



**SAPIENZA**  
UNIVERSITÀ DI ROMA

Dipartimento di Scienze e Biotecnologie Medico-Chirurgiche  
Sezione Neurologia  
UOS Diagnostica Neurovascolare

DOTTORATO DI RICERCA IN  
NEUROSCIENZE SPERIMENTALI E CLINICHE- XXIV CICLO

Effetto a lungo termine dell'atorvastatina sulla  
morfologia della placca carotidea nei pazienti con  
primo TIA e/o ictus: studio controllato randomizzato.

Coordinatore:

Prof. Alfredo Berardelli

Relatore:

Prof.ssa Patrizia Giacomini

Dottorando:

dott. Claudio Vento  
matr. n. 680835

Anno accademico 2011-2012

## **Indice.**

### **Cap. 1: L'impatto dell'aterosclerosi nella patologia cerebrovascolare**

#### *Par. 1.1 Classificazione e sottotipi di ictus:*

- 1.1.1 Cenni di epidemiologia dell'ictus: dimensione del problema pag. 5
- 1.1.2 Classificazione dell'ictus pag. 6
- 1.1.3 Fattori di rischio e patogenesi dell'ateroma pag.14

### **Cap. 2: Metodiche ultrasonografiche**

#### *Par. 2.1 Ultrasonografia e morfologia della placca carotidea* pag. 19

#### *Par. 2.2 Ultrasonografia carotidea e stroke: l'analisi GSM* pag. 23

### **Cap. 3: La prevenzione secondaria con statine**

#### *Paragrafo 3.1 L'atorvastatina e lo studio SPARCL* pag. 27

**Presupposti e scopo del lavoro** pag. 30

**Materiali e metodi** pag. 32

**Risultati** pag. 35

**Discussione** pag. 39

**Bibliografia.** pag. 44

## **Introduzione.**

L'ictus (o stroke) cerebrale rappresenta la seconda causa di morte a livello mondiale e la terza causa di morte nei paesi industrializzati, dopo le malattie cardiovascolari ed i tumori (1). L'ictus costituisce anche la prima causa di disabilità nell'anziano con un rilevante impatto individuale, familiare e sociosanitario (2, 3, 4). E' inoltre la seconda causa più comune di demenza, la causa più frequente di epilessia negli anziani ed una causa frequente di depressione (8, 9). Nonostante la tendenza osservata negli ultimi 30 anni ad una riduzione dell'incidenza di ictus cerebrale nei paesi occidentali (5), l'aumento dell'aspettativa di vita media ha comportato in realtà una stabilizzazione del numero di nuovi casi ed è previsto un ulteriore aumento nei prossimi venti anni (6), attribuibile alla crescente industrializzazione globale ed ai non corretti stili di vita. Il contributo negativo dipendente dalle abitudini scorrette e dall'aumentata prevalenza dei fattori di rischio modificabili sottolinea l'importanza delle campagne di informazione e prevenzione che possono tradursi in una significativa diminuzione della mortalità e della disabilità a lungo termine (7). Il sempre maggiore ruolo protettivo delle corrette abitudini alimentari e dell'attività fisica si somma alle strategie farmacologiche di prevenzione primaria e secondaria, instaurando un possibile circolo virtuoso che rappresenta un goal importante nella pianificazione dei sistemi sanitari nazionali. La rinnovata attenzione per la malattia cerebrovascolare ha portato negli ultimi 20 anni ad un progresso tecnologico e gestionale sfociato nella costituzione delle stroke unit di vario livello ed ha implementato l'impegno

della comunità scientifica e delle aziende farmaceutiche nello sviluppo di nuove strategie terapeutiche (6, 7, 8). In questa direzione si inserisce il sempre maggior interesse per il ruolo degli inibitori dell'enzima 3-idrossi-metilglutaril-coenzimaA-reduttasi (3HMGCoA-reduttasi o statine), attualmente ampiamente utilizzati nell'ambito delle patologie cardio- e cerebro-vascolari. Al di là della loro nota efficacia nella riduzione dei livelli plasmatici di colesterolo totale, le statine sembrano avere un'azione pleiotropica non ancora del tutto nota che potrebbe giustificare un'efficacia preventiva indipendente dal trattamento dell'assetto lipidico (10).

## **Capitolo 1. L'impatto dell'aterosclerosi nella patologia cerebrovascolare.**

### *Par. 1.1 Classificazione e sottotipi di ictus*

#### 1.1.1 Cenni di epidemiologia dell'ictus: definizione del problema

Indipendentemente dalla classificazione utilizzata, l'ictus cerebrale viene distinto in una forma ischemica che interessa circa l'80% dei casi ed una forma emorragica in circa il 20%, questi ultimi ulteriormente suddivisi in emorragie intraparenchimali (15%) ed emorragie subaracnoidee (3% circa) (11). Una piccola percentuale, circa l'1-2%, rientra nella categoria degli ictus "non classificabili". Nel principale studio epidemiologico italiano, l'Aquila Stroke Registry, l'incidenza di nuovi casi di ictus è compreso tra 1,31 e 2,94 casi per 1000 soggetti/anno per il tipo ischemico e tra 0,30 e 0,43 per 1000/anno per l'emorragia intraparenchimale, laddove l'emorragia subaracnoidea ha un incidenza significativamente inferiore (0,05-0,17 per 1000/anno) (12). I principali fattori predittivi evidenziati del rischio cerebrovascolare sono l'avanzata età anagrafica, con età media all'esordio di circa 65 anni per i maschi e 75 anni per le femmine e la differenza di genere con una prevalenza maggiore degli eventi ischemici e delle forme intraparenchimali nei maschi, contro una presenza di emorragie subaracnoidee maggiore nelle femmine. Di conseguenza, gli studi su popolazione hanno evidenziato una ulteriore stratificazione per fasce di età per cui l'emorragia subaracnoidea ha un picco di incidenza medio intorno ai 45-50 anni, le emorragie intraparenchimali tra i 50 ed i 60 anni e le forme ischemiche dopo i 65 anni (12, 13, 14).

L'età dunque è un fattore decisivo nella genesi dell'ictus con un aumento del rischio direttamente proporzionale all'avanzare degli anni ed una influenza diretta dei precedenti eventi cerebrovascolari. Dall'analisi dei dati dello studio ILSA, basato sul censimento demografico del 2001, emerge come l'incidenza di nuovi casi aumenti bruscamente dopo il 65esimo anno di età, attestandosi intorno a circa 200.000 nuovi casi di ictus/anno sull'intera popolazione italiana. Di questi, circa l'80% sono rappresentati da primi eventi ed il 20% da recidive (15). Lo stesso studio ha evidenziato come il rischio di un nuovo episodio ictale sia massimo nel primo mese dall'evento acuto per poi aumentare ad un anno di distanza. Infatti, il tasso di mortalità dell'ictus ischemico nei primi trenta giorni è di circa il 20%, per poi attestarsi intorno al 30% circa ad un anno. Allo stesso modo le emorragie intraparenchimali e subaracnoidee presentano rispettivamente una percentuale di mortalità del 30% e 40% in acuto per poi arrivare al 50% e 45% ad un anno di distanza. I pazienti che sopravvivono in un terzo dei casi sono gravati da seria disabilità, necessitando di cure ed assistenza continue con importanti ripercussioni sui costi diretti ed indiretti legati a questa patologia (15).

### 1.1.2 Classificazione dell'ictus

Secondo la World Health Organization (WHO), l'ictus è definito come l'improvvisa comparsa di segni e/o sintomi riferibili a deficit neurologico focale e/o globale della durata superiore alle 24 ore o ad esito infausto, non attribuibile ad altra causa apparente se non a vasculopatia cerebrale (16). Indipendentemente dal tipo di ictus, si fa riferimento dunque ad un quadro di sofferenza acuta del sistema

nervoso centrale che nella maggior parte dei casi dipende da una riduzione focale o globale del flusso ematico cerebrale (ischemia). Le forme ischemiche sono divise a loro volta in attacco ischemico transitorio (transient ischemic attack, TIA) ed ictus minore e maggiore (rispettivamente Minor e Major Stroke) (11, 16). Il TIA si differenzia dall'ictus per la minore durata (risoluzione entro le 24 ore dall'esordio, in media 15 minuti) e per l'assenza di lesioni rilevabili alle neuroimmagini. La maggior parte dei TIA si risolve entro le prime ore con un aumento della percentuale di trasformazione in stroke direttamente proporzionale al tempo trascorso dall'esordio dei sintomi. Nei primi 90 giorni dopo un TIA, una percentuale di soggetti variabile rispetto agli studi va incontro ad un aumento fino al 12% del rischio di stroke, percentuale che rimane elevata ed aumenta esponenzialmente con il passare degli anni anche a carico degli altri distretti vascolari (17, 18). Il rischio di sviluppare un ictus secondariamente ad un TIA può essere clinicamente previsto in acuto grazie al punteggio ABCD2 score che tiene conto delle variabili predittive positive per la trasformazione in stroke, quali età, pressione arteriosa, caratteristiche cliniche del TIA, durata e diabete mellito. Recentemente è stato proposto di modificare tale punteggio inserendo anche la positività in acuto alla risonanza magnetica in diffusione (DWI) e la valutazione ultrasonografica delle lesioni carotidee (19). La distinzione fra ictus minore (Minor stroke) e ictus maggiore (Major stroke) è subordinata alla gravità degli esiti clinici, dal momento che il Minor stroke presenta conseguenze cliniche di scarso o nullo significato funzionale a fronte degli esiti permanenti o letali del Major stroke. Oltre al criterio temporale, possono essere utilizzate ulteriori classificazioni che tengano conto della sede/estensione della lesione o della fisiopatologia dell'evento.

In ambito clinico e negli studi di follow-up, quelle maggiormente utilizzate si basano rispettivamente sui criteri dell'Oxfordshire Community Stroke Project (OCSP) o di Bamford o sui i criteri del Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST).

L'OCSP valuta in acuto il quadro clinico neurologico e la possibile diagnosi di sede neurologica come elementi chiave nel determinismo di uno stroke, ottenendo una classificazione anatomo-clinica che include:

- l'ictus completo del circolo anteriore (TACI), caratterizzato controlateralmente da un'emiplegia completa associata ad un'emianopsia laterale e/o ad un disturbo di una funzione corticale superiore (per esempio afasia o disturbo visuo-spaziale) in assenza o meno di alterazioni dello stato di coscienza;
- l'ictus parziale del circolo anteriore (PACI), caratterizzato dall'associazione di diverse combinazioni cliniche quali un deficit sensitivo-motorio controlaterale alla lesione associato ad un disturbo visivo emianoptico, sempre controlaterale; un deficit sensitivo-motorio controlaterale alla lesione associato alla presenza di una nuova compromissione di una funzione cognitiva superiore; nuova compromissione di una funzione cognitiva superiore associata ad un'emianopsia controlaterale alla lesione; deficit sensitivo-motorio puro ma meno esteso di una sindrome lacunare (per esempio una monoparesi); deficit isolato di una funzione cognitiva superiore;
- l'ictus del circolo posteriore (POCI) con paralisi monolaterale di almeno un nervo cranico associato ad emiparesi sensitiva o motoria controlaterale o bilaterale, paralisi coniugate di sguardo in orizzontale o in verticale, atassia

- cerebellare senza interessamento delle vie lunghe sensitive, emianopsia isolata, cecità corticale ed altri segni e sintomi attribuibili al circolo vertebro-basilare;
- l'ictus lacunare (LACI), caratterizzato dalla presenza di un deficit sensitivo-motorio o motorio puro o sensitivo puro oppure una emiparesi atassica (inclusa la sindrome della mano goffa-disartria e la sindrome atassia omolaterale-paresi crurale) in assenza di una compromissione delle funzioni cognitive superiori (afasia, disturbi visuo-spaziali) o del tronco encefalo (20).

I criteri eziologici del TOAST prevedono la suddivisione degli ictus in cinque categorie la cui definizione ha anche un valore prognostico.

- 1) patologia dei grossi vasi (large arteries atherosclerosis o LAA)
- 2) cardioembolismo (CE)
- 3) occlusione dei piccoli vasi con infarto lacunare (small arteries occlusion, SAO)
- 4) altri ictus da causa determinata (DET)
- 5) ictus da causa indeterminata (UND).

Le critiche recentemente poste ai criteri TOAST fanno riferimento soprattutto a possibili meccanismi non del tutto chiari dal punto di vista fisiopatologico, come ad esempio l'ictus associato a pervietà del forame ovale che viene classificato come cardioembolico pur non essendo certa tale eziologia (21). D'altronde, il principale vantaggio di questa classificazione è quello di facilitare gli algoritmi diagnostico-terapeutici già dalla fase precoce.

Ai fini di questa tesi, ci si è soffermati sulla descrizione dei LAA, cui appartengono tutti quegli ictus secondari a fenomeni di aterosclerosi ed aterotrombosi con meccanismo steno-occlusivo a carico dei vasi epiaortici o dei più piccoli vasi

intracerebrali. L'aterosclerosi è un processo infiammatorio-degenerativo della parete vascolare che coinvolge più frequentemente il territorio carotideo e i grossi vasi del poligono di Willis, più raramente il sistema vertebro-basilare. Sia l'occlusione del vaso stenotico per un processo di trombosi acuta che il fenomeno del cosiddetto "artery to artery embolism" determinano un infarto del territorio cerebrale a valle. La scarsità dei rami arteriosi collaterali e la velocità con cui si genera il processo steno-occlusivo giocano un ruolo fondamentale nel determinare l'estensione e la gravità della lesione (21).

Altre cause meno frequenti di patologia dei grossi vasi sono rappresentati da:

- dissezioni dei vasi del collo (sCAD), spontanee o post-traumatiche che prevalgono sotto i 45 anni in entrambi i sessi;
- abuso di sostanze, quali cocaina, amfetamine ed eroina;
- la displasia fibromuscolare (FMD), causa rara di patologia dei grossi vasi che si presenta come un'arteropatia non infiammatoria segmentale delle arterie di grosso e medio calibro, ad eziologia sconosciuta che colpisce prevalentemente soggetti giovani di sesso femminile;
- l'iperomocisteinemia con omocistinuria (con valori ematici di omocisteina >100 mcMol/L), solitamente dovuta a deficit di cistationina-b-sintetasi (CBS), enzima vitamina B6-dipendente che interviene nel metabolismo della metionina o in maniera meno univoca, secondari alla presenza di polimorfismi genetici per il gene MTHFR (metiltetraidrofolato-reduttasi) che interviene nel cosiddetto pathway di rimetilazione riconvertendo l'omocisteinemia in metionina grazie al cofattore metilcobalamina;

- vasculiti cerebrali, di natura necrotizzante (panarterite nodosa) o in corso di patologie del collagene su base autoimmunitaria come il lupus eritematoso sistemico (LES) o l'artrite reumatoide (AR)
- sindrome da anticorpi antifosfolipidi (APS);
- sindrome di Moya-Moya, a carattere poligenico con interessamento bilaterale del circolo carotideo intra ed extracranico e caratteristica formazione di una rete irregolare di sottili vasi arteriosi che si sviluppa nella regione dei gangli della base, in prossimità del circolo di Willis;
- anemia a cellule falciformi, frequente causa di ictus nel bambino e la più frequente causa di ictus pediatrico nella razza nera (22).

Il meccanismo cardioembolico (CE) è sotteso da una serie di condizioni cardiologiche (cardiopatie emboligene) che predispongono allo sviluppo di una patologia cerebrovascolare quali:

- 1) fibrillazione atriale, flutter atriale, malattia del nodo del seno
- 2) infarto miocardico recente ( $\leq 6$  settimane dall'ictus)
- 3) acinesia segmentale
- 4) trombo cardiaco
- 5) vegetazioni valvolari o endocardite documentata
- 6) protesi valvolare cardiaca
- 7) cardiomiopatia dilatativa
- 8) embolia paradossa (shunt destra-sinistra ed embolia venosa o sistemica)
- 9) prolasso valvolare mitralico senza evidenza di trombo
- 10) pregresso infarto miocardico ( $>6$  settimane dall'ictus) senza altre anomalie
- 11) segmento ipocinetico

- 12) calcificazioni anulari mitraliche
- 13) shunt destra-sinistra isolato
- 14) altre possibili cause di embolia (da specificare).

Gli ictus cardioembolici presentano alcune caratteristiche clinico-diagnostiche peculiari come un danno maggiormente esteso a carico del circolo carotideo o vertebro-basilare e le dimensioni superiori a 1,5 cm degli infarti alle neuroimmagini (21).

Una sofferenza dei piccoli vasi determina di solito ictus lacunari (SAO) caratterizzati dall'interessamento di rami più periferici del circolo carotideo e vertebro-basilare con lesioni di diametro massimo di 1,5 cm. I fattori di rischio principali per lo sviluppo di SAO sono rappresentati dall'ipertensione arteriosa e dal diabete mellito che determinano un quadro neuropatologico caratteristico di lipoalinosi, termine che si riferisce ad una alterazione distruttiva a carico del complesso mio-intimale delle arterie di piccolo calibro determinante una necrosi fibrinoide ed una sclerosi infiammatoria delle strutture subendoteliali. Tutto ciò si traduce nel tempo con lo sviluppo di una patologia trombo-ostruttiva a carico dei piccoli vasi con conseguenziale infarto del territorio a valle (21).

Le altre patologie che possono contribuire allo sviluppo di infarti lacunari sono di più raro riscontro e sono rappresentate da:

- malattie autoimmuni multisistemiche con impegno dei piccoli vasi;
- la malattia di Fabry, rara malattia lisosomiale multisistemica trasmessa con modalità X-linked, in cui l'inattività dell'enzima alfa-galattosidasi A si traduce in un accumulo di glicosfingolipidi;

- l'arteriopatia cerebrale autosomica dominante con infarti sottocorticali e leucoencefalopatia (CADASIL) legata all'alterazione del gene NOTCH3 sul cromosoma 19 e la sua variante recessiva CARASIL ad etiologia ignota;
- l'encefalomiopatia mitocondriale con acidosi lattica ed episodi a tipo ictus (MELAS), rara condizione causata prevalentemente da una mutazione nell'RNA transfert mitocondriale in posizione 3243;
- la vasculopatia retinica autosomica dominante associata a leucodistrofia cerebrale o AD-RVLC, rara endoteliopatia associata alla mutazione della DNA-3'-5'-esonucleasi TREX-1, le cui principali manifestazioni cliniche sono caratterizzate da retinopatia, nefropatia ed ictus ricorrenti;
- la HEMID (Hereditary Multi Infarct Dementia) quasi indistinguibile dalla CADASIL se non per l'assenza di lesioni a livello dei lobi temporali e per un interessamento frequente della regione pontina;
- la PADMAL (Pontine Autosomal Dominant Microangiopathy and Leukoencephalopathy) con ictus lacunari ingravescenti che portano più lentamente rispetto alla HEMID verso un quadro di tertraparesi spastica con anartria e disfagia nelle fasi finali e con un importante interessamento del troncoencefalo, soprattutto a livello del ponte;
- l'angiopatia amiloide cerebrale (CAA) che comprende un gruppo eterogeneo di encefalopatie caratterizzate dall'accumulo di materiale congofilo e deposito segmentale di sostanza amiloide nella parete dei vasi (amiloidosi) a livello della lamina media delle arterie e delle vene corticali e leptomeningee.

- la sindrome di Susac, ad eziologia sconosciuta forse autoimmunitaria, caratterizzata dalla triade clinica di encefalopatia, sordità ed occlusione delle arterie retiniche.
- la PRES (Posterior Reversible Encephalopathy Syndrome) esclusiva del circolo vertebro-basilare e prevalente nel sesso femminile e nel post-partum (22).

### 1.1.3 Fattori di rischio e patogenesi dell'ateroma

L'aterosclerosi è un processo patologico sistemico su base infiammatoria e degenerativa che coinvolge diversi distretti vascolari, in particolar modo le arterie coronarie, le arterie carotidi, le arterie intracraniche, l'arco aortico, l'aorta discendente, le arterie renali e le arterie degli arti inferiori (23, 24).

I principali fattori di rischio per lo sviluppo di aterosclerosi possono essere suddivisi in fattori di rischio non modificabili e fattori di rischio modificabili. Per fattori di rischio non modificabili si intendono l'età (con progressione dell'aterosclerosi in funzione del passare degli anni) , il sesso (prevalenza maggiore nel sesso maschile rispetto al femminile fino all'età della menopausa) in e la predisposizione genetica (familiarità), verosimilmente correlata all'ereditarietà poligenica di polimorfismi non del tutto noti. I principali fattori di rischio modificabili sono invece rappresentati da ipertensione arteriosa, diabete mellito e sindrome metabolica, ipercolesterolemia, fumo di sigaretta, scorretto stile di vita (obesità, inattività fisica, dieta aterogena). Tra i fattori di rischio emergenti in grado di intervenire sulla progressione delle lesioni aterosclerotiche

e sull'instabilità della placca, sembrano avere un ruolo preponderante l'iperomocisteinemia, l'infiammazione e il carico infettivo (24, 25).

Numerosi studi anatomico-patologici hanno evidenziato l'importanza dell'infiltrato infiammatorio a livello dell'ateroma nel determinare la vulnerabilità della placca. I principali markers infiammatori chiamati in causa come proaterogeni o come fattori di rischio di eventi vascolari includono la proteina C reattiva (PCR), il fibrinogeno, l'elastasi leucocitaria, l'IL-6, la fosfolipasi A2 associata alle lipoproteine, la mieloperossidasi (MPO). In particolare la proteina C-reattiva (PCR), fattore di fase acuta dell'infiammazione sembra essere un importante predittore di infarto del miocardio e di ictus e la sua determinazione quantitativa, insieme alla valutazione standard dei fattori metabolici (livelli glicemici, assetto lipidico, omocisteinemia) contribuisce alla definizione del rischio globale per eventi vascolari. Per carico infettivo si intende l'esposizione cronica o passata a infezioni comuni, in particolare modo a *Chlamydia pneumoniae*, Citomegalovirus, *Helicobacter pylori* e Herpes virus 1 e 2 che sembrano essere coinvolti nell'innescare di fenomeni flogistici focali a livello della placca (24, 25, 26).

La stria lipidica rappresenta la lesione più precoce del processo aterosclerotico e sembra essere determinata dall'accumulo locale di lipoproteine a bassa densità (LDL) a livello dell'intima, processo favorito dall'incremento del colesterolo totale plasmatico (24). Il legame delle LDL a componenti della matrice extracellulare come i proteoglicani ne facilita il sequestro all'interno dell'intima dove questi non subiscono l'azione dei meccanismi antiossidanti plasmatici. In questo contesto, i fenomeni di ossidazione/perossidazione e di glicazione non enzimatica (nei soggetti diabetici) determinano alterazioni morfologiche delle lipoproteine che

sembrano scatenare una risposta infiammatoria locale alla base degli stadi successivi della formazione della lesione (26). Il reclutamento dei leucociti infatti sembra rappresentare il passaggio successivo della formazione della stria lipidica. Al reclutamento dei leucociti partecipano molecole di adesione espresse dalle cellule endoteliali (VCAM 1, ELAM, ICAM) la cui espressione è favorita dalle stesse lipoproteine ossidate (27). Laddove in presenza di un flusso ematico laminare l'espressione delle molecole di adesione leucocitarie sembra essere inibita, nelle zone di flusso turbolento (biforcazioni, ramificazioni...) intervengono forze emodinamiche in grado di aumentare lo stress parietale (arterial stiffness) che induce meccanicamente i processi infiammatori, influenzando direttamente lo sviluppo delle lesioni aterosclerotiche (24). L'intervento dei monociti-macrofagi nell'intima rappresenta un tentativo di riparazione che si converte in un passaggio fondamentale dell'aterogenesi (24, 27). L'endocitosi di lipoproteine perossidate da parte di questi ultimi determina la formazione di cellule schiumose ricche di lipidi che possono andare incontro ad un processo di apoptosi con conseguente formazione di un nucleo (core) necrotico ricco di lipidi all'interno della lesione, caratteristico delle placche aterosclerotiche più complesse (26, 27). Alcuni fattori di crescita o citochine elaborati dai fagociti mononucleati o stimolati dalle lipoproteine modificate sono in grado di stimolare la proliferazione delle cellule muscolari lisce e la loro migrazione nell'intima con produzione di matrice extracellulare, evento chiave nella progressione della lesione che diviene fibrolipidica. Tra le citochine, IL-1 e TNF  $\alpha$  sembrano indurre la produzione locale di fattori di crescita come il fattore di crescita di derivazione piastrinica (PDGF), in grado di stimolare la migrazione delle cellule muscolari lisce, il fattore di crescita

dei fibroblasti e il TGF $\beta$ , in grado di favorire la fibrosi. I macrofagi attivati possono favorire inoltre l'espressione abnorme dell'ossido-nitrico-sintasi (eNOS) con elevata produzione di radicali di ossido nitrico (24). L'elevata concentrazione degli ioni nitrossido comporta da un lato una disfunzione endoteliale che altera la risposta agli stimoli vasodilatatori e contribuisce all'arterial stiffnes, dall'altra favorisce l'accumulo di radicali liberi e l'ulteriore perossidazione delle lipoproteine (25, 27).

L'ipertensione arteriosa (componente meccanica), il diabete mellito (glicazione non enzimatica delle LDL) con aumento delle VLDL e il fumo di sigaretta sono i fattori classicamente accettati come favorenti il processo aterosclerotico. L'intervento dei fenomeni trombotici e piastrinici invece sembrano contribuire all'evoluzione della lesione aterosclerotica (24, 25, 27). La comparsa di microscopiche "fratture" dell'endotelio infatti comporta l'esposizione della matrice extracellulare e della membrana basale che risulta altamente trombo genica (27). L'aggregazione piastrinica in questa sede ed il contributo della cascata della coagulazione comporta la formazione di microtrombi di superficie che successivamente si organizzano a causa di una risposta fibrotica indotta dalle piastrine stesse. Sia le piastrine che i polimorfonucleati inoltre sono in grado di rilasciare fattori angiogenetici che facilitano lo sviluppo di un letto microvascolare connesso con i vasa vasorum dell'arteria attraverso cui i leucociti continuano a rifornire il core lesionale (24). Recentemente, è stata sottolineata l'importanza della proliferazione vascolare intrapacca nei processi di evoluzione verso l'instabilità, probabilmente mediata dai fenomeni di rimaneggiamento tissutale in parte indotti dalle metallo-proteasi (27). La rottura inoltre dei vasa vasorum

determina la formazione di emorragie intrapacca che contribuiscono all'espansione delle lesioni e possono favorire i fenomeni di trombosi in situ. Nel corso dell'ultima decade, inoltre, è stato stressato il ruolo degli inibitori della calcificazione vascolare come l'osteocalcina, l'osteopontina ed altre proteine morfogenetiche del tessuto osseo che sembrano favorire i processi di formazione di depositi calcifici nel contesto dell'ateroma (28). La degenerazione calcifica delle placche è un evento clinicamente favorevole dal momento che contribuisce alla mancata progressione delle stesse e quindi alla loro stabilizzazione (29). Numerosi studi clinici e isto-patologici infatti hanno evidenziato come le lesioni ad alto contenuto di calcio vanno meno frequentemente incontro a complicanze quali l'emorragia intrapacca o la rottura di superficie, nonché tendono a restare sostanzialmente stabili nel tempo soprattutto in termini di spessore. Inoltre, polimorfismi positivi dei geni che codificano per gli inibitori della calcificazione vascolare sembrano essere correlati ad un' aterosclerosi precoce e ad una più frequente progressione negativa delle placche (28, 29).

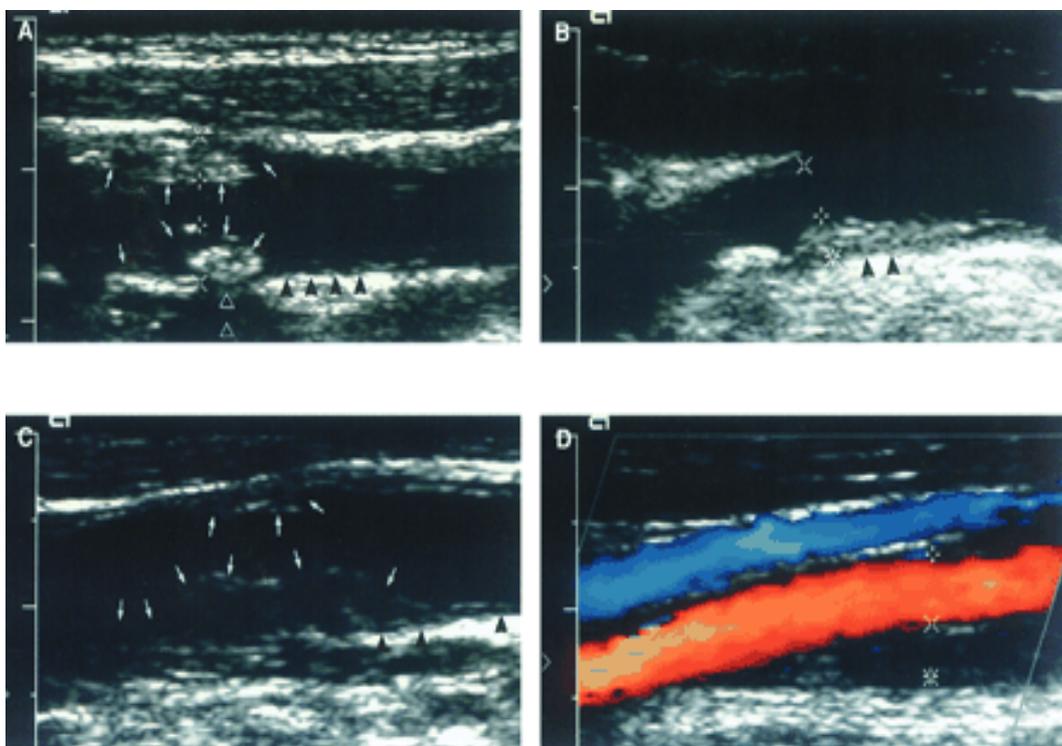
## **Cap 2: Metodiche ultrasonografiche**

### *Par. 2.1 Ultrasonografia e morfologia della placca carotidea*

L'impatto clinico delle placche aterosclerotiche carotidee è direttamente correlato al grado di stenosi, alle caratteristiche morfostrutturali della lesione ed alla presenza o meno di segni e sintomi neurologici direttamente attribuibili ad una lesione cerebrale correlabile con la stessa. L'ultrasonografia in B-mode rappresenta uno strumento fondamentale per lo screening della patologia aterosclerotica carotidea ed è ampiamente utilizzata nella pratica clinica per la stratificazione del rischio sia in prevenzione primaria che secondaria. Rispetto alle metodiche di tomografia computerizzata (TC) o risonanza magnetica (MRI), le tecniche doppler sono di relativamente facile esecuzione, a basso costo e ben riproducibili, con una buona concordanza inter-operatore nonostante siano dipendenti dall'abilità dell'esecutore (30). Laddove il grado di stenosi viene considerato un importante fattore predittivo dell'ictus, numerosi studi nel corso degli ultimi 20 anni hanno sottolineato l'importanza delle caratteristiche morfologiche delle lesioni aterosclerotiche nella stratificazione del rischio ischemico cerebrale. Nella maggior parte degli studi controllati randomizzati, è stato utilizzato un metodo visuale di classificazione delle placche con ultrasonografia doppler, basato sull'ecogenicità delle lesioni. In relazione a tale caratteristiche, le lesioni possono essere classificate in 5 morfotipi : tipo 1 - placca uniformemente anecogena (omogenea o soft), tipo 2 - placca prevalentemente ipoecogena (ipoecogenicità > 50% con piccoli foci ecogenici o eterogenea), tipo 3

- placca prevalentemente ecogena (ecogenicità > 50% con piccoli foci ipoecogeni o eterogenea), tipo - 4 placca uniformemente ecogena (iso o iperecogenicità), tipo 5
- placche calcifiche di difficile classificazione in relazione al cono d'ombra acustico posteriore alle calcificazioni (figura 1; Consensus Conference concerning the morphology and the risk of carotid plaque; 31).

**Figura 1:** caratteristiche ecografiche delle placche carotidee, metodo visuale.



Immagini ultrasonografiche delle placche aterosclerotiche carotidee con diversa ecogenicità ed eterogeneità. I caliper (+ and x) indicano il diametro del lume arterioso e lo spessore della placca. Immagine A: placca eterogenea prevalentemente ecogena (grade 3) visualizzata a livello della parete arteriosa prossimale e distale. La placca a livello della parete distale produce un'ombra acustica che nasconde l'interfaccia media-avventizia sottostante. L'interfaccia media-avventizia a destra del cono d'ombra appare lucente ed ecogena. Immagine B: placca omogenea prevalentemente ecogena (grade 3) a livello della parete distale. L'interfaccia media-avventizia appare ecogena. Immagini C e D: lo stesso vaso è insonato con due differenti angoli che mostrano una placca omogenea ecolucente (grade 1) prevalentemente distribuita a livello della parete distale. L'analisi Color-Doppler è utilizzata per identificare la superficie. (Joakimsen O. et al; Stroke. 1997;28:2201-2207)

Le caratteristiche ultrasonografiche così osservate correlano con gli aspetti anatomo-patologici delle placche asportate chirurgicamente. L'anecogenicità o ecolucenza correla con un prevalente contenuto lipidico, laddove l'ecogenicità con un prevalente contenuto fibroso e l'iperecogenicità con cono d'ombra acustico da calcificazione (32, 33). In relazione alla storia naturale delle stenosi asintomatiche, la frequenza di ictus osservata dallo studio ACAS (Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study) è di circa il 2% all'anno, contro il 13% delle placche sintomatiche. Il beneficio della terapia chirurgica su quella medica in caso di stenosi  $\geq$  al 60% (criteri NASCET) è stato inferiore al 3% ma la riduzione del rischio dopo il secondo anno di follow up e a 5 anni è risultato significativo (34). Di contro, lo studio ACST (Asymptomatic Carotid Surgery Trial) ha osservato un beneficio significativo a 5 anni della chirurgia rispetto alla terapia medica in pazienti di età inferiore a 75 anni con stenosi  $\geq$  del 70% a fronte di una percentuale di complicanze perioperatorie gravi inferiore al 3% (35). Infine, l'ACSRS trial (Asymptomatic Carotid Stenosis and Risk of Stroke) ha dimostrato un'associazione significativa fra placche con caratteristiche ecogeniche da 1 a 3 ed incidenza di ictus. Il grado di stenosi calcolato col metodo ECTS e l'ipercreatininemia sono stati riconosciuti come fattori predittivi indipendenti di rischio di ictus. In tal senso, l'approccio chirurgico alle placche asintomatiche ha un beneficio inferiore rispetto a quelle sintomatiche e l'effetto preventivo si osserva solo a lungo termine (36). Ne consegue la necessità di una più attenta stratificazione del rischio al fine di selezionare la popolazione più idonea al trattamento chirurgico che tenga conto non solo di fattori clinici quali l'età del

soggetto, l'aspettativa di vita (almeno 5 anni) ma anche, oltre al grado di stenosi, i pattern ecografici a maggiore rischio (superficie e caratteristiche morfologiche delle placche). L'alternativa medica, infatti, al trattamento chirurgico prevede l'uso di farmaci antiaggreganti e di statine che hanno sicuramente un profilo di sicurezza piuttosto elevato, seppur evidenze di efficacia ancora non del tutto note.

Una placca carotidea si definisce sintomatica quando si esprime con sintomi emisferici o retinici omolaterali alla lesione intervenuti a non più di 6 mesi (NASCET) (37). Gli studi NASCET e l'ECTS hanno dimostrato un vantaggio sostanziale della chirurgia, rispetto alla sola terapia medica, nei pazienti con stenosi superiore al 70%. Nel primo, è stato anche osservato un significativo beneficio per i pazienti con stenosi tra il 50 e il 70%, mentre nel secondo la chirurgia è risultata svantaggiosa nei pazienti con stenosi tra lo 0 e il 30% (37, 38).

L'effetto preventivo inoltre aumenta nei pazienti con rischio cerebrovascolare più elevato, con particolare riferimento a: evento recente (massimo beneficio della chirurgia entro 2 settimane dall'evento clinico), sintomi cerebrali e non oculari, placca ulcerata, gradi maggiori di stenosi, sesso maschile ed età più avanzata (37).

Altri fattori che vanno presi in considerazione nella scelta dell'opzione chirurgica sono le comorbidità del paziente e le complicanze gravi perioperatorie istituzionali che devono essere inferiori al 6% (38). Studi successivi hanno inoltre evidenziato l'importanza delle caratteristiche morfologiche di una placca sintomatica nella definizione dell'algoritmo terapeutico (39). Di qui, la necessità di standardizzare la valutazione dell'ecogenicità delle lesioni attraverso metodiche il più possibile poco invasive e meno operatore dipendenti. In questa direzione, le tecniche TC e MRI si sono rivelate altamente dispendiose in termini di implementazione tecnologica e

notevolmente time consuming a fronte di una relativa sovrapponibilità dei risultati ottenuti rispetto all'ultrasonografia standard.

## 2.2 Ultrasonografia carotidea e stroke: l'analisi GSM

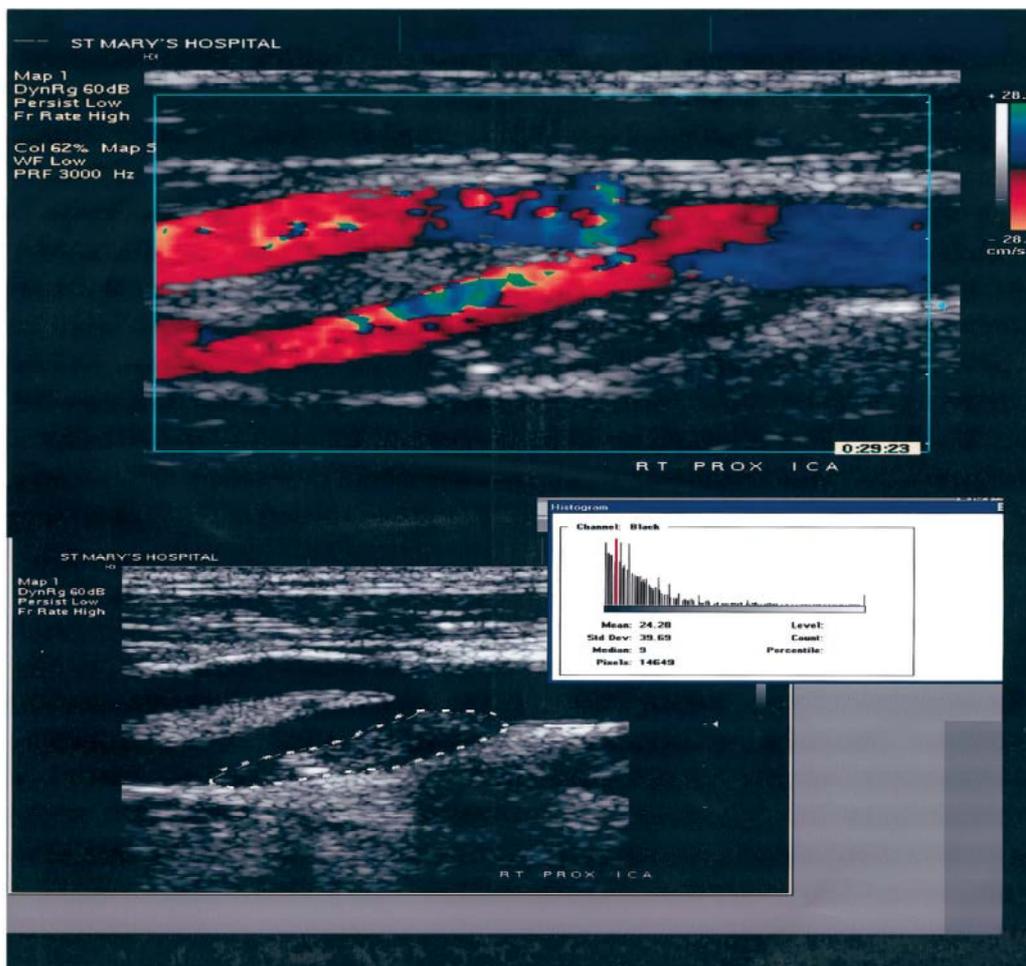
I principali vantaggi dell'ultrasonografia in B mode dei vasi epiaortici non sono rappresentati soltanto dal suo basso costo, dalla non invasività e dalla facile reperibilità della metodica ma anche dalla buona e ampiamente validata accuratezza diagnostica e dalla possibilità di ottenere in tempo reale dati morfologici e funzionali relativi al flusso ematico fornendo dati importanti sul piano emodinamico. Lo sviluppo delle metodiche di post-processing dell'immagine ha notevolmente limitato nel corso degli ultimi anni il ruolo dell'operatore, permettendo di meglio definire e obiettivare le caratteristiche morfologiche della placca in termini di ecogenicità e disomogeneità. La metodica computer-assistita di più largo utilizzo in ambito neurosonologico è l'analisi della scala dei grigi o GSM (gray scale median) (figura 2). Il GSM si avvale dell'elaborazione dell'immagine ultrasonografica per mezzo di comuni software di gestione delle immagini che analizzano ogni singolo pixel secondo una scala di grigi che va dallo 0 che corrisponde al nero del sangue a 255 che corrisponde al bianco della parete vasale (40).

Secondo i diversi studi sono stati stabiliti differenti valori di cut-off che variano circa tra 32, 50 ed oltre. Il primo studio che ha proposto e utilizzato la metodica

GSM ha preso in considerazione un valore cut-off di 32 (39, 40) poiché tale valore correlava con una significativa riduzione delle lesioni ischemiche omolaterali osservate alla TC encefalo (41). Successivamente, sono stati proposti altri valori a seconda del laboratorio e sulla base del disegno dello studio ma i risultati sono stati i medesimi. Nello studio originario, si parla di placca ecolucente se il GSM è inferiore a 32 e di placca ecogenica se il GSM è maggiore di 32. A un'immagine ipoecogena o ecolucente ( $GSM < 32$ ) corrisponde una lesione aterosclerotica costituita principalmente da materiale lipidico, trombotico o emorragico e quindi tendenzialmente poco stabile e maggiormente associata ad eventi cerebrovascolari di tipo ischemico. Al contrario, un'immagine iperecogena o ecogenica ( $GSM > 32$ ) caratterizza una placca maggiormente ricca di materiale calcifico e fibrotico che viene considerata più stabile e quindi meno suscettibile di ulcerazione o embolizzazione. I valori dell'analisi GSM sono calcolati digitalizzando l'immagine ecodoppler in B-mode (brightness mode) attraverso un'analisi di post-processing che prevede l'utilizzo di un personal computer e del programma Adobe Photoshop (Adobe System Inc, San Jose, California). Come punti di riferimento ai due estremi vengono presi il sangue e la tonaca avventizia del vaso in esame. I margini della placca vengono quindi delineati con l'uso della track-ball. L'immagine viene poi processata tenendo conto della scala dei grigi tra i due estremi di riferimento. Ne deriva un istogramma della distribuzione delle frequenze dei toni grigi e dei pixel nell'area selezionata dell'immagine normalizzata, che si esprime sottoforma di un valore numerico corrispondente all'ecogenicità della placca. Tale metodica rappresenta un indice riproducibile con una bassa variabilità inter-operatore ed inter-macchinario (42, 43).

L'affidabilità di tale metodica è stata osservata in alcuni studi clinici che hanno dimostrato una stretta associazione tra la morfologia della placca carotidea ed il decorso clinico nonché l'importanza della valutazione quantitativa come fattore di rischio indipendente per patologie cerebrovascolari (39, 40, 41, 44).

**Figura 2:** normalizzazione dell'immagine e GSM analisi. Placca ipoecogena (GSM: 59) con istogramma della distribuzione delle frequenze dei toni grigi dei pixel nell'area selezionata (placca) (modificata da Sabetai M.M. et al, Stroke 2000;31;2189-2196)



### **Cap. 3: La prevenzione secondaria con statine**

Le statine, o inibitori dell'enzima 3-idrossi-metil-glutaril-coenzimaA-reduttasi (3HMG-CoA reduttasi), enzima chiave nella biosintesi del colesterolo, rappresentano attualmente la principale terapia delle dislipidemie ed uno dei farmaci maggiormente usato per la riduzione del rischio degli eventi cardiovascolari (45). La lunga esperienza clinica e la numerosità degli studi effettuati hanno sostanzialmente migliorato il profilo di efficacia e sicurezza nonché ampliato le indicazioni riguardanti questa classe di farmaci. La 3HMG-CoA reduttasi interviene nella conversione del 3-idrossi-3-metil-glutaril-CoA (3HMG-CoA), prodotto a partire da 3 unità di acetil-CoA dalla isoforma citosolica dell'enzima HMG-CoA sintasi, in mevalonato(C6) tappa irreversibile della biosintesi del colesterolo. L'inibizione dell'enzima target riduce la formazione di colesterolo e in particolar modo comporta una riduzione della concentrazione plasmatica di LDL indipendentemente dalle strategie dietetiche (45). Al di là dell'effetto ipolipemizzante, le statine sembrano avere un effetto non dipendente dai lipidi (pleiotropico) verosimilmente mediato dall'interazione con i recettori delle citochine (IL-6, TNFs) e delle metalloproteasi (azione "antinfiammatoria") o con le isoforme costitutive e inducibili della nitrossido-sintasi (NOS, effetto "endoteliale"). Quest'azione pleiotropica sembra svolgere un ruolo importante nella prevenzione cardiovascolare primaria e secondaria insieme all'azione ipolipemizzante, sia per la patologia coronarica acuta che per l'ictus ischemico (45). Infatti, l'analisi post hoc degli studi ALLHAT-LLT (Antihypertensive and

Lipid-Lowering treatment to prevent Heart Attack, Lipid Lowering Therapy) e WOSCOPS (West of Scotland Coronary Prevention Study) ha osservato come la pravastatina riduca il rischio relativo di ictus del 9-11% (statisticamente non significativo) (46, 47). Negli studi versus placebo quali l'ASCOT (Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial), l'atorvastatina 10 mg riduce invece il rischio di ictus del 27-48% (statisticamente significativo) (48). Il profilo di sicurezza dell'atorvastatina è sicuramente più elevato rispetto sia alla simvastatina, che alla pravastatina ed alla rosuvastatina. I principali effetti collaterali interessano prevalentemente il distretto muscolare e variano dal rialzo della creatin-fosfochinasi a una franca miopatia. Le complicanze neuropatiche (neuropatie periferiche) sono relativamente rare, laddove il possibile impegno renale rappresenta una controindicazione relativa all'utilizzo di questi farmaci per la possibilità di una sindrome nefrosica associata prevalentemente a simvastatina ed a rosuvastatina (49).

### *Paragrafo 3.1 L'atorvastatina e lo studio SPARCL*

L'efficacia diretta delle statine nella prevenzione secondaria dell'ictus ischemico è stata valutata in cinque studi placebo-controllati (4S, CARE, HPS, LIPID, MIRACL) per un totale di più di 40.000 pazienti con malattia coronarica. In tutti questi RCT, la terapia con statine riduceva il rischio relativo di ictus fatale o non fatale in una percentuale variabile fra il 19 ed il 50% ( $p \leq 0.048$ ). La maggiore riduzione del rischio è stata osservata con atorvastatina 80 mg nello studio MIRACL (-50%,  $p = 0.045$ ) con una percentuale di drop out relativamente contenuta. Tale effetto

sembra essere dose dipendente dal momento che lo studio TNT (Treating to new Targets) ha osservato una riduzione del rischio di ictus del 25% ( $p = 0.02$ ) con 80 mg rispetto a dosi inferiori e lo studio GREACE (Greek Atorvastatin and Coronary Prevention Study) riporta un abbattimento del 47% ( $p = 0.034$ ) dello stesso rischio (50, 51).

Lo studio SPARCL (Stroke Prevention by Aggressive Reduction in Cholesterol Levels) è stato il primo studio prospettico, multicentrico, randomizzato, in doppio-cieco ad aver studiato l'effetto del trattamento con statine nella prevenzione secondaria dell'ictus. Al follow up a 4.9 anni, questo RCT ha dimostrato l'efficacia in prevenzione secondaria dell'atorvastatina 80 mg versus placebo in 4731 pazienti con storia di ictus o TIA negli ultimi 6 mesi, in assenza di malattia coronarica e con livelli ematici di colesterolo LDL tra 100 e 190 mg/dl. La popolazione era costituita essenzialmente da pazienti con ictus ischemico o emorragico non cardioembolici (pregressa fibrillazione atriale o altra fonte cardiaca di embolismo) con esclusione dell'emorragia sub aracnoidea e di ictus con esiti particolarmente gravi (modified Rankin Scale  $>3$ ). L'outcome primario consisteva nella riduzione del rischio di ictus fatale e non fatale nei due gruppi, laddove gli outcome composti secondari consistevano in stroke o TIA, evento coronarico maggiore (MCE), evento cardiovascolare maggior (ictus + MCE), evento coronarico acuto (ACE), ogni evento coronarico (ACE + procedure di rivascularizzazione o ricovero in emergenza o angina), procedure di rivascularizzazione ed infine qualunque altro evento cardiovascolare (52).

La principale evidenza dello studio SPARCL è la riduzione del rischio relativo di ictus fatale o non fatale del 16% (HR: 0.84; 95% CI: 0.71-0.99,  $p = 0.03$ ),

significativo per l'ictus fatale e non significativo per l'ictus non fatale ( $p = 0.11$ ). Tra gli endpoints secondari, l'atorvastatina riduce il rischio relativo di ictus e TIA (-23%;  $p < 0.001$ ), dei TIA da soli (-26% ;  $p = 0.004$ ) e di ictus ischemico (-22%;  $p = 0.01$ ). Lo studio SPARCL suggerisce che l'atorvastatina ad alte dosi dovrebbe essere iniziata immediatamente dopo un ictus o un TIA con un profilo di tolleranza, nonostante l'incidenza di aumento persistente delle transaminasi nel 2.2 % dei casi in confronto allo 0.5% del placebo e di un'incidenza maggiore di ictus emorragico nei pazienti in trattamento (55 vs. 33 casi complessivi di emorragia, non significativa) (52).

## **Presupposti e scopo del lavoro**

Numerosi studi supportano l'idea che la rottura della placca carotidea rappresenti un importante meccanismo patogenetico dell'ictus su base aterosclerotica (malattia dei grossi vasi) (53). Oltre al grado di stenosi, quindi, le caratteristiche morfologiche delle lesioni ateromasiche assumono sempre maggior rilevanza nella stratificazione del rischio cerebrovascolare (54). In particolare, è stata osservata una relazione fra ecolucenza ultrasonografica delle placche carotidee e il conseguente rischio di ictus ischemico ipsilaterale che sposta l'attenzione dalle dimensioni alle caratteristiche istologiche di vulnerabilità (55). In questo contesto, l'analisi GSM, che permette di effettuare una misura quantitativa dell'ecogenicità di una struttura biologica, sembra fornire ulteriori e significative informazioni sulla composizione dell'ateroma e potrebbe rappresentare un utile marker di vulnerabilità (40, 56, 57). Alcuni Autori hanno utilizzato questa metodica per valutare l'efficacia del trattamento con statine nel modificare le caratteristiche morfologiche delle placche aterosclerotiche carotidee (58, 59, 60). Poiché il trattamento aggressivo con atorvastatina è risultato essere più efficace della terapia convenzionale in termini di prevenzione cardiovascolare (50, 51, 52), l'obiettivo principale degli studi ultrasonografici è stato quello di valutare gli effetti di questo regime terapeutico sulla storia naturale dei fenomeni aterosclerotici carotidei (60, 61, 62). Infatti, Kadoglou et al hanno osservato come un trattamento ipolipemizzante aggressivo con atorvastatina 80 mg/die aumenti l'ecogenicità della placca carotidea in pazienti con elevati livelli di colesterolo LDL, indipendentemente dalla sintomaticità della lesione (60). Gli stessi Autori hanno

posto in relazione l'aumento del punteggio GSM con la riduzione dei livelli ematici degli inibitori della calcificazione vascolare (osteopontina e osteoprotegerina) indotti dalla stessa statina a dosaggio elevato e intermedio in pazienti sintomatici e non sintomatici (61). Oltre alla esigua numerosità dei campioni, il limite principale di questi studi è rappresentato dall'eterogeneità delle popolazioni studiate che includevano sia pazienti sintomatici sia asintomatici per malattia cerebrovascolare. Più recentemente, infatti, Della Morte et al. hanno osservato una riduzione dell'ecolucenza ed un aumento dell'ecogenicità delle placche carotidee asintomatiche dopo trattamento a breve termine con atorvastatina ad alto dosaggio (62).

Lo scopo di questo studio prospettico è quello di valutare l'effetto a lungo termine dell'atorvastatina a dosaggio elevato e intermedio sulla vulnerabilità della placca carotidea sintomatica in pazienti con TIA o ictus in fase acuta rispetto alla storia naturale dell'ateroma.

## **Materiali e metodi**

Sono stati inizialmente considerati tutti i pazienti sintomatici per primo evento cerebrovascolare ischemico non cardioembolico del circolo anteriore insorto entro i precedenti 10 giorni (attacco ischemico transitorio, ictus minore, ictus maggiore) e con stenosi carotidea da almeno un lato priva di indicazione chirurgica, afferenti alla UOS Diagnostica Neurosonologica del Dipartimento di Scienze e Biotechnologie Medico-Chirurgiche – Sezione Neurologia per la valutazione ultrasonografica. I criteri di esclusione erano rappresentati da: assenza di lesioni aterosclerotiche carotidee discrete, fibrillazione atriale, cardiomiopia dilatativa, pervietà del forame ovale e aneurisma del setto interatriale, altre possibili cardiomiopatie emboliche, precedente o attuale terapia ipolipemizzante, patologia epatica (ALT e gamma-GT aumentate di circa 2.5 volte) o renale (creatinina > 2.0 mg/dl), ipotiroidismo recente non trattato, patologie muscolari e neuro-muscolari, vasculiti e altre patologie immuno-infiammatorie croniche, neoplasie, altre controindicazioni all'utilizzo di statine. I parametri clinici presi in esame erano rappresentati da: anamnesi positiva per fattori di rischio cardiovascolare, indice di massa corporea (body-mass index, BMI), valori medi di pressione arteriosa ambulatoriale dei 10 giorni precedenti, valori medi di glicemia delle ultime 48 ore, valore percentuale di emoglobina glicata (HbA1C), dosaggio ematico di proteina C reattiva quantitativa (hs-PCR). I valori ematici di colesterolo totale, LDL-C e HDL sono stati schedati ma non presi in considerazione per l'arruolamento e la randomizzazione.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a ecocolordoppler dei vasi epiaortici con sonda da 7-11 MHz (LogiQ Pro, General Electrics) per la definizione del quadro aterosclerotico carotideo. La diagnosi e il grado di stenosi carotidea si sono basati sui criteri diagnostici applicati uniformemente nel nostro laboratorio sulla base delle raccomandazioni della Society of Radiologists in Ultrasound (velocità di picco sistolico o PSV e rapporto PSV fra le arterie carotidi interna e comune o ICA/CCA PSV ratio) (31) e sui criteri NASCET (rapporto fra minimo lume residuo e diametro distale normale del vaso stenotico nell'imaging in B-mode) (37). Per mezzo della valutazione combinata le stenosi sono state classificate come: < 49%, fra il 50 e il 69%, fra il 70 e l'80%, sub-occlusione e occlusione. L'analisi della scala di grigi (Gray-Scale Median o GSM) di ogni placca è stata eseguita con software di elaborazione d'immagini (Adobe Photoshop 9.0) su tre scansioni di ogni placca ottenute in tre cicli cardiaci e il punteggio definitivo calcolato come media delle tre misurazioni.

Tutti i pazienti con stenosi non chirurgica compresa fra il 50 ed il 69%, punteggio GSM < 80 e storia clinica, segni neurologici e neuroimmagini (TC o MRI) congrui con la placca esaminata sono stati suddivisi in maniera randomizzata e indipendente dal profilo lipidico: gruppo A – atorvastatina 80 mg/die, gruppo B – atorvastatina 40 mg/die, gruppo C – no atorvastatina. La durata dello studio è stata di 12 mesi e la valutazione ultrasonografica è stata effettuata a tempo 0 e a 12 mesi. L'acquisizione delle immagini e la valutazione GSM sono state eseguite dallo stesso operatore esperto, in cieco rispetto alla storia clinica del paziente e al gruppo di appartenenza. Durante il periodo di follow up, le concomitanti terapie antipertensive, ipoglicemizzanti e antiaggreganti sono rimaste invariate a meno di

diversa indicazione clinica e sono stati raccomandati ai pazienti una dieta ipocalorica e l'esercizio fisico (non monitorati). Sono state inoltre monitorate la proteina C reattiva con metodo quantitativo, la conta leucocitaria, CPK, parametri di funzionalità epatica e renale.

Lo studio è stato approvato dal comitato etico locale e tutti i partecipanti hanno compilato e firmato un consenso informato.

#### *Analisi statistica.*

I dati sono espressi come media e deviazione standard (SD). Le differenze entro e fra i gruppi delle variabili in esame sono state analizzate con test t di Student per variabili appaiate o con chi quadrato per i dati non parametrici. Le analisi univariata e multivariata sono state condotte per valutare l'associazione fra le variazioni del punteggio GSM e quelle delle altre variabili. L'elaborazione dei dati è stata eseguita mediante software SPSS 16.0 (SPSS Inc, Chicago), scegliendo come livello di significatività una  $p < 0.05$ .

## Risultati

Sulla base dei criteri d'inclusione ed esclusione è stato randomizzato nei 3 gruppi un totale di 220 pazienti con un'età media di  $62.63 \pm 8.4$  anni (119 uomini e 102 donne). 10 pazienti (4 M e 6 F) hanno sospeso la terapia per rialzo eccessivo degli enzimi epatici (5/10), crampi muscolari (2/10), mancata compliance (3/10). L'analisi statistica conclusiva è stata condotta su 210 pazienti per un totale di 210 placche di cui 68 assegnati al gruppo A (atorvastatina 80 mg), 69 al gruppo B (atorvastatina 40 mg) e 73 al gruppo C (no atorvastatina).

Le caratteristiche clinico-demografiche del campione sono riportate nella tabella 1

	Gruppo A (n)	Gruppo B (n)	Gruppo C (n)	P
rialzo enzimi epatici	2	2	1	n. s.
crampi muscolari	1	1	-	n. s.
rabdomiolisi	-	-	-	n. s.
mancata compliance	1	1	1	n. s.

**Tabella 1:** caratteristiche clinico-demografiche del campione suddiviso nei 3 gruppi.

	Gruppo A	Gruppo B	Gruppo C	P
numero	68	69	73	n. s.
M/F	36/32	38/31	38/32	n. s.
età	$62.34 \pm 8.74$	$62.92 \pm 7.93$	$62.64 \pm 8.49$	n. s.
ipertensione	72.5%	71.9%	73.2%	n. s.
diabete	45.6%	43.2%	45.1%	n. s.
fumo	39.3%	40.1%	39.8%	n. s.
LV dys	27.8%	28.1%	27.3%	n. s.
BMI	$29.1 \pm 2.17$	$29.5 \pm 1.94$	$28.7 \pm 2.86$	n. s.
hs - PCR	$5.32 \pm 1.7$	$5.29 \pm 1.4$	$5.31 \pm 1.6$	n. s.
Chol. Tot.	$258.31 \pm 28.44$	$259.13 \pm 22.95$	$257.22 \pm 26.83$	n. s.
LDL	$164 \pm 38.3$	$162 \pm 33.6$	$166 \pm 36.7$	n. s.

La distribuzione per età, sesso, caratteristiche antropometriche, prevalenza dei fattori di rischio e profilo lipidico era simile fra i tre gruppi. La frequenza di TIA e ictus minore o maggiore al momento dell'arruolamento è riportata nella tabella 2.

**Tabella 2:** frequenza relativa degli eventi cerebrovascolari al baseline (valori percentuali).

	Gruppo A	Gruppo B	Gruppo C	P
TIA	32	33	30	n. s.
Minor stroke	26	27	26	n. s.
Major stroke	42	40	44	n. s.
	100%	100%	100%	n. s.

La percentuale media di stenosi delle lesioni sintomatiche è stata del  $59.4 \pm 3.4\%$  e non sono state osservate differenze statisticamente significative fra i gruppi (gruppo A: 58.6%; gruppo B: 57.9%; gruppo C: 58.1%;  $p = 0.8659$ ). Il punteggio medio ottenuto all'analisi GSM a tempo 0 è stato di  $62.1 \pm 16.2$  nell'intero campione senza differenze fra i gruppi (gruppo A:  $62.6 \pm 15.9$ ; gruppo B:  $62.3 \pm 16.1$ ; gruppo C:  $61.9 \pm 17.9$ ;  $p = 1.7462$ ).

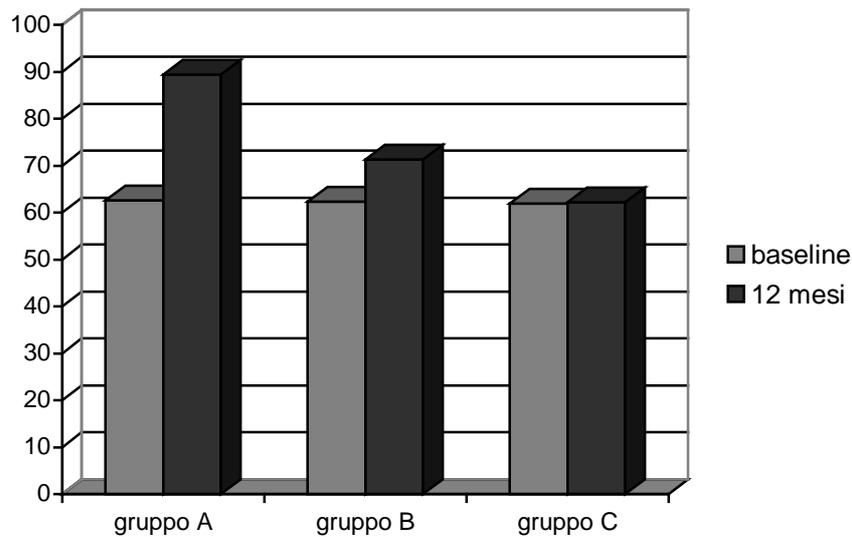
La maggiore riduzione dei valori di colesterolo totale è stata osservata nei pazienti sottoposti a terapia aggressiva (A vs B:  $-41.09$  vs  $-36.82$   $p = 0.056$ ; A vs C:  $41.09$  vs  $21.76$ ,  $p = 0.0017$ ) ma non sono state osservate differenze significative fra gruppo A e gruppo B in termini di ampiezza della riduzione. Il target di un dosaggio di LDL  $< 100$  è stato raggiunto nel 79.3% dei pazienti del gruppo A e nel 67.8% del gruppo B vs il 21% dei pazienti del gruppo C (rispettivamente,  $p < 0.001$  e  $p < 0.02$ ). La proteina C reattiva si riduceva significativamente sia nel gruppo A

( $5.32 \pm 1.7$  vs  $2.18 \pm 0.4$ ,  $p < 0.001$ ) sia nel gruppo B ( $5.29 \pm 1.4$  vs  $3.41 \pm 0.9$ ,  $p < 0.001$ ). Non si osservavano variazioni significative nel gruppo C.

La variazione del punteggio GSM a 12 mesi per ogni singolo gruppo è riportata nel grafico 1. Il GSM score medio a 12 mesi nel gruppo A è risultato di  $97.4 \pm 1.3$ , mentre nel gruppo B di  $81.5 \pm 6.3$  e nel gruppo C di  $63.2 \pm 3.3$ . Un aumento significativo del punteggio GSM è stato osservato sia nei pazienti trattati con atorvastatina 80 mg (+ 34.8,  $T = 5.2671$  p 0.0002), sia in quelli che hanno assunto atorvastatina 40 mg (+ 19.2,  $T = 2.389$  p 0.0349). La variazione osservata nei pazienti non sottoposti a terapia non è risultata statisticamente significativa (+ 1.3,  $T = 0.2133$  p 0.8358).

Il confronto fra i gruppi ha rivelato un effetto dose-dipendente dell'atorvastatina sul punteggio GSM dal momento che l'ecogenicità della placca carotidea aumenta in maniera significativamente più ampia nel gruppo A rispetto al gruppo B (34.8 vs 19.2,  $p < 0.02$ ) e al gruppo C (34.9 vs 1.3,  $p = 0.0002$ ). Lo stesso effetto dose dipendente è stato osservato sia sulla riduzione delle LDL (A 78.2 vs B 62.8 vs C 12.3,  $p < 0.002$ ), sia sulla riduzione della hs-PCR (A 3.24 vs B 1.88 vs C 0.43,  $p < 0.002$ ).

**Grafico 1:** punteggio GSM a tempo 0 e a 12 mesi.



Non sono state osservate modificazioni significative dello spessore delle placche e del grado di stenosi in nessun gruppo. L'analisi multivariata corretta per i fattori di rischio, la terapia medica e i dati antropometrici non ha mostrato alcun impatto degli elementi considerati sulle variazioni del punteggio GSM. La regressione lineare ha osservato un'associazione inversa fra la riduzione delle LDL e l'aumento del GSM ( $r = -0.456$ ;  $P = 0.007$ ) ma non fra la variazione del colesterolo totale e la variazione dell'ecogenicità. Inoltre, la riduzione dell'hs-PCR correla inversamente con l'aumento del GSM ( $r = -0.398$ ;  $P = 0.021$ ).

## **Discussione.**

In questo studio, l'atorvastatina aumenta in maniera dose-dipendente e indipendentemente da età, sesso, fattori di rischio e terapie di prevenzione primaria e secondaria la ecogenicità delle placche carotidee sintomatiche in pazienti con ictus ischemico non precedentemente trattati con statine. L'ecolucenza delle lesioni aterosclerotiche carotidee osservata all'ultrasonografia doppler in B-mode rappresenta un marcatore d'instabilità delle stesse e gioca un ruolo importante nell'incidenza degli eventi cerebrovascolari (63, 64). Infatti, la stabilizzazione della placca carotidea vulnerabile contribuisce più della riduzione del volume della stessa alla prevenzione degli accidenti cerebrovascolari (65). Nella maggior parte dei trial prospettici che hanno evidenziato il ruolo indipendente della morfologia delle placche nell'incidenza dell'ictus ischemico, il metodo di classificazione più ampiamente utilizzato è stato quello visuale soggettivo che è strettamente operatore dipendente e difficilmente riproducibile (66, 67). Le metodiche di analisi dell'immagine più recentemente introdotte come il Grey-Scale Median (GSM) permettono una stima più obiettiva e maggiormente standardizzabile della struttura ecografica della placca e rappresentano un valido marcatore della sua vulnerabilità (40, 42). Laddove la valutazione visiva rimane quella più ampiamente utilizzata nella pratica clinica quotidiana, alcuni Autori hanno dimostrato una significativa correlazione fra il punteggio GSM, la classificazione standard non quantitativa e il reperto istopatologico di necrosi intrapacca (56). Inoltre, la distribuzione delle intensità dei pixel è risultata predittiva di ictus ischemico in pazienti con stenosi carotidea sia sintomatiche che

asintomatiche in almeno due studi prospettici (33, 57). Allo stato attuale però, pochi trial clinici di imaging hanno valutato le modificazioni quantitative della composizione della placca in risposta a specifici trattamenti. Nakamura et al hanno riportato un significativo aumento dell'ecogenicità delle placche carotidee dopo trattamento precoce e a breve termine con pitavastatina in pazienti con sindrome coronarica acuta (58). Yamagami et al invece hanno osservato una correlazione fra l'incremento dell'ecogenicità e la riduzione dello spessore delle lesioni aterosclerotiche da un lato e riduzione dei livelli serici di lipidi e della concentrazione di IL 18 e di proteina C reattiva in pazienti con ipercolesterolemia (59). La bassa numerosità del campione, l'eterogeneità delle stenosi e dei trattamenti utilizzati e la ridotta durata del follow up hanno fortemente limitato i risultati di entrambi i lavori. Più recentemente, Kadoglou et al hanno osservato un aumento significativo dell'ecogenicità delle placche carotidee prechirurgiche ed una riduzione dei livelli plasmatici degli inibitori della calcificazione vascolare dopo trattamento ipolipemizzante aggressivo con atorvastatina in due valutazioni prospettiche a 6 e 12 mesi (61). Entrambi gli studi però non distinguevano fra pazienti sintomatici e asintomatici per eventi cerebrovascolari e la bassa numerosità dei campioni non permettevano una stratificazione in tal senso.

Il vantaggio di questo studio è stato quello di aver valutato pazienti con stenosi prechirurgica sintomatica in fase acuta e naive per terapia con statine per un periodo di follow up relativamente ampio (12 mesi). I soggetti eligibili sono stati randomizzati in cieco e indipendentemente dai valori di colesterolo totale e LDL per essere assegnati a un regime con atorvastatina ad alto o medio dosaggio rispetto a un gruppo di controllo non trattato. La scelta dell'atorvastatina si è

basata sui risultati dei trial clinici randomizzati MIRACLE e SPARCL che hanno osservato una significativa riduzione del rischio ischemico cerebrale, rispettivamente in pazienti con angina instabile o infarto non Q e in pazienti con TIA o ictus sottoposti a trattamento ipolipemizzante aggressivo. In entrambi gli RCT, il dosaggio elevato di questa statina ha dimostrato un buon profilo di sicurezza anche in pazienti con sindrome coronarica o ictus in fase acuta con una percentuale relativamente bassa di drop out per eventi avversi (50, 52). Entrambi i dosaggi utilizzati in questo studio hanno determinato un incremento significativo del GSM rispetto al gruppo di controllo che esclude un ruolo fisiopatologico del fattore tempo sui processi di stabilizzazione delle placche carotidee. Il maggiore aumento dell'ecogenicità della placca osservato nei pazienti trattati con atorvastatina 80 mg rispetto a quelli con 40 mg rende ragione di un effetto dose dipendente del farmaco sui processi di rimodellamento delle lesioni aterosclerotiche, verosimilmente attribuibile a un'azione diretta sui mediatori cellulari e umorali dell'infiammazione. Inoltre, la correlazione significativa fra variazione del punteggio GSM e riduzione delle LDL indipendentemente dal valore iniziale suggerisce un ruolo diretto della statina sui processi di perossidazione ed accumulo lipidico responsabili dell'induzione della stessa risposta infiammatoria. Un possibile marcatore dell'effetto modulatore sulla risposta infiammatoria dell'atorvastatina sembra essere rappresentato dalla proteina C reattiva dosata con metodo quantitativo (high sensitive, hs-PCR). La correlazione negativa osservata fra l'aumento dell'ecogenicità delle lesioni e la riduzione a 12 mesi della concentrazione ematica di hs-PCR potrebbe giustificare un effetto diretto dell'atorvastatina sui processi infiammatori nel contesto della placca, in direzione

di un rimodellamento probabilmente indotto dall'azione macrofagica. Il reclutamento dei macrofagi è indotto infatti dalla perossidazione delle LDL e dall'azione chemotattica di citochine e molecole di adesione che verrebbe contrastata dalla riduzione della concentrazione di queste lipoproteine e la modulazione dei fenomeni pro-infiammatori indotta dall'atorvastatina in maniera dose dipendente (24, 27, 52). In tal senso, i nostri risultati suggeriscono una possibile spiegazione degli effetti pleiotropici dell'atorvastatina dal momento che il trattamento aggressivo con atorvastatina sembra stabilizzare la placca carotidea per mezzo di una modulazione dei fenomeni infiammatori e un miglioramento del profilo lipidico. Se questo dato venisse confermato da studi più ampi che valutino parametri infiammatori più specifici della PCR, andrebbe rivalutato il target terapeutico sulla concentrazione di LDL e valutata l'opportunità di utilizzare l'atorvastatina ad alte dosi indipendentemente dai valori basali di colesterolo.

L'effetto stabilizzante del farmaco è risultato indipendente dall'età, dal sesso, dai fattori di rischio cardiovascolari e dalla terapia antipertensiva, antidiabetica o antiaggregante ma i risultati dell'analisi multivariata non possono essere considerati conclusivi perché la limitata numerosità del campione non permette un'adeguata stratificazione sulla base del rischio o del trattamento. Inoltre, l'esiguo numero di recidive di eventi cerebrovascolari osservato sull'intero campione non ha permesso di evidenziare l'impatto dell'evoluzione morfologica dell'ateroma sul rischio clinico. L'ampliamento del campione e un più lungo periodo di follow up sembrano necessari per ottenere informazioni in tal senso.

Non sono state osservate in questo studio variazioni sostanziali del grado di stenosi carotidea, probabilmente a causa di una relativamente breve durata del

follow up. D'altronde, è probabile che l'aumento dell'ecogenicità della placca prevalga in termini di beneficio clinico nelle stenosi moderate considerate, come già precedentemente osservato (30, 36).

In conclusione, questo studio supporta l'evidenza di una significativa efficacia dose-dipendente dell'atorvastatina sui processi di stabilizzazione della placca carotidea sintomatica, suggerendo un importante ruolo di questo farmaco nella prevenzione secondaria dell'ictus già in fase acuta.

## Bibliografia.

1. Sarti C, Rastenyte D, Cepaitis Z, Tuomilehto J. International trends in mortality from stroke, 1968 to 1994. *Stroke* 2000; 31:1588-1601.
2. Di Carlo A, Launer LJ, Breteler MM, Fratiglioni L, Lobo A, Martinez-Lage J, Schmidt R, Hofman A, Feigin VL, Lawes CM, Bennett DA, Anderson CS. Stroke epidemiology: a review of population-based studies of incidence, prevalence, and case-fatality in the late 20th century. *Lancet Neurol* 2003; 2: 43-53.
3. Murray CJL, Lopez AD. Global mortality, disability and the contribution of risk factors. Global burden of the disease study. *Lancet* 1997; 349: 1436-1442.
4. Marini C, Baldassarre M, Russo T, De Santis F, Sacco S, Ciancarelli I, Carolei A. Burden of first-ever ischemic stroke in the oldest old. Evidence from a population-based study. *Neurology* 2004; 62: 77-81.
5. Lloyd-Jones D et al. Heart disease and stroke statistics: 2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2009;119(3):e21–e181
6. Kunst AE, Amiri M, Janssen F The decline in stroke mortality: exploration of future trends in 7 Western European countries. *Stroke*. 42(8):2126–2130
7. Kim AS, Johnston SC Global variation in the relative burden of stroke and ischemic heart disease. *Circulation*. 2011;124(3):314–323
8. Rothwell PM et al. : Population-based study of event-rate, incidence, case fatality, and mortality for all acute vascular events in all arterial territories (Oxford Vascular Study). *Lancet* 2005;366:1773-1783.

9. O'Brien JT, Erkinjuntti T, Reisberg B, Roman G, Sawada T, Pantoni L, Bowler JV, Ballard C, DeCarli C, Gorelick PB, Rockwood K, Burns A, Gauthier S, DeKosky ST: Vascular cognitive impairment. *Lancet Neurol* 2003;2:89-98.
10. Prinz V, Endres M. Statins on stroke: prevention and beyond. *Current Opinion in Neurology* 2011; 24 (1): 75-80.
11. Linee guida italiane SPREAD, Stroke Prevention And Educational Awareness Diffusion, 6 Edizione, Catel Division, Milano 2010.
12. Sacco S, Di Gianfilippo G, Di Napoli M, Santalucia P, Euforbio M, Triggiani L, Cimini L, Ciancarelli, De Santis F, Olivieri L, Pistoia F, Marini C, Carolei A. L'ictus in Italia: Risultati a 5 anni de L'Aquila Stroke Registry (1994-1998) e confronto con studi comparabili di popolazione nazionali ed internazionali per una politica di gestione programmata della patologia. *Riv Ital Neurobiol* 2006; 2: 109-136.
13. Linn FH, Rinkel GJ, Algra A, van GijnJ. Incidence of subarachnoid hemorrhage: role of region, year, and rate of computed tomography: a meta-analysis. *Stroke* 1996; 27: 625-629.
14. Ingall T, Asplund K, Mähönen M, Bonita R. A multinational comparison of subarachnoid hemorrhage epidemiology in the WHO MONICA stroke study. *Stroke* 2000; 31: 1054-1061.
15. Di Carlo A, Baldereschi M, Gandolfo C, Candelise L, Ghetti A, Maggi S, Scafato E, Carbonin P, Amaducci L, Inzitari D, for the ILSA working group. Stroke in an Elderly Population. Incidence and Impact on Survival and Daily Function. The Italian Longitudinal Study on Aging. *Cerebrovasc Dis* 2003, 16: 141-150.

16. Stroke--1989. Recommendations on stroke prevention, diagnosis, and therapy. Report of the WHO Task Force on Stroke and other Cerebrovascular Disorders. Stroke 1989 Oct;20(10):1407-31.
17. Giles MF, Rothwell PM Risk of stroke early after transient ischaemic attack: a systematic review and meta-analysis. Lancet Neurol 2007;6:1063–1072
18. Warlow CP, Dennis MS, van Gijn J, Hankey GJ, Sandercock PAG, Bamford JM, Wardlaw JM. Stroke. A practical guide to management. Second Edition, Blackwell Science Ltd, Oxford 2001.
19. Giles MF, Albers GW, Amarenco P, et al. Addition of brain infarction to the ABCD2 score (ABCD2-I): a collaborative analysis of unpublished data on 4574 patients. Stroke 2010;41:1907–1913
20. Bamford J, Sandercock P, Dennis M, Burn J, Warlow C. Classification and natural history of clinically identifiable subtypes of cerebral infarction. Lancet 1991; 337: 1521-1526.
21. Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE. Classification of subtypes of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. Stroke 1993; 24 (1): 35-41.
22. Ferro JM, Massaro AR, Mas JL. Aetiological diagnosis of ischemic stroke in young adults. Lancet Neurology 2010; 9 (11): 1085-1096.
23. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. Circulation. 1995 1;91(9):2488-96.

24. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nature medicine* 2011; 17: 1410-1422.
25. D'Armiento FP, Bianchi A, de Nigris F, Capuzzi DM, D'Armiento MR, Crimi G, Abete P, Palinski W, Condorelli M, Napoli C. Age-related effects on atherogenesis and scavenger enzymes of intracranial and extracranial arteries in men without classic risk factors for atherosclerosis. *Stroke*. 2001;32:2472–2479.
26. Pauletto P, Puato M, Faggini E, Santipolo N, Pagliara V, Zoleo M, Deriu GP, Grego F, Plebani M, Sartore S, Bon GB, Heymes C, Samuel JL, Pessina AC. Specific cellular features of atheroma associated with development of neointima after carotid endarterectomy: the carotid atherosclerosis and restenosis study. *Circulation*. 2000;102:771–778.
27. Cipollone F, Marini M, Fazio M, Pini B, Iezzi A, Reale M, Paloscia L, Materazzo G, D'Annunzio E, Conti P, Chiarelli F, Cucurullo F, Mezzetti A. Elevated circulating levels of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with restenosis after coronary angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:327–334.
28. Omland T, Ueland T, Jansson AM, Persson A, Karlsson T, Smith C, et al. Circulating osteoprotegerin levels and long-term prognosis in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:627-33.
29. Kiechl S, Schett G, Wenning G, Redlich K, Oberhollenzer M, Mayr A, et al. Osteoprotegerin is a risk factor for progressive atherosclerosis and cardiovascular disease. *Circulation* 2004;109:2175-8

30. Reiter M, Effenberger I, Sabeti S, Mlekusch W, Schlager O, Dick P, et al. Increasing carotid plaque echolucency is predictive of cardiovascular events in high-risk patients. *Radiology* 2008;248:1050-5.
31. de Bray JM, Baud JM, Dautat M. Consensus Concerning the Morphology and the Risk of Carotid Plaques. *Cerebrovasc Dis* 1997;7:289-296.
32. Wolverson MK, Basiti HM, Peterson GJ. Ultrasonic tissue characterization of atheromatous plaques using a high resolution real time scanner. *Ultrasound Med Biol.* 1983; 9:599-609.
33. Grønholdt ML, Wiebe BM, Laursen H, Nielsen TG, Schroeder TV, Sillesen H. Lipid-rich carotid artery plaques appear echolucent on ultrasound B-mode images and may be associated with intraplaque haemorrhage. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1997; 14:439-45.
34. Executive Committee for Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study: Endarterectomy for Asymptomatic Carotid Artery Stenosis. *JAMA* 1995; 273: 1421-1428.
35. Halliday A, Harrison M, Hayter E, Kong X, Mansfield A et al for the Asymptomatic Carotid Surgery Trial (ACST) Collaborative Group. 10-year stroke prevention after successful carotid endarterectomy for asymptomatic stenosis (ACST-1): a multicenter randomized trial. *Lancet* 2010; 376: 1074-84.
36. Nicolaidis AN, Kakkos SK, Griffin M, Sabetai M, Dhanjil S, Tegos T, Thomas DJ, Giannoukas A et al for the Asymptomatic Carotid Stenosis and Risk of Stroke (ACSRS) Study Group. Severity of asymptomatic carotid stenosis and risk of ipsilateral of hemispheric ischemic events: results from the ASRS study. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 2005; 30 (3): 275-84.

37. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high grade carotid stenosis. *N Engl J Med* 1991; 326: 445-53.
38. European Carotid Surgery Trialists' Collaborative Group. Randomized trial of endarterectomy for recently symptomatic carotid stenosis: final results of the MRC European Carotid Surgery Trial (ECST). *Lancet* 1998; 351:1379-87
39. Biasi GM, Mingazzini PM, Baronio L, Piglionica MR, Ferrari SA, Elatrozy TS, Nicolaidis AN. Carotid plaque characterization using digital image processing and its potential in future studies of carotid endarterectomy and angioplasty. *J Endovasc Surg.* 1998;5:240-6.
40. El-Barghouty N, Geroulakos G, Nicolaidis A, Androulakis A, Bahal V. Computer-assisted carotid plaque characterisation. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1995; 9 (4): 389-93.
41. Sabetai MM et al. Carotid plaque echogenicity and types of silent CT-brain infarcts. Is there an association in patients with asymptomatic carotid stenosis? *Int Angiol.* 2001; 20: 51-7.
42. Sabetai MM, Tegos TJ, Nicolaidis AN, Dhanjil S, Pare GJ, Stevens JM. Reproducibility of Computer-Quantified Carotid Plaque Echogenicity: Can We Overcome the Subjectivity? *Stroke* 2000; 31: 2189-2196.
43. Elatrozy T, Nicolaidis A, Tegos T, Zarka AZ, Griffin M, Sabetai M. The effect of B-mode ultrasonic image standardisation on the echodensity of symptomatic and asymptomatic carotid bifurcation plaques. *Int Angiol.* 1998 ;17:179-86.
44. Pedro LM, Pedro MM, Gonçalves I, Carneiro TF, Balsinha C, Fernandes e Fernandes R, Fernandes e Fernandes J. Computer-assisted carotid plaque

- analysis: characteristics of plaques associated with cerebrovascular symptoms and cerebral infarction. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2000; 19:118-23.
45. Baigent C, Keech A, Kearney PM, et al. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 2005;366:1267-78.
46. Einhorn PT, Davis BR, Wright Jt, Rahaman N, Whelton PK, Pressel SL for the ALLHAT Cooperative Research Group. ALLHAT: still providing correct answers after 7 years. *Current Opinion in Cardiology* 2010; 25 (4): 355-65.
47. Wallace Am, MacMahon AD, Packard CJ, Kelly A, Sheperd J, Gaw A, Sattar N. Plasma leptin and the risk of cardiovascular disease in the West Of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS). *Circulation* 2001; 104 (25): 3052-56.
48. Collier DJ, Poulter NR, Dahlof B, Sever PS, Wedel H, Buch J, Caulfield MJ for the ASCOT investigators. Impact of atorvastatin among older and younger patients in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Lipid Lowering arm. (ASCOT-BPLA). *Journal of Hypertension* 2011; 29 (3): 592-9.
49. Mancini J, Baker S, Bergeron J, Fitchett D, Frohlich J, Genest J, Gupta M, Hegele RA, Pope J. Diagnosis, Prevention, and Management of Statin Adverse Effects and Intolerance: Proceedings of a Canadian Working Group Consensus Conference. *Canadian Journal of Cardiology* 27 (2011) 635– 662.
50. Schwartz GG, Olsson AG, Ezekowitz MD, Ganz P, Oliver MF, Waters D, et al; Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) Study Investigators. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes: the MIRACL study: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001;285:1711-8.

51. Tikkanen MJ, Holme I, Cater NB, Szarek M, Faergeman O, Kastelein JJ, et al; Incremental DEcrease through Aggressive Lipid Lowering Investigators. Comparison of efficacy and safety of atorvastatin (80 mg) to simvastatin (20 to 40 mg) in patients aged <65 versus > or = 65 years with coronary heart disease (from the Incremental DEcrease through Aggressive Lipid Lowering [IDEAL] study). *Am J Cardiol* 2009;103: 577-82.
52. Amarenco P, Bogousslavsky J, Callahan A 3rd, Goldstein LB, Hennerici M, Rudolph AE, Silleesen H, Simunovic L, Szarek M, Welch KM, Zivin JA. Stroke Prevention by Aggressive Reduction in Cholesterol Levels (SPARCL) Investigators. High-dose atorvastatin after stroke or transient ischemic attack. *N Engl J Med*. 2006;10;355(6):549-59.
53. U-King-Im JM, Tang T, Moustafa RR, Baron JC, Warburton EA, Gillard JH. Imaging the cellular biology of the carotid plaque. *Int J Stroke* 2007;2:85-96.
54. Heliopoulos J, Vadikolias K, Mitsias P, Artemis D, Tripsianis G, Piperidou C, Artemis N. A three-dimensional ultrasonographic quantitative analysis of non-ulcerated carotid plaque morphology in symptomatic and asymptomatic carotid stenosis. *Atherosclerosis* 2008;198:129-35.
55. Reiter M, Effenberger I, Sabeti S, Mlekusch W, Schlager O, Dick P, et al. Increasing carotid plaque echolucency is predictive of cardiovascular events in high-risk patients. *Radiology* 2008;248:1050-5.
56. Grogan JK, Shaalan WE, Cheng H, Gewertz B, Desai T, Schwarze G, Glagov S, Lozanski L, Griffin A, Castilla M, Bassiouny H. B-mode ultrasonographic characterization of carotid atherosclerotic plaques in symptomatic and asymptomatic patients. *Journal of Vascular Surgery* 2005; 42: 435-41.

57. Hashimoto H, Tagaya M, Niki H, Etani H. Computer-assisted analysis of heterogeneity on B-mode imaging predicts instability of asymptomatic carotid plaque. *Cerebrovascular Disease*, 2009; 28: 357-364.
58. Nakamura T, Obata JE, Kitta Y, Takano H, Kobayashi T, Fujioka D, et al. Rapid stabilization of vulnerable carotid plaque within 1 month of pitavastatin treatment in patients with acute coronary syndrome. *J Cardiovasc Pharmacol* 2008;51:365-71.
59. Yamagami H, Sakaguchi M, Furukado S, Hoshi T, Abe Y, Hougaku H, et al. Statin therapy increases carotid plaque echogenicity in hypercholesterolemic patients. *Ultrasound Med Biol* 2008;34:1353-9.
60. Kadoglou NP, Gerasimidis T, Moutzouoglou A, Kapelouzou A, Sailer N, Fotiadis G, et al. Intensive lipid-lowering therapy ameliorates novel calcification markers and GSM score in patients with carotid stenosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2008;35:661-8.
61. Kadoglou NPE, Sailer N, Moutzouoglou A, Kapelouzou A, Gerasimidis T, Liapis CD. Aggressive lipid-lowering is more effective than moderate lipid-lowering treatment in carotid plaque stabilization. *Journal of Vascular Surgery* 2010; 51: 114-21.
62. Della-Morte D, Moussa I, Elkind MS, Sacco RL, Rundek T. The short-term effect of atorvastatin on carotid plaque morphology assessed by computer-assisted gray-scale densitometry: a pilot study. *Neurol Res*. 2011; 33 (9): 991-4.
63. Belcaro G, Laurora G, Cesarone MR, De Sanctis MT, Incandela L, Fascetti E, Geroulakos G, Ramaswami G, Pierangeli A, Nikolaidis AN. Ultrasonic classification of carotid plaque causing less than 60% stenosis according to

- ultrasound morphology and events. *Journal of Cardiovascular Surgery* 1993; 34 (4): 287-94.
64. Grønholdt ML, Wiebe BM, Laursen H, Nielsen TG, Schroeder TV, Sillesen H. Lipid-rich carotid artery plaques appear echolucent on ultrasound B-mode images and may be associated with intraplaque haemorrhage. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1997; 14:439-45.
65. Libby P, Aikawa M. Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets. *Nature Medicine* 2002; 8 (11): 1257-62.
66. Geroulakos G, Ramaswami G, Nikolaidis AN, James K, Labropoulos N, Belcaro G, Holloway M. Characterization of symptomatic and asymptomatic carotid plaques using high-resolution real-time ultrasonography. *British Journal of Surgery* 1993; 80 (10): 1274-7
67. Gray-Weale AC, Graham JC, Burnett JR, Byrne K, Lusby RJ. Carotid artery atheroma: comparison of preoperative B-mode ultrasound appearance with carotid endarterectomy specimen pathology. *Journal of Cardiovascular Surgery* 1988; 29 (6): 676-81