18% di nuove lesioni contro il 3,5%, tale dato non raggiunge la significatività statistica al test di Fischer.

Paragonando le medie dei due gruppi per le B FABPS si è evidenziato nel postoperatorio ove era stato posizionato lo shunt un valore di $2,025 \text{ UA/mL} \pm 0,328$ mentre nei pazienti non shuntati il valore è stato di $1,724 \text{ UA/mL} \pm 0,248$. Tale dato è in accordo con un modesto aumento della positività delle Brain Fatty Acid Binding Proteins nei pazienti sottoposti a shunt ma non è corroborato da dati statistici (Figura 20).

Per evidenziare se il tempo chirurgico è in grado di modificare l'andamento dello stato infiammatorio sistemico abbiamo diviso in 3 classi i pazienti in base al tempo di intervento:

19 pazienti hanno avuto un tempo di intervento <54 minuti, 56 pazienti tra i 54 ed i 90 minuti e 19 pazienti al di sopra di 90 minuti: Figura 21

Non si è evidenziata alcuna variazione delle BFABPs rispetto al valore mediano di 1,7 UA/mL.

Considerando invece l'indice infiammatorio delle PTX3 si ottengono rispettivamente le mediane 10 ng/mL ($\pm 5,5$), 13,4 ng/mL ($\pm 13,4$) e 14,7 ng/mL ($\pm 13,8$) tali dati correlano l'aumento dell'infiammazione con l'innalzamento dei tempi chirurgici ma la bassa potenza statistica non permette di essere conclusivi.

Analizzando la sottocategoria di pazienti che ha assunto terapia statinica nel preoperatorio rispetto a quella che non ha assunto statina abbiamo evidenziato dei valori medi rispettivamente di HFABP 186,905 Pg/mL e di 498,87 Pg/mL con una evidenza significativa ($p=0,046$) tra i due valori preoperatori.

Per quanto riguarda le medie postoperatorie sono state rispettivamente 385,714 UA/mL e 840,38 UA/mL il raddoppio dei valori in assenza di terapia statinica, seppure in assenza di una significatività, sembra un dato molto interessante Figura 22.

Per quanto riguarda le BFABPs non si è evidenziata alcuna differenza né tra i due preoperatori che tra i due postoperatori

Nessuna differenza tra le medie dei PTX e CRP – sebbene sia evidente che nei pazienti che non hanno assunto terapia statinica nel postoperatorio le PTX si innalzano maggiormente 9-11-6 ng/mL vs 6-14-10 ng/mL

Per quanto riguarda il gruppo di fumatori si evidenzia un aumento dei valori medi di HFABP che non raggiungono differenza statisticamente significativa.

Le B-FABP non si discostano nel gruppo dei fumatori da quello dei non fumatori.

Le PTX 3 hanno valori tendenzialmente più elevati nei fumatori ma neanche in questo caso non si rileva alcuna differenza statisticamente significativa.)

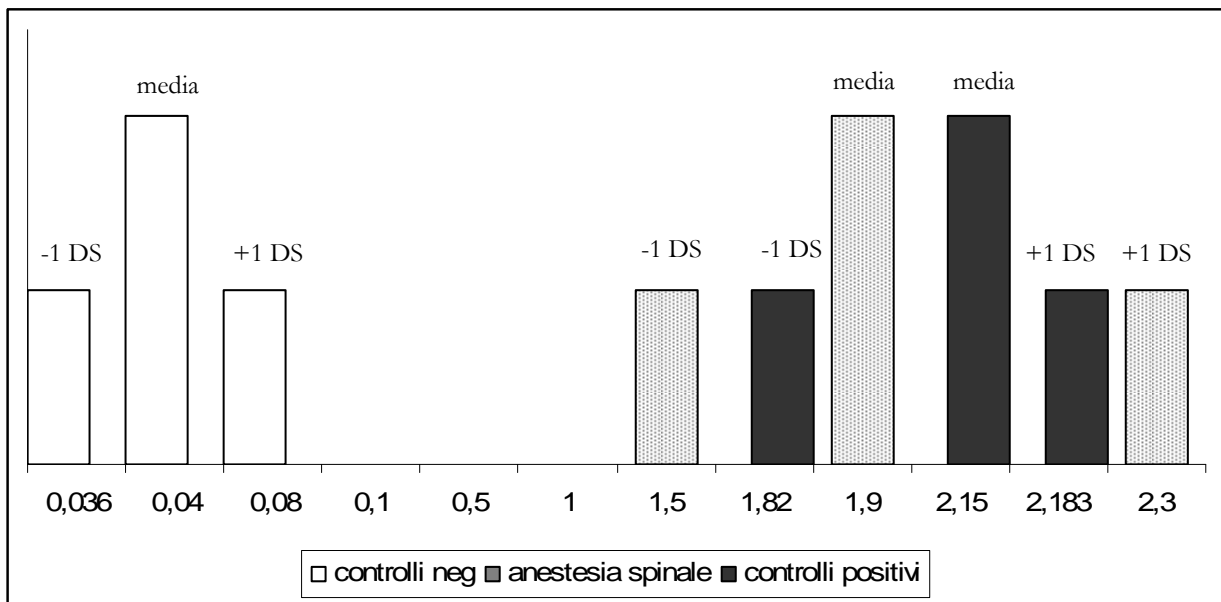


Figura 7: Valori delle B FABS nei controlli negativi, nei controlli positivi e nei campioni venosi del gruppo sottoposto ad anestesia spinale

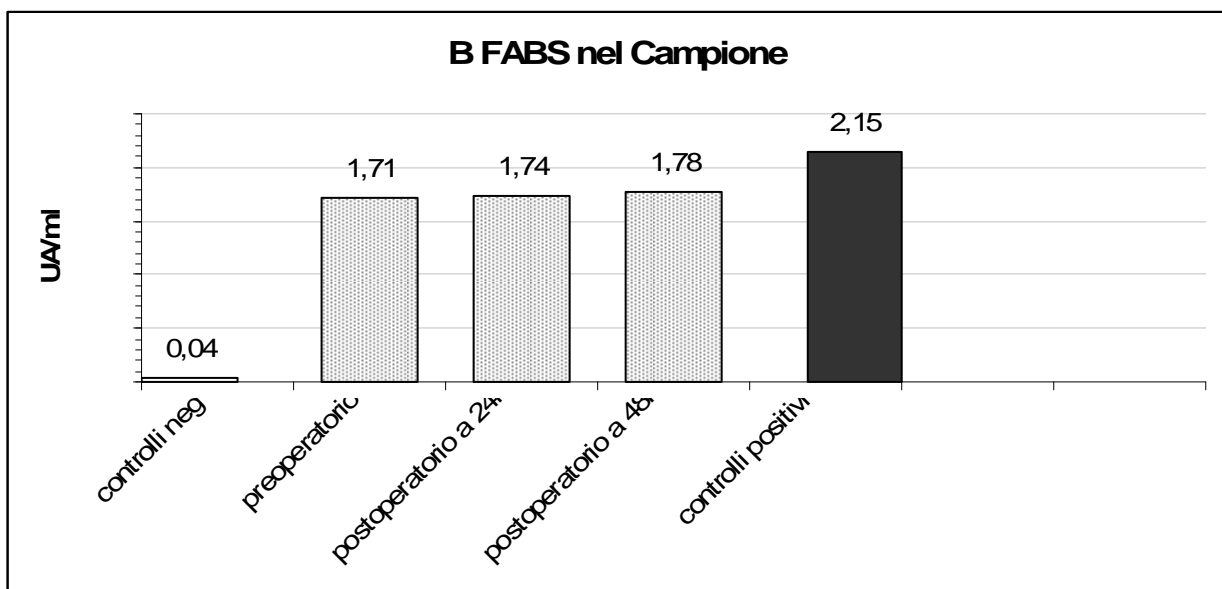


Figura 8: Valore delle B FABS nella popolazione campione paragonata ai controlli positivi e ai controlli negativi

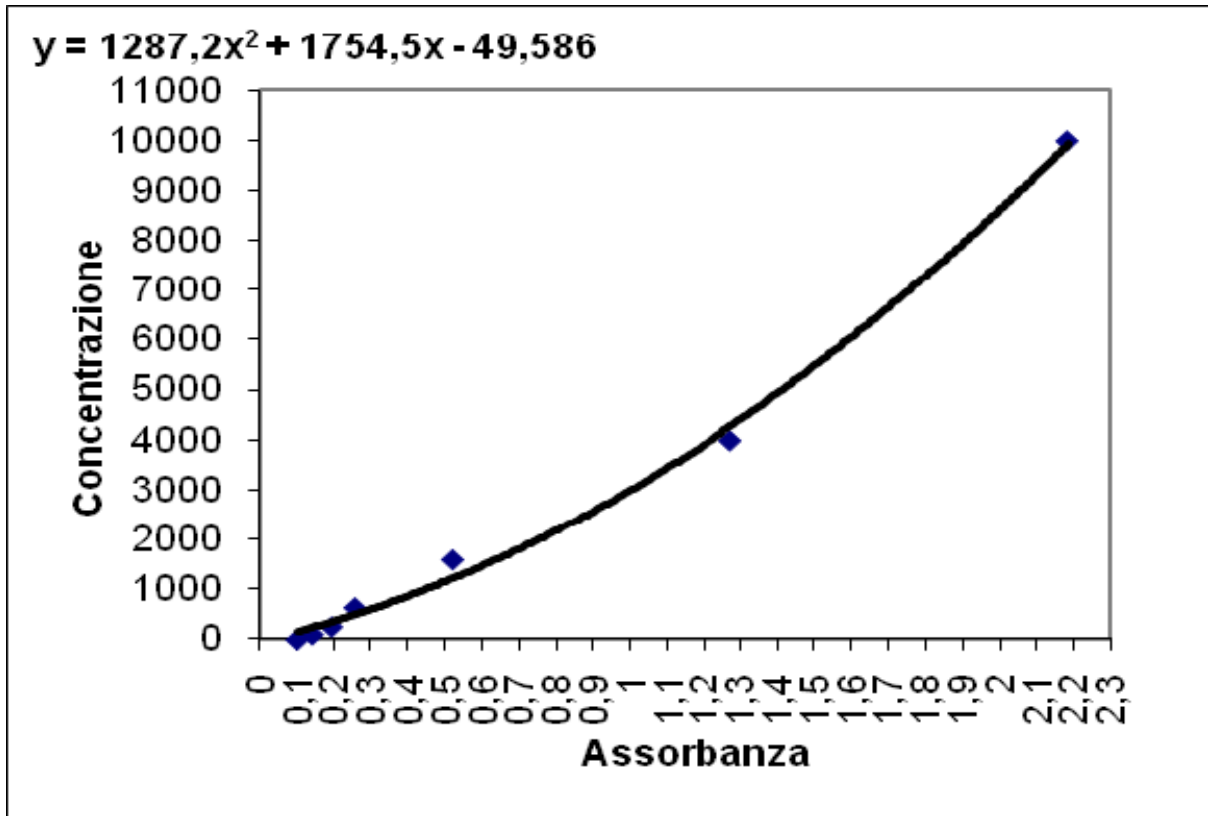


Figura 9: curva di calibrazione HFABPs ottenuta IRCCS HUMANITAS

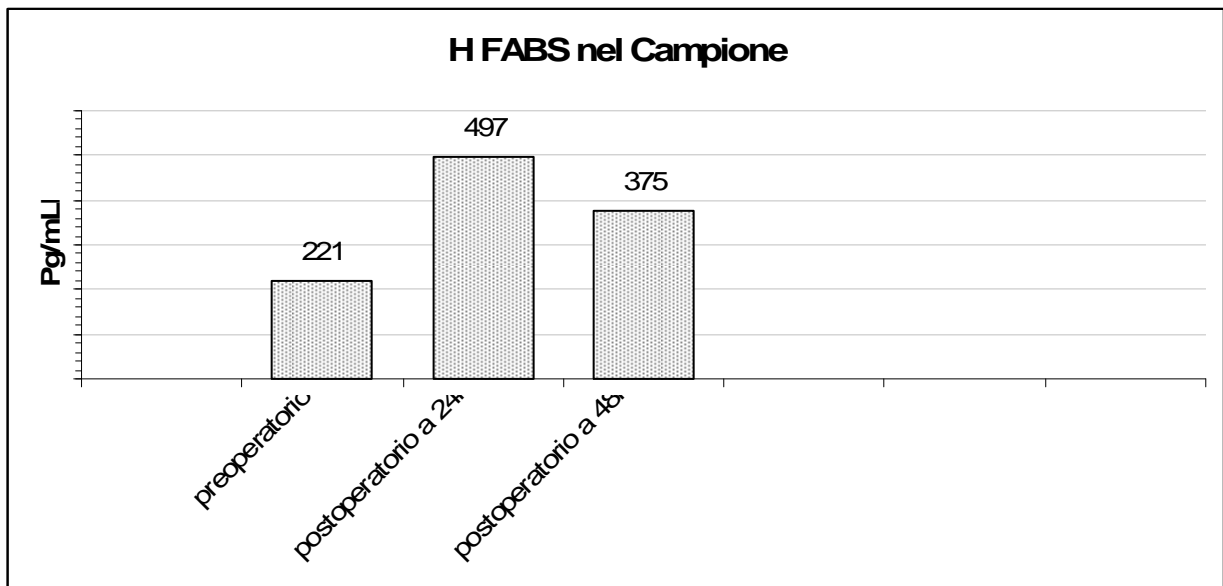


Figura 10: Valori delle H FABS nella popolazione campione

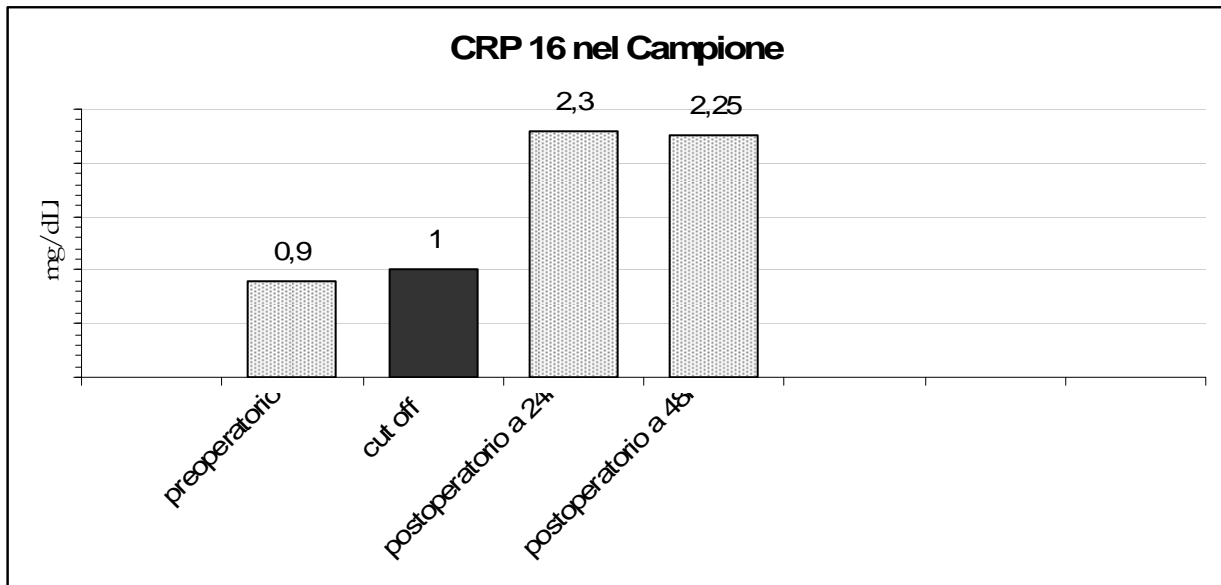


Figura 11: Valore della CRP 16 nella popolazione campione
 *differenza tra preoperatorio e postoperatorio P<0,001

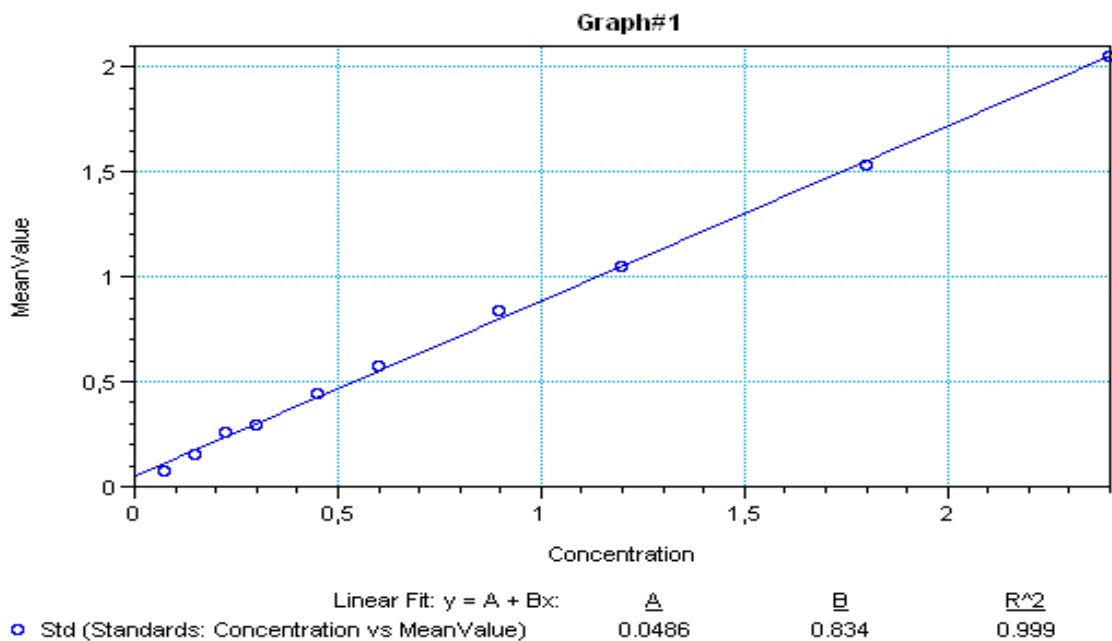


Figura 12: Curva di calibrazione PTX3 - IRCCS Humanitas Ricerca

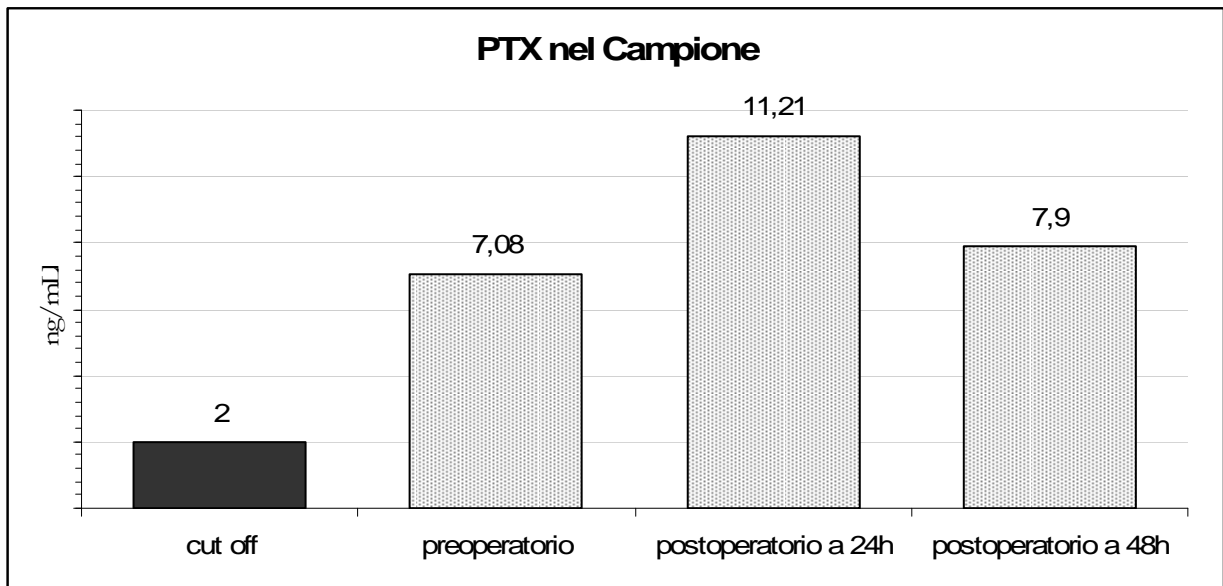


Figura 13: Valori delle PTX nella popolazione campione
 *differenza tra preoperatorio e postoperatorio $P < 0,001$

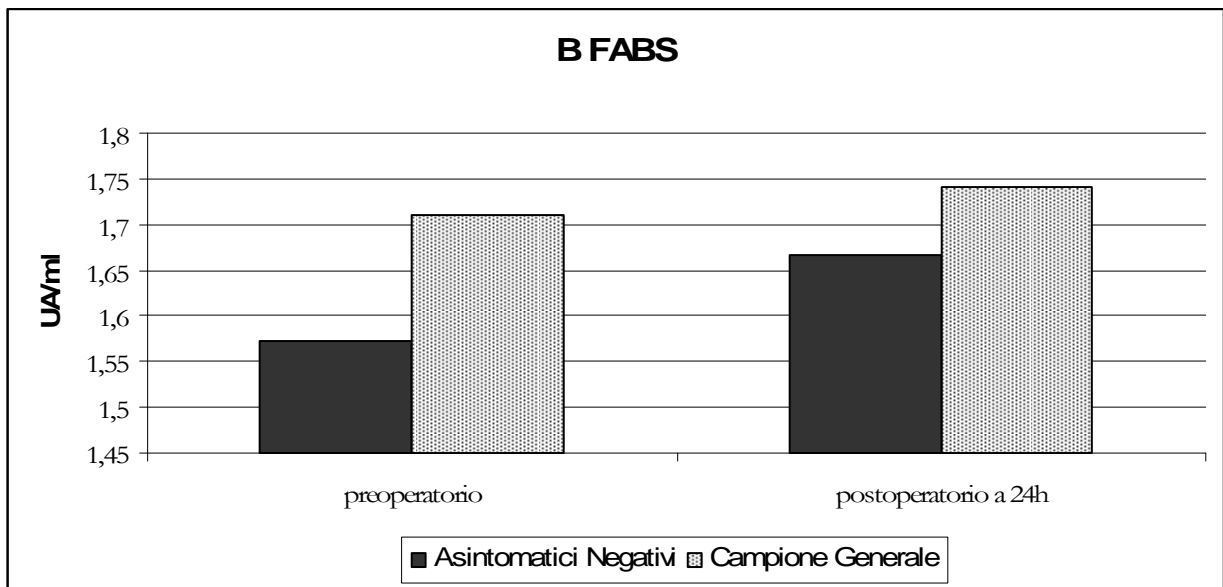


Figura 14: B FABPs nei pazienti asintomatici negativi vs la popolazione campione

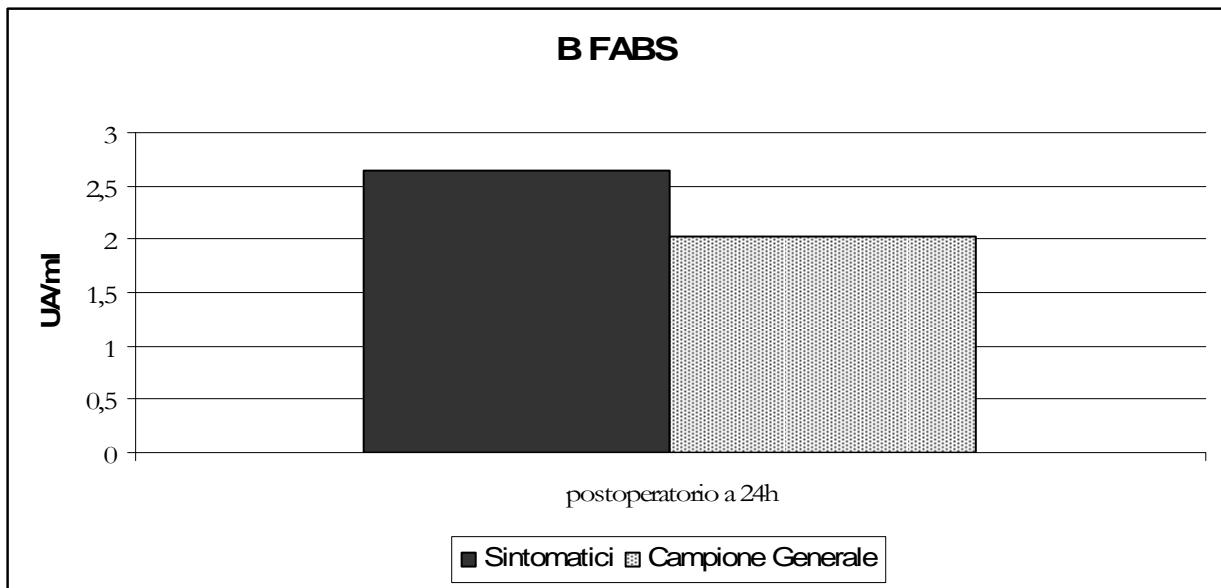


Figura 15: B FABPs postoperatori nei pazienti diventati sintomatici dopo intervento vs la popolazione campione

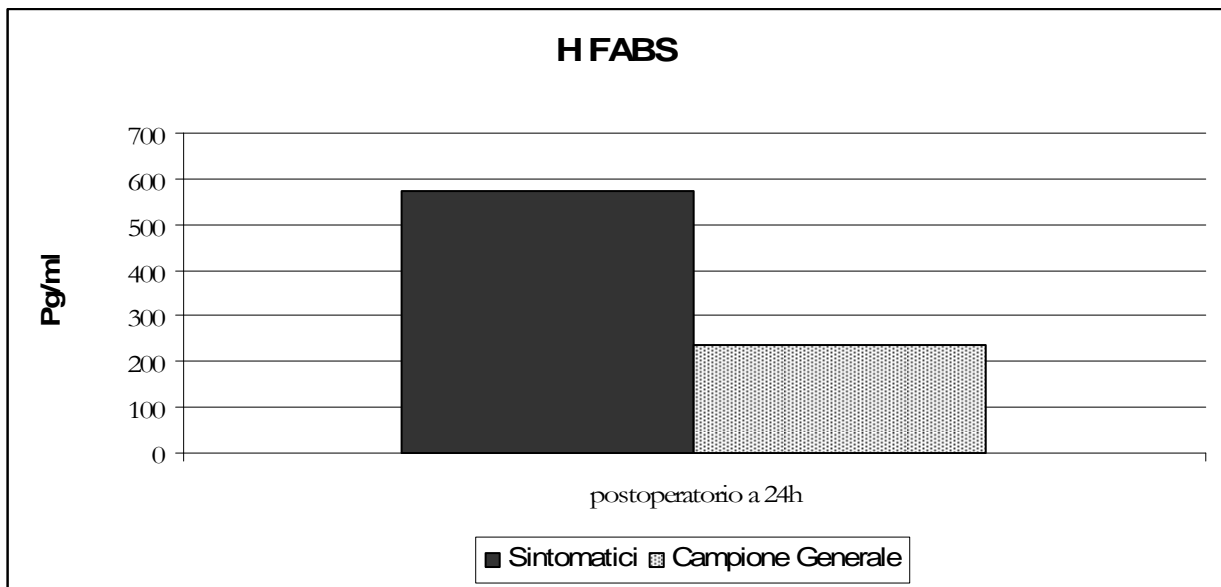


Figura 16: H FABPs postoperatori nei pazienti diventati sintomatici dopo intervento vs la popolazione campione

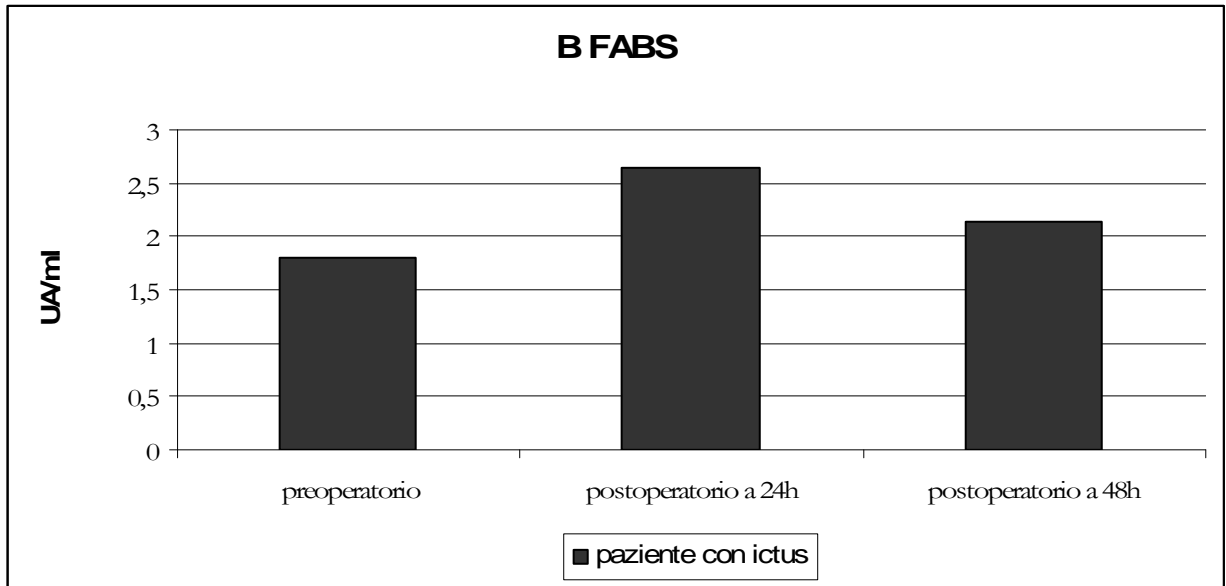


Figura 17: Valori delle B FABPs nel paziente che ha sviluppato uno stroke postoperatorio

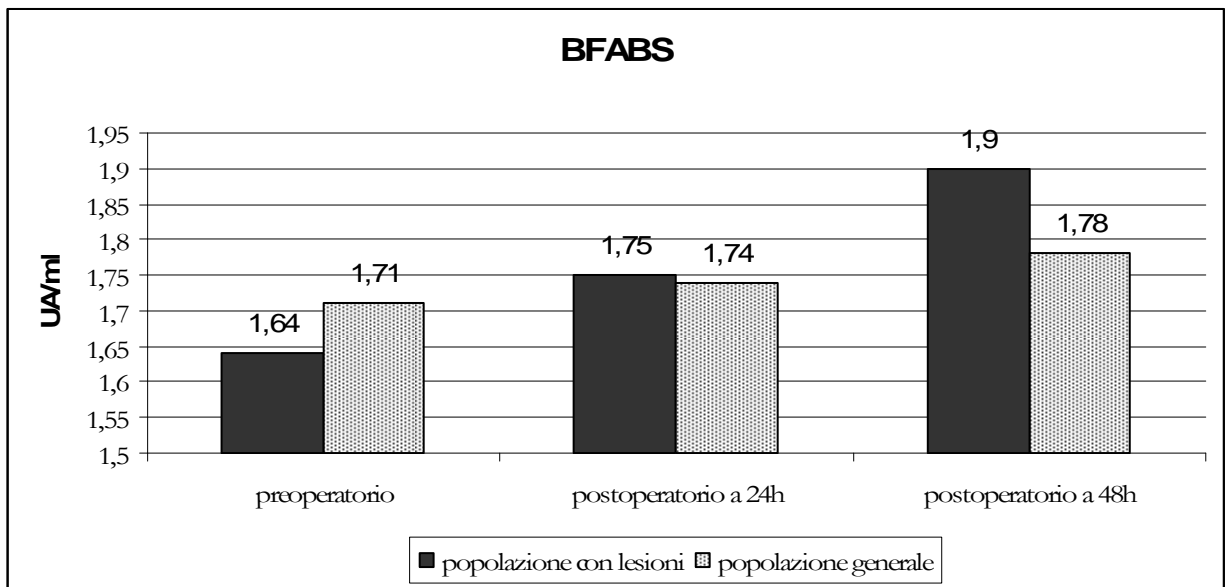


Figura 18: B FABPs nei pazienti con lesioni dopo vs la popolazione campione

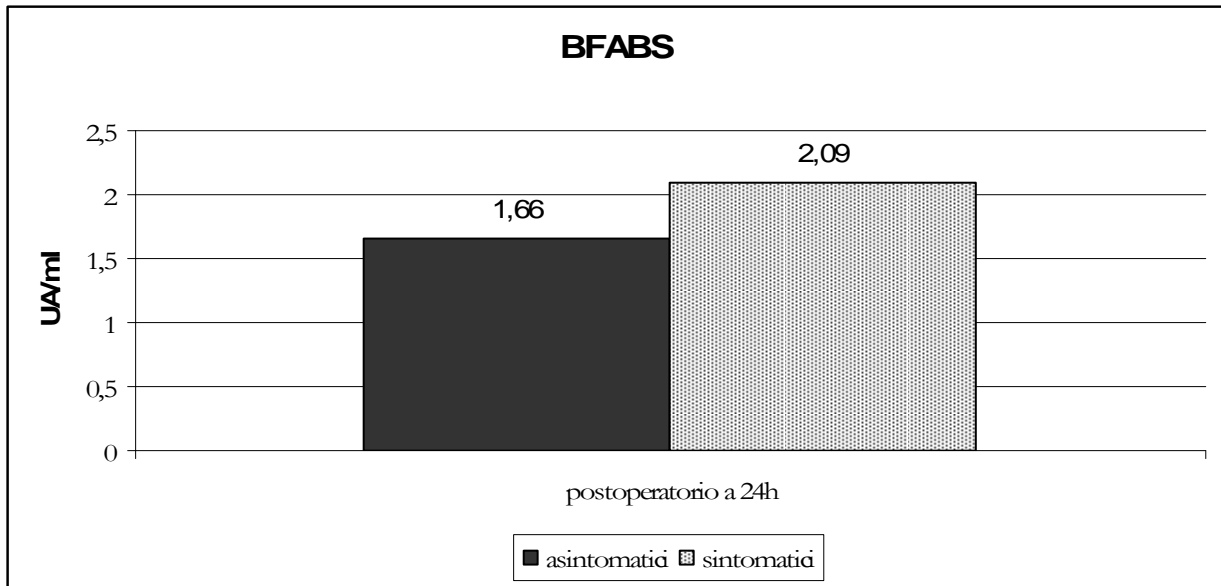


Figura 19: B FABPs nei pazienti asintomatici vs i sintomatici

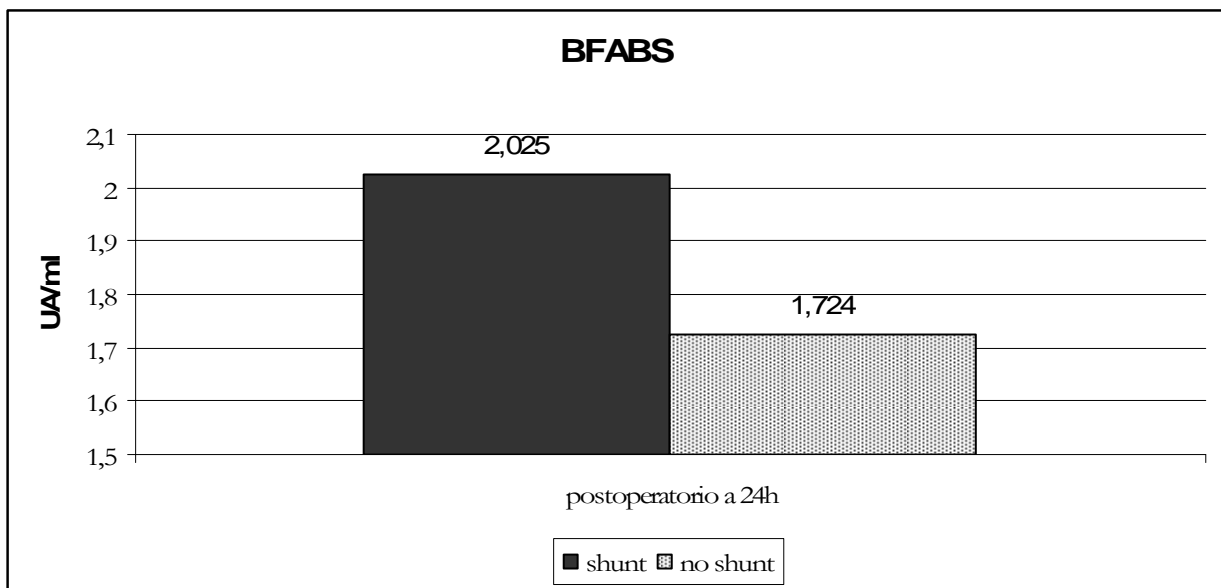


Figura 20: B FABPs nei pazienti con shunt vs i pazienti senza shunt

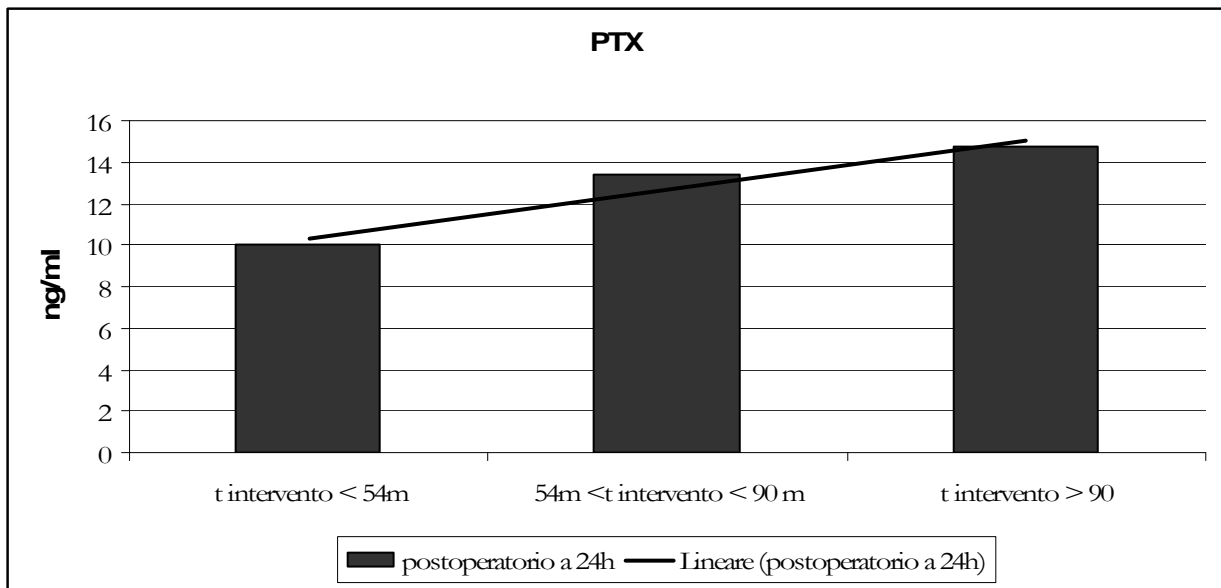


Figura 21: PTX3 in rapporto al tempo chirurgico

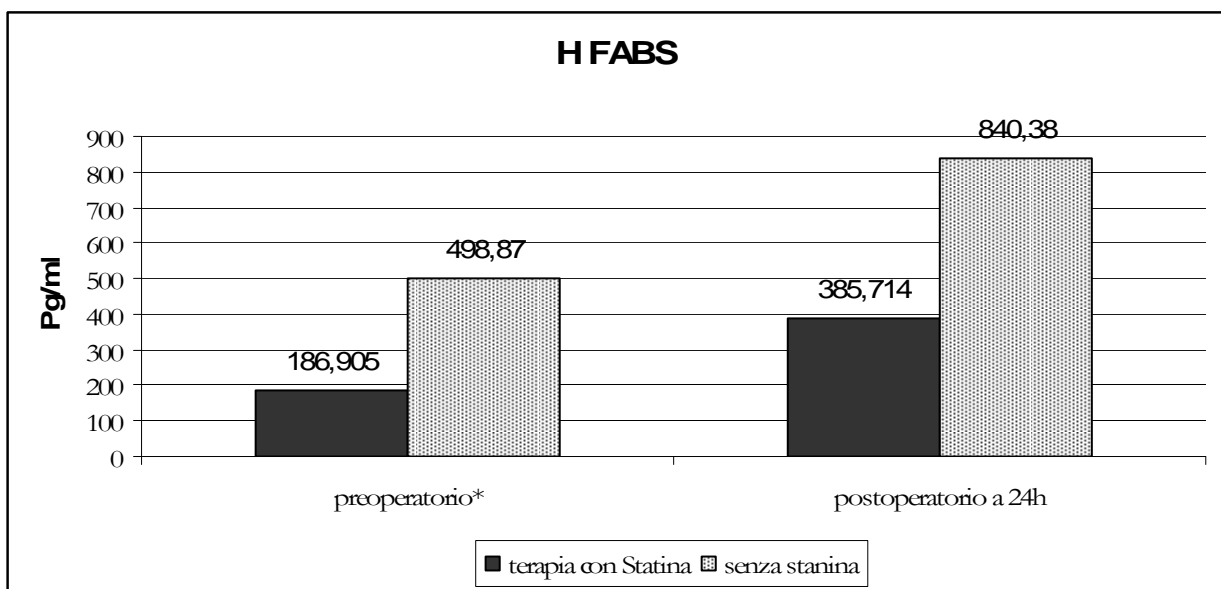


Figura 22: Valori delle H FABS nei pazienti con terapia statinica vs i pazienti non in terapia

* p = 0,046

DISCUSSIONE

La diagnosi di infarto miocardico acuto in cardiologia non può più prescindere dalla valutazione oggettiva dei valori di troponina. La diagnosi di danno neurologico si avvale della clinica e dell'esame obiettivo e delle metodiche di neuroimaging: non esiste ad oggi un marker certo di danno neurologico⁷¹.

Le Fatty Acid Binding Proteins sono delle proteine preposte al trasporto degli acidi grassi intracellulari di recente scoperta che hanno mostrato in area cardiologica una buona affidabilità nella determinazione dell'ischemia miocardica (Heart FABP)⁷¹; l'encefalo esprime le B(ain) FABPs che sono organo specifiche e le HFABPs che mostrano una cross reattività con le cellule miocardiche. Il danno neuronale è stato analizzato in pazienti con diagnosi di stroke da Zimmermann che ha studiato solamente le HFABPs ed ha evidenziato un innalzamento dei valori nei pazienti sintomatici⁶⁹; Wunderlich e Perlsers hanno evidenziato un picco consensuale di entrambe le proteine a partire dalla 2-3 ora dal sintomo esteso per 5 giorni⁷⁰.

L'unico Autore che ha isolato la proteina Brain da omogenato di cervello umano è stato Perlsers e l'ha utilizzata per creare degli anticorpi di coniglio e per creare una metodica home made⁶². L'Industria fornisce solamente l'anticorpo IgG policlonale di coniglio contro le B-FABPs ma non è in grado di fornire un procedimento per la sua utilizzazione né la proteina purificata per creare una curva di taratura. In Letteratura non sono descritte metodiche per dosare le BFABPs a partire da anticorpi policlonali.

In Letteratura la valutazione dello stato neurologico dei pazienti sottoposti a TEA carotidea rimane per lo più un dato clinico; alcuni autori hanno valutato lo stato del parenchima cerebrale mediante RMN ^{20, 28, 93}, altri mediante tests neuropsicologici³²; solo alcuni Autori sono andati al di là della clinica spingendosi al biomolecolare ricercando dei marcatori sierici di danno neurologico. Benedetti Valentini ha ricercato nel 2003 la proteina S100b confrontandola con tests neuro psicometrici³⁰; Falkensammer ha studiato la NSE e l'ha correlata con la S100b⁵⁵, mentre Palombo nel 2007 ha ricercato una correlazione tra la NSE e la IL-6 e la S100b nei pazienti sottoposti a TEA carotidea con o senza shunt.

In Letteratura non sono presenti altre esperienze che abbiano ricercato markers sierologici di danno ischemico silente in chirurgia carotidea.

Nel nostro studio abbiamo ideato una metodica home made per la quantificazione delle BFABPs: tale metodica, in assenza della proteina purificata ci ha permesso solamente di evidenziare i valori di assorbanza del complesso antigene- siero dei pazienti: abbiamo quindi espresso i valori in UA/mL. Per tale motivo la nostra metodica manca ancora di un reale cutoff.

Seppur con queste limitazioni la nostra metodica home made ci ha permesso di evidenziare che la popolazione sana (controlli negativi) non presenta BFABPs circolanti mentre per contro la popolazione di pazienti sottoposta ad intervento neurochirurgico con un danno cerebrale clinicamente evidente ha elevati valori di assorbanza (controlli positivi).

La popolazione di pazienti sottoposta a TEA carotidea ha mostrato un valore di UA/mL già elevato nel preoperatorio. A nostro avviso tale evidenza potrebbe essere attribuita ai noti fenomeni di microembolia che sono rilevabili con il TCD già nel preoperatorio dei pazienti candidati a TEA. Un'ulteriore spiegazione di tale dato può essere ricercata in uno stato di sofferenza ischemica cerebrale cronica in pazienti polivascolopatici, nel danno cronico alla barriera ematoencefalica o nella penumbra ischemica non rilevabili con le metodiche di neuroimaging: i dati della nostra casistica di 98 RMN PW/DW (non pubblicata) preoperatorie indicano una positività per microlesioni rilevabile con le comuni metodiche di neuroimaging solo nel 4% dei pazienti.

Sia i pazienti che hanno patito uno stroke postoperatorio che quelli che hanno necessitato il posizionamento dello shunt hanno evidenziato dei valori di UA/mL di BFABPs elevati rispetto al post operatorio della popolazione generale, più simile ai valori della categoria di pazienti sottoposti a neurochirurgia, sebbene il campione non sia abbastanza potente per supportare delle certezze statistiche.

La popolazione sottoposta a shunt presenta sia il meccanismo di danno emodinamico che quello embolico per presentare una positività: caduta dei livelli di saturazione cerebrale in corso di clampaggio ed elevato rate di lesioni cerebrali rilevate alla RMN DWI nella nostra casistica (18% nei pazienti shuntati vs 3,5% della popolazione non sottoposta a shunt).

Il fatto che nella popolazione generale i valori delle medie di UA/mL di BFABPs non si alterano dopo chirurgia mentre si innalzano in caso di danno cerebrale, è spiegabile evidentemente con il ridotto impatto della chirurgia carotidea sul parenchima cerebrale nel nostro campione quando non sottoposto a shunt.

I valori di UA/mL elevati rilevati nei pazienti sottoposti a chirurgia venosa mediante anestesia spinale (tutti i sieri sono stati prelevati dopo anestesia locale) sono paragonabili ai pazienti sottoposti a neurochirurgia: anche in questo caso seppur in assenza di evidenza statistica tale dato è espressione del danno arrecato al sacco durale ed alle cellule neuronali che, entrate in contatto con l'anestetico locale, possono avere liberato in circolo le B FABP.

Al contrario dei pazienti con un danno ischemico cerebrale franco che presentano un innalzamento dei valori di BFABPs e di PTX3 e CRP-16, l'analisi dei valori di PTX3 e di CRP-16 per i pazienti sottoposti ad anestesia spinale non ha evidenziato alcuno stress chirurgico espressione della selettività della BFABP per il danno neuronale.

In un caso abbiamo sottoposto a TEA carotidea una paziente affetta da epilessia: i valori di BFABPs si sono mantenuti stabilmente elevati sia nel pre che nel post operatorio.

Queste evidenze indicano che come già definito in Letteratura le BFABPs possono essere considerate un indice di danno neuronale.

Resta da spiegare il differente comportamento dell'altra proteina cerebrale nella popolazione generale: la HFABP, al contrario della BFABP che rimane stabile tra il pre ed il post operatorio, tende ad aumentare nel postoperatorio anche in assenza di evidenza di danno cerebrale.

È noto come le HFABPs abbiano un'elevata concentrazione nel miocardio e tale dato potrebbe essere spiegato con uno stress cardiaco indotto dall'intervento; infatti risulta stabilmente elevata in un paziente sottoposto a TEA carotidea staged rispetto a procedura di PTCA coronarica; l'evidenza che questa proteina sia presente anche nei muscoli striati⁷⁴ potrebbe fare supporre che l'innalzamento postoperatorio possa essere dovuto al traumatismo dello sternocleidomastoideo in corso di intervento.

Un'ulteriore spiegazione di questa discrepanza potrebbe essere identificata nella maggior attendibilità della metodica in commercio nel rilevare piccole variazioni di HFABPs rispetto alla nostra metodica home made.

L'evidenza che i pazienti cardiopatici, rispetto ai non cardiopatici, manifestino un'elevazione dei valori di HFABPs nel postoperatorio aumenta l'evidenza che questa metodica rilevi dei danni miocardici silenti. Purtroppo non abbiamo predisposto dei controlli dei valori di troponina I nei sieri di questi pazienti. In Letteratura non sono presenti dati riguardo l'HFABPs e l'ischemia miocardica silente né riguardo le variazioni che avvengono dopo un intervento chirurgico.

È noto l'effetto protettivo nei riguardi dell'IMA postoperatorio della terapia cronica con statine: sebbene non esista una significatività statistica dovuta alla bassa potenza del campione esaminato, nel nostro campione la terapia con statina ha evidenziato un effetto protettivo nei riguardi dell'elevazione dei valori del marker cardiaco rispetto alla popolazione generale.

Abbiamo analizzato l'andamento degli indici infiammatori per evidenziare lo stress chirurgico in corso di TEA carotidea mediante l'analisi dei valori di CRP-16, proteina dell'infiammazione prodotta principalmente dal fegato e di PTX3, a rapido rilascio a partire dalla sede di partenza dello stimolo. In letteratura sono presenti solo due lavori, per altro in disaccordo uno con l'altro, sulla possibilità di rilevare un innalzamento dei valori di PTX in seguito ad intervento chirurgico. Nel primo caso si tratta di donatori sani sottoposti a prelievo di rene ove si evidenziano un aumento dei valori di PTX⁸⁴. Nel secondo caso si tratta di pazienti sottoposti a cardiocirurgia: gli autori evidenziano nel gruppo off pump solo un moderato aumento dei valori di PTX3, mentre questi si innalzano molto nei pazienti sottoposti a CEC⁸⁵.

Per la prima volta descriviamo l'andamento della PTX3 in una popolazione sottoposta a TEA carotidea: curiosamente, come a supportare l'evidenza dell'innalzamento di HFABPs rispetto ai valori della popolazione sana, anche le PTX3 sono stabilmente elevate nei pazienti portatori di stenosi carotidea sia nel pre che nel post operatorio con valori triplicati rispetto ai controlli sani.

Tale fatto corrobora l'ipotesi che i pazienti affetti da stenosi carotidea possano avere un danno neuronale cronico.

L'innalzamento fugace delle PTX3 (della durata di solo 24 ore) conseguente all'intervento chirurgico è correlabile sia con la sua durata (trend non significativo), che con l'effetto protettivo della terapia statinica (picco di valori più elevato nei pazienti non protetti da statine) che con l'effetto ossidativo del fumo di sigaretta (picco più elevato dei valori nei pazienti fumatori al momento dell'intervento): tali dati evidenziano e sottolineano lo stress chirurgico in assenza comunque di danno permanente.

Infatti i pazienti con RMN preoperatoria positiva o che hanno patito un evento cerebrale nel postoperatorio, così come quelli sottoposti a chirurgia demolitiva neurochirurgica, evidenziano dei valori di PTX3 e di CRP-16 stabilmente più elevati nel tempo: tale dato è da

ascrivere più che ad un effetto infiammatorio passeggero ad espressione di un vero e proprio danno.

I valori di PTX3 che rientrano al livello preoperatorio in 48 ore rafforza l'ipotesi che l'intervento di TEA carotidea abbia avuto un ridotto impatto sul parenchima cerebrale della nostra popolazione in studio.

BIBLIOGRAFIA

1. Miniño AM, Heron MP, SB. Death Statistical Reports: preliminary data 2004. *Natl Vital Stat Rep* 2006;**54**(19): 1-49.
2. Pearson TA, Blair SN, Daniels SR, Eckel RH, Fair JM, Fortmann SP, Franklin BA, Goldstein LB, Greenland P, Grundy SM, Hong Y, Houston Miller N, Lauer RM, Ockene IS, Sacco RL, Sallis JF, Jr, Smith SC, Jr, Stone NJ, Taubert KA. AHA Guidelines for Primary Prevention of Cardiovascular Disease and Stroke: 2002 Update: Consensus Panel Guide to Comprehensive Risk Reduction for Adult Patients Without Coronary or Other Atherosclerotic Vascular Diseases. *Circulation* 2002;**106**(3): 388-391.
3. O'Leary D, Polak J, Kronmal R, Kittner S, Bond M, Wolfson S, Jr, Bommer W, Price T, Gardin J, Savage P. Distribution and correlates of sonographically detected carotid artery disease in the Cardiovascular Health Study. The CHS Collaborative Research Group. *Stroke* 1992;**23**(12): 1752-1760.
4. Biller J, Feinberg WM, Castaldo JE, Whittmore AD, Harbaugh RE, Dempsey RJ, Caplan LR, Kresowik TF, Matchar DB, Toole JF, Easton JD, Adams HP, Jr, Brass LM, Hobson RW, II, Brott TG, Sternau L. Guidelines for Carotid Endarterectomy : A Statement for Healthcare Professionals From a Special Writing Group of the Stroke Council, American Heart Association. *Stroke* 1998;**29**(2): 554-562.
5. Barnett HJM, Taylor DW, Eliasziw M, Fox AJ, Ferguson GG, Haynes RB, Rankin RN, Clagett GP, Hachinski VC, Sackett DL, Thorpe KE, Meldrum HE, Spence JD, The North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. Benefit of Carotid Endarterectomy in Patients with Symptomatic Moderate or Severe Stenosis. *N Engl J Med* 1998;**339**(20): 1415-1425.
6. Group ECSTC. Randomised trial of endarterectomy for recently symptomatic carotid stenosis: final results of the MRC European Carotid Surgery Trial (ECST). *the Lancet* 1998;**351**(9113): 1379-1387.
7. Mayberg MR, Wilson S.E., Yatsu F., Weiss D.G., Messina L., Hershey L.A., Colling C., Eskridge J., Deykin D., Winn H.R. Carotid endarterectomy and prevention of cerebral ischemia in symptomatic carotid stenosis. Veterans Affairs Cooperative Studies Program 309 Trialist Group. *JAMA* 1991;**266**(23): 3289-3294.
8. ACAS. Endarterectomy for asymptomatic carotid artery stenosis. Executive committee for the Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study *Jama* 1995;**237**: 1421-1428.
9. ACST. Prevention of disabling and fatal strokes by successful carotid endarterectomy in patients without recent neurological symptoms: randomised controlled trial. *The Lancet* 2004;**363**(9420): 1491-1502.
10. Mayo C. Results of a randomized controlled trial of carotid endarterectomy for asymptomatic carotid stenosis. Mayo Asymptomatic Carotid Endarterectomy Study Group. *Mayo Clinic Proceedings* 1992;**67**(6): 513-518.
11. Moore WS, Young B, Baker WH, Robertson JT, Toole JF, Vescera CL, Howard VJ, Investigators A. Surgical results: A justification of the surgeon selection process for the ACAS trial. *Journal of Vascular Surgery* 1996;**23**(2): 323-328.
12. Taylor DW, Barnett HJM, Haynes RB, Ferguson GG, Sackett DL, Thorpe KE, Simard D, Silver FL, Hachinski V, Clagett GP, Barnes R, Spence JD. Low-dose and high-dose acetylsalicylic acid for patients undergoing carotid endarterectomy: a randomised controlled trial. *The Lancet* 1999;**353**(9171): 2179-2184.
13. SPACE Collaborative Group RP, Allenberg J, Brückmann H, Eckstein HH, Fraedrich G, Hartmann M, Hennerici M, Jansen O, Klein G, Kunze A, Marx P, Niederkorn K, Schmiedt W, Solymosi L, Stingele R, Zeumer H, Hacke W. 30 day results from the SPACE trial of stent-protected angioplasty versus carotid endarterectomy in symptomatic patients: a randomised non-inferiority trial. *The Lancet* 2006;**368**(9543): 1239-1247.
14. Mas J-L, Chatellier G, Beyssen B, Branchereau A, Moulin T, Becquemin J-P, Larrue V, Lievre M, Leys D, Bonneville J-F, Watelet J, Pruvo J-P, Albuquer J-F, Viguier A, Piquet P, Garnier P, Viader F, Touze E, Giroud M, Hosseini H, Pillet J-C, Favrole P, Neau J-P, Ducrocq X, the EVA-3S Investigators. Endarterectomy versus Stenting in Patients with Symptomatic Severe Carotid Stenosis. *N Engl J Med* 2006;**355**(16): 1660-1671.
15. Yadav JS, Wholey MH, Kuntz RE, Fayad P, Katzen BT, Mishkel GJ, Bajwa TK, Whitlow P, Strickman NE, Jaff MR, Popma JJ, Snead DB, Cutlip DE, Firth BG, Ouriel K, Stenting t, Angioplasty with Protection in Patients at High Risk for Endarterectomy Investigators. Protected Carotid-Artery Stenting versus Endarterectomy in High-Risk Patients. *N Engl J Med* 2004;**351**(15): 1493-1501.

16. SICVE, Società, Italiana, di, Chirurgia, Vascolare, ed, Endovascolare, -, SICVE. Linee Guida alla TEA carotidea. *www.sicve.it* 2003.
17. Bond R, Rerkasem K, Rothwell PM. Routine or Selective Carotid Artery Shunting for Carotid Endarterectomy (and Different Methods of Monitoring in Selective Shunting). *Stroke* 2003;**34**(3): 824-825.
18. Tangkanakul C CC, Warlow C. Carptid Endarterectomy performed under local anaesthetic compared to general anaesthetic. *The Cochrane Library* 1996.
19. Uno M, Suzue A, Nishi K, Nagahiro S. Hemodynamic cerebral ischemia during carotid endarterectomy evaluated by intraoperative monitoring and post-operative diffusion-weighted imaging. *Neurological Research* 2007;**29**: 70-77.
20. Bendszus M, Stoll G. Silent cerebral ischaemia: hidden fingerprints of invasive medical procedures. *The Lancet Neurology* 2006;**5**(4): 364-372.
21. Zampieri f DGCBN, Guerra M, Caldarelli GF. et al. Aspetti di monitoraggio intraoperatorio del circolo cerebrale in "le carotidopatie extracraniche". *Minerva Medica*: pag 271-277.
22. Jansen CR, L; van Heesewijk, J. ; Moll, F. L. ; van Gijn, J.; Ackerstaff, R. G.A. Impact of Microembolism and Hemodynamic Changes in the Brain During Carotid Endarterectomy. *Stroke* 1994;**25**(5): 992-997.
23. Schnaudigel S, Groschel K, Pilgram SM, Kastrup A. New Brain Lesions After Carotid Stenting Versus Carotid Endarterectomy: A Systematic Review of the Literature. *Stroke* 2008;**39**(6): 1911-1919.
24. Javid H JO, Dye WS, Hunter JA, Najafi H, Goldin MD, Serry C, DeLaria GA. Seventeen-year experience with routine shunting in carotid artery surgery. *World Journal Of Surgery* 1979;**3**(2): 167-177.
25. Sloan MA. Prevention of Ischemic Neurologic Injury With Intraoperative Monitoring of Selected Cardiovascular and Cerebrovascular Procedures: Roles of Electroencephalography, Somatosensory Evoked Potentials, Transcranial Doppler, and Near-Infrared Spectroscopy. *Neurologic Clinics* 2006;**24**(4): 631-645.
26. Muller M BS, Walter P, Omlor G, Schimright K. Microembolic signals and intraoperative stroke in carotid endarterectomy. *Acta Neurol Scand* 1998;**97**: 110-117.
27. Bourke BM, Crimmins DS. Early control of the distal internal carotid artery during endarterectomy: Achievability and results. *Journal of Vascular Surgery* 2002;**36**(1): 70-74.
28. Muller M, Reiche W, Langenscheidt P, Hafeld J, Hagen T. Ischemia after Carotid Endarterectomy: Comparison between Transcranial Doppler Sonography and Diffusion-Weighted MR Imaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 2000;**21**(1): 47-54.
29. Hart JP, Peeters P, Verbist J, Deloose K, Bosiers M. Do device characteristics impact outcome in carotid artery stenting? *Journal of Vascular Surgery* 2006;**44**(4): 725-730.
30. Di Legge S. DPV, Di Stani F, Benedetti Valentini F et Al. . Carotid endarterectomy and gliofibrillar S100b protein release. . *Neurol Sci* 2003;**24**: 351-356.
31. Heyer EJ, Adams DC, Solomon RA, Todd GJ, Quest DO, McMahon DJ, Steneck SD, Choudhri TF, Connolly ES. Neuropsychometric Changes in Patients After Carotid Endarterectomy. *Stroke* 1998;**29**(6): 1110-1115.
32. De Rango P, Caso V, Leys D, Paciaroni M, Lenti M, Cao P. The Role of Carotid Artery Stenting and Carotid Endarterectomy in Cognitive Performance: A Systematic Review. *Stroke* 2008;**39**(11): 3116-3127.
33. Palombo D, Lucertini G, Mambrini S, Zettin M. Subtle Cerebral Damage after Shunting vs Non Shunting during Carotid Endarterectomy. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 2007;**34**(5): 546-551.
34. Els T BJ, Rhon G. Spermidine: a predictor for neurological outcome and infarct size in focal cerebral ischemia? *Stroke* 2001;**32**: 43-46.
35. Ingerbrigten T, Romner B. Biochemical serum markers of traumatic brain injury. *Journal of Trauma* 2002;**52**(798-808).
36. Lima J, Takayanagui O, Garcia L. Use of neuron-specific enolase for assessing the severity and outcome in patients with neurological disorders. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2004;**37**: 19-26.

37. Marchi N CM, Fazio V, Bhudia S, Hellene K, Janigro D. Peripheral markers of blood brain barrier damage. *Clin Chem Acta* 2004;**342**: 1-12.
38. Ehrlich BE, Diamond JM, Braun LD, Cornford EM, WH O. Effects of lithium on blood-brain barrier transport of the neurotransmitter precursors choline, tyrosine and tryptophan. *Brain Res* 1980;**14**(193): 604-607.
39. Kapural M, Benghez L, G B. S-100B as a possible serum marker for disruption on the blood- brain barrier. *Brain Res* 2002;**940**(2): 102-103.
40. Pluta R LA, Wisniewski HM. Abnormalities of the blood brain barrier in global cerebrale ischemia in rats due to experimental cardiac arrest. *Acta Neurochir Suppl* 1994; 60:274-6Pluta R, Lossinsky AS, Wisniewski HM, Abnormalities of the blood brain barrier in global cerebrale ischemia in rats due to experimental cardiac arrest. *Acta Neurochir Suppl* 1994;**60**: 274-276.
41. Barreguard L, Wikkelso C, LE R. Cerebrospinal fluid poroteins in men with chronic encephalopathy after exposure to organic solvents. *Scand J Work Environ Health* 1990;**16**: 423-427.
42. Conolly ES WC, Rampersard A, Heyer EJ. Serum S100B protein levels are correlated with subclinical neurocognitive declines after carotid endarterectomy. *Neurosurgery* 2001;**49**(5): 1076-1082.
43. Zimmer DB CE, Landar A, Song W. The S100 protein family: history, function and expression. *Brain Res Bull* 1995;**37**: 417.
44. Oleine T, Benes L, Zofel P. Studies of the brainspecificity of s100B and neuron-specific enolase (NSE) in blood serum of acute care patients. *Brain Research Bulletin* 2003;**61**: 265-279.
45. Woong CH RS, Bonser RS. S-100beta release in hypotermic circulatory arrest and coronary artery surgery. . *Annals of Thracic Surgery* 1999;**67**: 1911-1921.
46. Fassbender K. SR, Schneider A et al Leakage of brain originated proteins in peripheral blood: temporal profile and diagnostic value in early ischemic stroke. . *Journal of Neuroradiological Sciences* 1997;**148**: 101-105.
47. Lima JE TA, Leite JP. Serum and cerebrospinal fluid S100B concentration in patients with neurocysticercosis. *Brazilian Journal of Medica and Biological Research* 2006;**39**: 129-135.
48. Stranjalis G KS, Psachoulia C. Serum S-100B as an indicator of early postoperative deterioration after meningioma surgery. *Clinical Chemistry* 2005;**51**(1): 202-207.
49. Jackson RG SG, Radeliffe J, Price CP. The early fall in levels of S100 β in traumatic brain injury. *Clin Chem Lab Med* 2000;**38**: 1165-1167.
50. Missler U WM, Friedewrich C, Kaps M. S100 protein and neuron specific enolase concentration in blood as indicators fof infarction volume and prognosis in acute ischemic stroke. *Stroke* 1997;**28**: 1956-1960.
51. Abraha HD BR, Bath PMW, Wassif WS. Serum S100 protein, relationship to clinical outcome in acute stroke. *Ann Clin Biochem* 1997;**34**: 366-370.
52. Fletcher L RCTC. Enolase isoenzymes III chromatographic and immunological characteristics of rat brain enolase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1976;**452**: 245-252.
53. Marangos PJ SD. Neuron specific enolase, a clinically usefull marker for neurons and neuroendocrine cells. *Annual review of Neuroscienze* 1987;**10**: 269-295.
54. S. M. Wijeyaratne JC, M. Collins, J. Barth, S. Homer Vanniasinkam, A. I. D. Mavor, M. J. Gough,. Jugular venous neurone-specific enolase and s-100 levels after carotid endarterectomy under local or general anaesthesia. *British Journal of Surgery* 2001;**88**(4): 600.
55. Falkensammer J, Oldenburg WA, Andrea JH, Beate N, Otto P, Tanis F, Joseph K, Matthias B, Beate H, James FM, Albert GH, Thomas GB. Evaluation of Subclinical Cerebral Injury and Neuropsychologic Function in Patients Undergoing Carotid Endarterectomy. *Annals of vascular surgery* 2008;**22**(4): 497-504.
56. Juergen F, Oldenburg WA, Andrea JH, Beate N, Otto P, Tanis F, Joseph K, Matthias B, Beate H, James FM, Albert GH, Thomas GB. Evaluation of Subclinical Cerebral Injury and Neuropsychologic Function in Patients Undergoing Carotid Endarterectomy. *Annals of vascular surgery* 2008;**22**(4): 497-504.
57. Ho PW RD, Phan TG, Donnan GA et Al. Is white matter involved in patient entered into typical trials of neuroprotection? *Stroke* 2005;**36**: 2742-2744.

58. Glatz JF VdVG. Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance. *Prog Lipid Res* 1996;**35**: 243-282.
59. Schaap FG BB, Danneberg H, van der Vusse GJ, Glatz JF. Impaired long-chain fatty acid utilization by cardiac myocytes isolated from mice lacking the heart-type fatty acid binding protein gene. *Circ Res* 1999;**85**: 329-337.
60. Bass NM BM, Manning JA, Jones AL, Ockner RK. Acinar heterogeneity of fatty acid-binding proteins expression in the liver of male, female and clofibrate-treated rats. *Hepatology* 1989;**9**: 12-21.
61. Roos W, Eymann E, Symannek M, Duppenhaler J, Wodzig KW, Pelsers M, Glatz JF. Monoclonal antibodies to human heart fatty acid-binding protein. *J Immunol Methods* 1995;**183**(1): 149-153.
62. Pelsers MMAL, Hanhoff T, Van der Voort D, Arts B, Peters M, Ponds R, Honig A, Rudzinski W, Spener F, de Kruijk JR, Twijnstra A, Hermens WT, Menheere PPCA, Glatz JFC. Brain- and Heart-Type Fatty Acid-Binding Proteins in the Brain: Tissue Distribution and Clinical Utility. *Clin Chem* 2004;**50**(9): 1568-1575.
63. Pelsers M. M., Hermens W. T., F. GJ. Fatty acid-binding proteins as plasma markers of tissue injury. *Clin Chim Acta* 2005;**352**(1-2): 15-35.
64. Missler U WM, Ehlermann P, et al. Validation and comparison of two solid phase immunoassays for the quantification of S100B in Human Blood. *Clin Chem Lab Med* 2000;**46**(7): 993-996.
65. Lamers KJ VP, Verbeek MM, Rosmalen F, van Geel WJ, Engelen BG. Protein S100B, neuron specific enolase (NSE), myelin basic protein (MPB) and glial fibrillary acid protein (GFAP) in cerebrospinal fluid (CSF) and blood of neurological patients. *Brain Res Bull* 2003;**61**: 261-264.
66. Herрман M vP, Wunderlich MT, de Bruiji CH, Lamers KJ. Release of glial tissue specific proteins after acute stroke: a comparative study analysis of serum concentration of protein S100B and glial fibrillary acid protein. *Stroke* 2000;**31**: 2670-2677.
67. Pelsers MM HT, van der Voort D, Arts B, Peters M. Tissue specific types of fatty acid binding proteins, B and H FABP, as novel markers for detection of brain injury. *Clin Chem* 2004;**50**: 1568-1575.
68. Pelsers MM, Glatz JF. Detection of brain injury by fatty acid-binding proteins. *Clin Chem Lab Med* 2005;**43**(8): 802-809.
69. Zimmermann-Ivon CG. Fatty Acid Binding protein as a serum marker for the early diagnosis of stroke: a pilot study. *Mol Cell Proteomics* 2004;**3**(1): 66-72.
70. Wunderlich MT, Hanhoff T, Goertler M, Spener F, Glatz JFC, Wallesch CW, Pelsers MMAL. Release of brain-type and heart-type fatty acid-binding proteins in serum after acute ischaemic stroke. *Journal of Neurology* 2005;**252**(6): 718-724.
71. Lescuyer P AL, Hochstrasser DF, Sanchez JC. Heart-fatty acid-binding protein as a marker for early detection of acute myocardial infarction and stroke. *Mol Diagn* 2005;**9**(1): 1-7 Review.
72. Paulussen RJ vMH, Veerkamp JH. Immunochemical quantitation of fatty acid-binding proteins. Tissue distribution of liver and heart FABP types in human and porcine tissues. *Int J Biochem* 1990;**22**(4): 393-398.
73. Maatman RG, Westerlo EMvd, Kuppevelt THv, Veerkamp JH. Maatman RG, van de Westerlo EM, van Kuppevelt TH, Veerkamp JH. *Biochem J* 1992;**288**: 285-290.
74. Wodzig KW, Pelsers MM, van der Vusse GJ, Roos W, Glatz JF. One-step enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for plasma fatty acid-binding protein. *Ann Clin Biochem* 1997;**34** (Pt 3): 263-268.
75. de Groot MJM, Wodzig KWH, Simoons ML, Glatz JFC, Hermens WT. Measurement of myocardial infarct size from plasma fatty acid-binding protein or myoglobin, using individually estimated clearance rates. *Cardiovasc Res* 1999;**44**(2): 315-324.
76. van der Voort D, Pelsers MM, Korf J, Hermens WT, Glatz JF. Development of a displacement immunoassay for human heart-type fatty acid-binding protein in plasma: the basic conditions. *Biosens Bioelectron* 2003;**19**(5): 465-471.
77. Rolph MS, Zimmer S, Bottazzi B, Garlanda C, Mantovani A, Hansson GK. Production of the Long Pentraxin PTX3 in Advanced Atherosclerotic Plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;**22**(5): e10-14.
78. Alma J, Nauta BB, Alberto Mantovani, Giovanni Salvatori, Uday Kishore, Wilhelm J. Schwaeble, Alexandre R. Gingras, Sotiria Tzima, Fernando Vivanco, Jesús Egado, Odette Tijssma, Erik C. Hack, Mohamed R. Daha, Anja Roos., Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q. *European Journal of Immunology* 2003;**33**(2): 465-473.

79. Alles V, Bottazzi B, Peri G, Golay J, Introna M, Mantovani A. Inducible expression of PTX3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes. *Blood* 1994;**84**(10): 3483-3493.
80. Garlanda C, Bottazzi B, Bastone A, Mantovani A. Pentraxins at the crossroads between immunity, inflammation, matrix deposition and female fertility. *Annual Review of Immunology* 2005;**23**(1): 337-366.
81. Bassi N, Zampieri S, Ghirardello A, Tonon M, Zen M, Cozzi F, Doria A. Pentraxins, Anti-pentraxin Antibodies, and Atherosclerosis. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*.
82. Mantovani A, Garlanda C, Bottazzi B, Peri G, Doni A, Martinez de la Torre Y, Latini R. The long pentraxin PTX3 in vascular pathology. *Vascular Pharmacology* 2006;**45**(5): 326-330.
83. Peri G, Introna M, Corradi D, Iacuiti G, Signorini S, Avanzini F, Pizzetti F, Maggioni AP, Moccetti T, Metra M, Cas LD, Ghezzi P, Sipe JD, Re G, Olivetti G, Mantovani A, Latini R. PTX3, A Prototypical Long Pentraxin, Is an Early Indicator of Acute Myocardial Infarction in Humans. *Circulation* 2000;**102**(6): 636-641.
84. Hampel DJ, May G, Reinke P, Schindler R. Living kidney donation: anemia and inflammation in the early postoperative period. *Transplant Proc* 2006;**38**(3): 661-663.
85. Kunes P, Lonsky V, Mandak J, Kolackova M, Andrys C, Kudlova M, Krejssek J. The long pentraxin 3 in cardiac surgery: Distinct responses in on-pump and off-pump patients. *Scandinavian Cardiovascular Journal* 2007;**41**(3): 171 - 179.
86. Ridker PM. Clinical Application of C-Reactive Protein for Cardiovascular Disease Detection and Prevention. *Circulation* 2003;**107**(3): 363-369.
87. Boehme M, Kachne F, Kuehne A, Bernhardt W, Schroder M, Pommer W, Fischer C, Becker H, Muller C, Schindler R. Pentraxin 3 is elevated in haemodialysis patients and is associated with cardiovascular disease. *Nephrol Dial Transplant* 2007;**22**(8): 2224-2229.
88. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, Aspirin, and the Risk of Cardiovascular Disease in Apparently Healthy Men. *N Engl J Med* 1997;**336**(14): 973-979.
89. Hashimoto H, Kitagawa K, Hougaku H, Shimizu Y, Sakaguchi M, Nagai Y, Iyama S, Yamanishi H, Matsumoto M, Hori M. C-Reactive Protein Is an Independent Predictor of the Rate of Increase in Early Carotid Atherosclerosis. *Circulation* 2001;**104**(1): 63-67.
90. Corrado E, NS. High sensitivity of C-reactive protein in primary prevention. *G Ital Cardiol* 2007;**8**(6): 327-334.
91. Pepys MB, Hirschfield GM, Tennent GA, Ruth Gallimore J, Kahan MC, Bellotti V, Hawkins PN, Myers RM, Smith MD, Polara A, Cobb AJA, Ley SV, Andrew Aquilina J, Robinson CV, Sharif I, Gray GA, Sabin CA, Jenvey MC, Kolstoe SE, Thompson D, Wood SP. Targeting C-reactive protein for the treatment of cardiovascular disease. *Nature* 2006;**440**(7088): 1217-1221.
92. 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 American Heart Association. *Circulation* 2003;**107**(3): 499-511.
93. Skjelland M, Krohg-Sorensen K, Tennoe B, Bakke SJ, Brucher R, Russell D. Cerebral Microemboli and Brain Injury During Carotid Artery Endarterectomy and Stenting. *Stroke* 2009;**40**(1): 230-234.