



UNIVERSITÀ  
POLITECNICA  
DELLE MARCHE

Scuola di Dottorato di Ricerca in Salute dell'Uomo-Ciclo XXXI

## Enhancement di parete degli aneurismi intracranici alla RMN ad alta risoluzione: un segno di rottura?

Vessel wall enhancement of IntraCranial Aneurysms on high resolution MRI: a  
RUpture Sign? ICARUS Study

Dottorando:

Dr. Michele Luzi

Tutor:

Prof. Maurizio Iacoangeli

Co-Tutor:

Dr.ssa Lavinia Dinia

*Questa tesi è dedicata a mia figlia Caterina  
che con il suo sorriso ed il suo entusiasmo  
rende splendide anche le giornate più difficili*

# INDICE

## Abstract

- Introduzione.....5
- Ipotesi, obiettivo e metodi.....6
- Rilevanza scientifica.....7
- Risultati.....7
- Conclusioni.....8

## Introduzione

1. Aneurismi intracranici.....11
2. Storia Naturale degli Aneurismi Intracranici.....17
3. Fattori di rischio.....21
4. Modificazioni istopatologiche ed emodinamiche delle pareti vasali.....29
5. Il ruolo delle cellule muscolari lisce nella formazione e rottura degli aneurismi  
sacculari intracranici.....37
6. Tecniche Neuroradiologiche.....41
7. Trattamento neurochirurgico ed endovascolare.....44

Stato dell'Arte.....46

Ipotesi.....49

<b>Research Challenges</b> .....	50
<b>Scopi e Obiettivi</b> .....	50
<b>Materiali e Metodi</b> .....	52
1. Risonanza Magnetica.....	55
2. Angiografia a sottrazione Digitale.....	57
3. Tecnica chirurgica.....	57
4. Studio dei marcatori d'inflammatione nel sangue periferico.....	58
5. Studio genetico.....	58
6. Studio istologico ed immunoistochimico.....	59
7. Analisi statistica.....	65
8. Limitazioni dello studio.....	66
<b>Risultati</b> .....	67
Analisi istologica.....	75
Analisi statistica.....	80
Analisi dello studio istologico e immunoistochimico.....	91
<b>Case Report</b> .....	95
<b>Discussione</b> .....	102
<b>Conclusioni</b> .....	113
<b>Bibliografia</b> .....	115

# ABSTRACT

**Introduzione:** L'aneurisma cerebrale è ancora un'entità clinica potenzialmente devastante. Gli aneurismi sacculari intracranici sono dilatazioni patologiche delle arterie cerebrali che colpiscono il 3-5% della popolazione adulta mondiale e che hanno maggiore incidenza tra la quarta e sesta decade con prevalenza nel sesso femminile. Circa il 20-30% dei pazienti è portatore di aneurismi multipli. E' stimato che tra 10-15 individui almeno uno sia portatore inconsapevole di un aneurisma cerebrale.

La rottura di un aneurisma sacculare intracranico ha ancora conseguenze devastanti: morte nel 50% dei casi e grave disabilità nel 35% di pazienti giovani.

Il rischio di rottura è tutt'oggi difficilmente prevedibile.

L'infiammazione gioca un ruolo decisivo nella formazione e nella rottura degli aneurismi.

La Risonanza Magnetica della parete dei vasi intracranici costituisce un nuovo approccio diagnostico che permette di visualizzare la "luminosità dell'aneurisma" dovuta ad infiammazione e assottigliamento della parete. La RM della parete dei vasi cerebrali può, infatti, evidenziare un'infiammazione vascolare intracranica visualizzando direttamente anomalie della parete vasale attraverso sequenze di Risonanza Magnetica a 3 Tesla che sopprimono il segnale del sangue ed hanno una eccellente risoluzione spaziale.

La letteratura corrente evidenzia, infatti, come la presa di contrasto della parete vasale alla Risonanza Magnetica (MRI) può suggerire una patologia della parete stessa ed identificare una instabilità nell'aneurisma sacculare intracranico precedente la rottura.

L'identificazione di un segno di rottura precoce può permettere di personalizzare il trattamento offerto, migliorando di conseguenza la sopravvivenza e l'outcome e riducendo il costo sociale e l'impatto familiare.

**Ipotesi:** L'ipotesi principale dello studio è che l'enhancement della parete vasale alla risonanza magnetica ad alta risoluzione (3T-MRI) sia un marcatore potente ed affidabile della infiammazione della parete dell'aneurisma e della sua conseguente rottura,

**Obiettivo:**

Lo scopo principale di questo studio è di valutare la capacità diagnostica della presa di contrasto della parete vasale come biomarker d'infiammazione della parete dell'aneurisma, confermando che la presa di contrasto è correlata ad una alterazione istologica della parete ed al conseguente aumentato rischio di rottura. Altro obiettivo è quello di studiare una correlazione tra presa di contrasto della parete vasale e biomarkers infiammatori nel sangue periferico prelevando un campione ematico nei pazienti con presa di contrasto della parete aneurismatica al fine di valutare un incremento degli indici di flogosi.

**Metodi:** Una serie consecutiva di 50 pazienti sintomatici o asintomatici con aneurisma rotto o non rotto sono stati inclusi nello studio. I fattori di rischio per rottura sono stati registrati. Lo studio MRI della parete degli aneurismi è stato eseguito su Risonanza 3 Tesla, con sequenze ad alta risoluzione T1 e T2-pesate prima e dopo iniezione di mezzo di contrasto.

Due neuroradiologi esperti in patologia vascolare hanno studiato le immagini indipendentemente.

Nei pazienti sottoposti ad intervento chirurgico, è stata effettuato uno studio istologico ed immunoistochimico.

Su tutti i pazienti è stato inoltre eseguito prelievo ematico per analizzare molteplici biomarkers di infiammazione periferica (IL-1, MMP-9, TNF- $\alpha$  et al).

L'analisi di regressione logistica univariata e multivariata è stata effettuata per investigare l'associazione tra presa di contrasto della parete vasale degli aneurismi con fattori di rischio noti, caratteristiche dell'aneurisma (dimensione, sede, conformazione, molteplicità) ed altri fattori clinici e laboratoristici.

**Rilevanza scientifica:** Le attuali conoscenze sulle caratteristiche delle pareti aneurismatiche sugli studi MRI delle pareti vasali sono in continua evoluzione.

I dati presenti in letteratura sono basati su piccole serie o dati retrospettivi.

Lo studio MRI della parete vascolare può potenzialmente permettere di identificare immagini suggestive di patologia della parete vascolare (inclusi infiammazione, neoangiogenesi, emorragia intramurale e rottura) e, a volte, di identificare biomarkers neuroradiologici del comportamento dell'aneurisma.

Lo scopo dello studio è di valutare la capacità della MRI della parete vascolare di prevedere il comportamento biologico confrontandola con fattori di rischio noti per rottura.

**Risultati:** L'analisi della relazione tra la captazione di parete nei tre gruppi di pazienti studiati ha mostrato come la captazione di contrasto fosse significativamente presente nel 100% degli aneurismi rotti; nei pazienti sintomatici la captazione era presente nel 50% dei casi mentre tra gli asintomatici nel 33% ( $p=0.003$ ). Un'elevazione dello score PHASES ha mostrato una correlazione statistica con la captazione e con i sottotipi di paziente. E'

stata individuata una linea di taglio di circa 4 al di sopra della quale la maggior parte degli aneurismi comincia a captare ( $p < 0.001$ ).

L'analisi di regressione logistica ha dimostrato che sono predittori indipendenti di rottura: la captazione ( $p = 0.018$ ), la presenza di aneurismi multipli ( $p = 0.016$ ).

Predittori indipendenti di captazione dell'aneurisma: le dimensioni dell'aneurisma ( $p = 0.001$ ), la presenza di variabili anatomiche del circolo di Willis ( $p = 0.005$ ) e la morfologia irregolare dell'aneurisma ( $p = 0.016$ ). L'analisi di sensibilità e specificità della captazione come predittore di rottura ha dimostrato ( $p = 0.002$ ): sensibilità: 100%, specificità: 64%, VP positivo: 28%, VP negativo: 100%. I markers CD3 e CD34 (linfociti T e vasa vasorum) sono tendenzialmente più alti nei pazienti captanti ( $p = 0.061$  e  $p = 0.083$ ). Esisteva una correlazione diretta tra il numero di marcatori immunohistochimici d'infiammazione alterati e la presenza di captazione di parete con un cut-off di circa 7. Pazienti con un indice al di sotto del 7 non mostravano captazione mentre tutti i pazienti con un indice superiore mostravano captazione alla RM ( $p = 0.043$ ). Un punteggio superiore a 7, offre un 100% di sensibilità, specificità, VPP e VPN in relazione alla presenza di captazione aneurismatica.

**Conclusioni:** I nostri risultati preliminari di uno studio su una coorte di pazienti più ampia, confermano che la presa di contrasto della parete ed i markers infiammatori aumentati siano in grado di rilevare, negli aneurismi non rotti, una tendenza alla rottura. Questi dati sono stati, inoltre, confermati dagli studi neuroradiologici ed anatomopatologici su aneurismi rotti con evidenza, dapprima, della captazione di contrasto da parte della parete, successivamente di alterazioni di struttura allo studio istologico del campione operatorio.

Il presente studio conferma l'importanza di eseguire accertamenti accurati durante la valutazione di aneurismi non rotti al fine di poter stratificare l'individuale rischio di rottura, basato sulle caratteristiche stesse dell'aneurisma e non su fattori ambientali o di rischio calcolati sulla popolazione generale.

# RINGRAZIAMENTI

Il mio primo ringraziamento desidero esprimerlo alla **Dr.ssa Lavinia Dinia**, collega, amica e compagna, che con la sua vivace intelligenza e la sua incredibile concretezza ha progettato e contribuito all'esecuzione di questo studio, che mi ha sempre sostenuto e spronato, anche nei momenti più complicati e senza la quale questo lavoro non sarebbe potuto essere scritto. A te va tutta la mia stima ed un immenso **grazie**.

Desidero inoltre ringraziare tutti i Colleghi dell'Hospital Vall d'Hebron di Barcellona che hanno contribuito alla progettazione ed esecuzione dello studio.

Un sentito ringraziamento esprimo al **Dr. Alejandro Tomasello Weitz**, Direttore della Neuroradiologia Interventistica dell'Hospital Vall d'Hebron di Barcellona per avermi accettato nel progetto ed alla sua equipe, in particolare la **Dr.ssa Pilar Coscojuela** ed il **Dr. David Hernandez**, per la loro disponibilità e cortesia.

Al **Dr. Fuat Arikan Abello**, Neurochirurgo, va la mia gratitudine per avermi fatto seguire i suoi interventi e per aver intrapreso una collaborazione che ci ha portati a trattare insieme casi complessi.

Ringrazio inoltre la **Dr.ssa Carla Vert**, Radiologa, la **Dr.ssa Elena Martinez Saez**, Anatomopatologa e la **Dr.ssa Laura Ludovica Gramegna** per il loro imprescindibile contributo alla tesi.

Un doveroso ringraziamento va inoltre ai miei Colleghi di tutti i giorni che rappresentano per me una seconda famiglia, **Dr. Roberto Trignani**, **Dr. Massimo Bernardini**, **Dr. Stefano Vecchioni** e **Dr. Massimo Vissani** che sono stati sempre disponibili per i miei cambi turno all'ultimo secondo e che mi hanno sempre incitato a proseguire questo progetto lungo e complesso.

Infine desidero ringraziare la mia famiglia per avermi supportato anche nei momenti di sconforto e difficoltà.

# INTRODUZIONE

## 1. Aneurismi Intracranici:

Gli aneurismi saccolari intracranici sono dilatazioni patologiche dei rami maggiori delle arterie cerebrali che colpiscono il 3-5% della popolazione adulta mondiale.

Solitamente gli aneurismi si sviluppano dopo la seconda decade di vita, più spesso nella quarta-sesta decade, ed hanno una prevalenza maggiore nel sesso femminile. Circa il 20-30% dei pazienti con aneurisma intracranico è portatore di più di un aneurisma.

E' importante evidenziare come gli aneurismi non saccolari abbiano un'unica patogenesi e siano trattati in maniera differente rispetto ai saccolari. Allo stesso modo vengono trattati in maniera differente gli aneurismi della popolazione pediatrica rispetto a quelli degli adulti.

Meno del 5% dei pazienti con aneurismi non rotti, infatti, sono pediatrici e vi è una sostanziale differenza nei fattori di rischio e meccanismo di formazione tra bambini ed adulti. Nei bambini il 50-70% degli aneurismi sono conseguenti a traumi, infezioni o dissezioni e, di questi, solo il 20-30% sono saccolari e generalmente sintomatici <sup>(1,3)</sup>.

La formazione di un aneurisma è un processo graduale e non ancora totalmente compreso poiché influenzato da complesse interazioni tra fattori genetici e fattori di rischio ambientali.

Il rischio di rottura a 5 anni dalla diagnosi di un aneurisma non rotto varia dal 1 al 15% in accordo con la variabilità dei fattori di rischio che la determinano e con le differenti casistiche.

Lo score PHASES, una classificazione che fornisce un rischio assoluto di rottura dell'aneurisma basato su sei fattori di rischio facilmente valutabili (età, razza, dimensioni, morfologia, ipertensione arteriosa e precedenti episodi di emorragia subaracnoidea) è stato dimostrato essere associato ad un aumentato rischio di accrescimento dell'aneurisma e ad una probabile rottura <sup>(4-5-6)</sup>.

Multipli studi in letteratura hanno dimostrato che la crescita di un aneurisma è un processo discontinuo e casuale piuttosto che progressivo e regolare. Tuttavia è riportato che il 12% degli aneurismi mostra un incremento dimensionale durante il follow-up ma non è noto come riconoscere con certezza un aneurisma incline alla crescita e rottura.

Il tasso annuale di rottura è approssimativamente di 8-10 casi/100.000 abitanti/anno. La rottura di un aneurisma provoca un'emorragia subaracnoidea con mortalità intorno al 40%. Dei pazienti che sopravvivono, circa il 66% presenta deficit neurologici permanenti <sup>(7)</sup>.

Si stima che nel mondo vi siano circa 500.000 decessi/anno causati da rottura di aneurisma cerebrale e la metà di queste persone ha meno di 50 anni e di solito non vi sono segni prodromici. La maggior parte degli aneurismi si sviluppa dopo i 40 anni.

Circa il 20% dei pazienti con emorragia subaracnoidea muore prima dell'arrivo in ospedale e circa il 10-15% prima di poter ricevere un trattamento.

La maggior parte dei decessi da emorragia subaracnoidea è dovuta ad un rapido e massivo danno cerebrale dovuto alla iniziale emorragia che non è limitabile dal trattamento medico o chirurgico.

La formazione, crescita e rottura di un aneurisma cerebrale costituiscono un processo graduale e non completamente conosciuto influenzato da una complessa interazione tra fattori genetici e fattori di rischio ambientali. Gli studi istopatologici confermano l'ipotesi che l'infiammazione giochi un ruolo fondamentale nella sua formazione, crescita e rottura. L'interruzione dell'endotelio, l'apoptosi delle cellule muscolari lisce e l'invasione della parete vasale da parte delle cellule infiammatorie sono fenomeni correlati con la rottura di un aneurisma.

Fenomeni degenerativi emodinamici, come lo stress emodinamico a carico della parete vasale, e fattori di rischio vascolare associati ad una predisposizione genetica, sono coinvolti insieme nel processo di formazione e rottura di un aneurisma.

Un'accurata diagnosi precoce è fondamentale essendo l'emorragia iniziale potenzialmente fatale o con conseguente grave disabilità neurologica.

Nonostante l'ampia disponibilità di mezzi di neuroimaging, una mancata o ritardata diagnosi è evidenziata in più del 25% di pazienti con emorragia subaracnoidea al ricovero per trattamento medico.

Il 73% di queste mancate diagnosi è dovuto all'assenza di neuroimaging.

Questo rende l'emorragia subaracnoidea una patologia a bassa frequenza ma ad alto rischio.

Gli aneurismi possono essere classificati in base alla loro dimensione e forma.

In relazione alle dimensioni, possono essere definiti come:

- piccoli (<6 mm),
- medi (7-12 mm),
- grandi (13-24 mm) o
- giganti; gli aneurismi giganti sono stati arbitrariamente definiti come quelli > 25 mm

Diversi studi sono stati pubblicati negli anni per quantificare il rischio di rottura di un aneurisma non rotto. Gli studi più significativi sono sicuramente l'ISUIA (International Study of Unruptured Aneurysms) e l'UCAS Japan (Unruptured Cerebral Aneurysm Study)<sup>(24,49)</sup>.

La prima fase dello studio ISUIA analizza retrospettivamente i dati di 1449 pazienti con 1937 aneurismi non rotti ricoverati in 63 centri di Nord America ed Europa. Da questi dati risulta che in pazienti senza storia di pregressa emorragia subaracnoidea in rischio di rottura era 0.05% all'anno per aneurismi di diametro <10mm e di circa l'1% all'anno per quelli di diametro superiore. Le dimensioni dell'aneurisma (rischio relativo (RR) 11.6 per 10-24 mm e 59 per >24 mm rispetto a quelli <10mm) e la localizzazione nel circolo posteriore (RR 13.8 per apice della basilare, 13.6 per circolazione posteriore rispetto alla anteriore e 8.8 per arteria comunicante posteriore) erano predittori di rischio di rottura.

La seconda parte è invece eseguita come studio prospettico su 1692 pazienti con 2686 aneurismi seguiti per una media di 4,1 anni in 61 centri. Dopo analisi dei risultati il rischio di rottura è stato riferito alle dimensioni (con un nuovo cut-point a 7 mm), storia di pregressa emorragia subaracnoidea e localizzazione.

Nei pazienti senza storia di pregressa emorragia ed aneurismi di dimensioni inferiori a 7mm e localizzati nel circolo anteriore non vi era rischio di rottura che invece era del 2,5% all'anno per aneurismi del circolo posteriore o dell'arteria comunicante posteriore.

Per gli aneurismi minori di 7 mm ma in pazienti con pregressa emorragia subaracnoidea, il rischio era del 1,5% nel circolo anteriore e del 3,4% all'anno nel circolo posteriore.

Lo studio UCAS Japan incluse invece 6697 pazienti seguiti per una media di 1,7 anni riscontrando un tasso di rottura dello 0,95%. Questo variava significativamente in base alle dimensioni (da 0,36% per aneurismi di 3-4 mm,

0.50% per aneurismi 5-6mm, 1,69% per diametro compreso tra 7-9mm e 4,37% per 10-24mm, fino al 33,4% per aneurismi >25mm. Anche la sede (circolo posteriore) e la presenza di irregolarità della parete risultavano fattori di rischio di rottura.

Altri studi sono stati pubblicati ma vi è discrepanza nei risultati in quanto quelli basati su studi su campione di popolazione giapponese presentano risultati differenti rispetto all'ISUIA, in particolare perché tutti gli aneurismi che andavano incontro a rottura erano del circolo anteriore e la maggior parte nei pazienti senza storia di pregressa emorragia subaracnoidea o familiarità. Queste divergenze potrebbero essere legate a diverse caratteristiche degli aneurismi nella popolazione di razza giapponese oppure essere dovute ad errori nella validazione degli studi.

Il rischio di rottura è ovviamente un dato fondamentale per pianificare il trattamento cui sottoporre il paziente.

Nessun trattamento preventivo è solitamente proposto per aneurismi di diametro inferiore a 3 mm, tuttavia è noto che alcuni piccoli aneurismi vanno incontro a rottura. Tale dato porterebbe a considerare piuttosto favorevole un precoce trattamento neurochirurgico o endovascolare per tutti gli aneurismi intracranici non rotti. Tuttavia questi trattamenti sono associati ad un tasso di mortalità approssimativo del 2% ed un tasso di disabilità a lungo termine rispettivamente del 15 e 5%, pertanto questa soluzione appare controversa <sup>(2)</sup>.

L'equilibrio tra rischi e benefici nelle differenti opzioni di trattamento deve essere, quindi, personalizzato in relazione alle caratteristiche dell'aneurisma (dimensioni, sede, conformazione, molteplicità) e ad altri fattori di rischio clinici.

Per valutare il rischio in paziente portatore di aneurismi multipli, ogni aneurisma deve essere valutato separatamente. Nei pazienti sintomatici con emorragia subaracnoidea ed aneurismi multipli, esiste un dilemma pratico su quale

aneurisma abbia sanguinato e debba, quindi, essere trattato con maggiore urgenza.

## Neuroimaging:

I metodi tradizionali per visualizzare un aneurisma intracranico sono "luminali", ovvero forniscono immagini del lume arterioso, ma non delle pareti del vaso stesso.

La Risonanza Magnetica delle pareti vasali (***Intracranial vessel wall magnetic resonance imaging IVW-MRI***) è una moderna tipologia di neuroimaging che ha lo scopo di valutare la patologia vascolare intracranica visualizzando direttamente le anomalie della parete vascolare attraverso sequenze RMN 3 Tesla ad ampio campo che sopprimendo il segnale del sangue presenta un'eccellente risoluzione spaziale.

Studi recenti hanno mostrato come l'enhancement della parete vascolare sia più frequente negli aneurismi saccolari "instabili" (rotti, sintomatici, o in via di modificazione morfologica) rispetto a quelli "stabili" (incidentalì o senza modificazione).

Quello che rimane ancora oscuro, ma di fondamentale importanza, è la capacità dell'enhancement di parete di prevedere un futuro rischio di rottura.

Lo studio dei fattori di rischio per rottura è dunque molto importante. I moderni studi di neuroimaging dovrebbero essere integrati dalle immagini dell'aneurisma stesso evidenziando l'importante ruolo dell'infiammazione nella rottura di un aneurisma intracranico.

## 2. Storia Naturale degli Aneurismi Intracranici

Secondo la letteratura attuale fattori dannosi emodinamici, come lo stress emodinamico e fattori di rischio vascolare (inclusi ipertensione, iperlipidemia, arteriosclerosi e fumo) associati a predisposizione genetica, sono tutti coinvolti nel processo di formazione degli aneurismi <sup>(8-9)</sup>.

Gli aneurismi non rotti non sono patologie congenite ma si sviluppano nel corso della vita e sono estremamente rari prima dei 20 anni. La probabilità di formazione di un aneurisma cerebrale è aumentata nei pazienti con pregressa emorragia subaracnoidea, storia familiare di aneurismi intracranici o con sindrome del rene policistico autosomica dominante rispetto alla popolazione di riferimento <sup>(10-11)</sup>.

I disturbi del tessuto connettivo sono spesso citati tra i fattori di rischio per la formazione di aneurismi ma alcuni studi non supportano tale associazione.

Dagli studi autoptici si è notato, infatti, un incremento nell'incidenza di formazione di aneurismi intracranici in pazienti con patologie come rene policistico, sindrome di Marfan, coartazione aortica, valvola aortica bicuspidale, pseudoxantoma elastico, teleangiectasia emorragica, neurofibromatosi tipo 1, deficit di  $\alpha_1$  antitripsina, displasia fibromuscolare, feocromocitoma, sindrome di Klinefelter, sclerosi tuberosa, sindrome di Noonan. Per il rene policistico autosomico dominante, il rischio di formazione di aneurisma intracranico è aumentato da 3 a 14 volte<sup>(38)</sup>.

Tuttavia, in larghe coorti di studi, tutte queste forme patologiche corrispondono a meno del 10% dei pazienti con aneurisma intracranico non rotto, per cui la maggior parte dei casi di aneurisma è attribuibile ad altri fattori di rischio <sup>(24)</sup>.

La vera incidenza della formazione di aneurisma intracranico sporadico e la conseguente importanza dei fattori di rischio è difficile da registrare. La maggior parte dei dati, infatti, proviene da pazienti con pregressa emorragia subaracnoidea

da altri aneurismi e pertanto viene considerata come popolazione più incline allo sviluppo di aneurismi rispetto alla popolazione di riferimento.

Anche fattori genetici ed ambientali influenzano la possibilità di formazione degli aneurismi intracranici e vi sono complesse interazioni con conseguente reciproco effetto di rinforzo tra i due fattori.

Tra gli individui con anamnesi familiare positiva per aneurisma cerebrale, ad esempio, i fumatori hanno un rischio tre volte superiore rispetto ai non fumatori di sviluppare un aneurisma ed il rischio totale è due volte maggiore nelle donne <sup>(12-13)</sup>.

E' stata riscontrata una frequenza leggermente più alta nel riscontro di aneurisma intracranico in parenti di primo grado di pazienti con pregressa emorragia subaracnoidea. Un incremento nella diagnosi è stato evidenziato inoltre se 2 membri della stessa famiglia hanno anamnesi positiva per aneurisma cerebrale o emorragia subaracnoidea.

Uno studio pubblicato su Lancet Neurology nel 2014 eseguito a lungo termine mediante screening con Angio RMN ed AngioTC cerebrale in pazienti con almeno 2 familiari di primo grado affetti da emorragia subaracnoidea o con aneurisma intracranico non rotto, ha permesso il riscontro di un aneurisma intracranico nell'11% dei pazienti al primo screening, nell'8% al secondo e nel 5% nel terzo e quarto screening mostrando quindi un sostanziale rischio di rottura di aneurisma a 10 anni dal primo screening anche dopo 2 screening iniziali negativi<sup>(39)</sup>.

I pattern di eredità degli aneurismi intracranici non sono certi ma il più probabile sembra essere di tipo autosomico dominante.

Molti geni o regioni cromosomiali sono stati identificati sia negli aneurismi sporadici che in quelli familiari.

Negli studi genetici, regioni nei cromosomi 1p34.3-p36.13, 7q11, 19q13.3 e Xp22 sono state associate ad aneurismi intracranici.

Una meta-analisi su aneurismi rotti e non rotti ha identificato il gene IL 6 G572C come associato ad elevato rischio anche se un vero e proprio fattore di rischio genetico per rottura non è stato ancora identificato<sup>(40,41)</sup>.

La formazione di un aneurisma ha, pertanto, una genesi multifattoriale con il concorso di fattori anatomici, biochimici, meccanici, genetici e acquisiti molti ancora probabilmente sconosciuti. I dati anatomofisiologici più recenti si basano su studi modellizzati di fluidodinamica computazionale (Computed Fluid Dynamics, CFD) e applicazioni su modelli animali con ovvi limiti di interpretazione dei risultati sulla popolazione umana. Le accelerazioni del flusso in corrispondenza delle biforcazioni arteriose determinano l'assottigliamento della lamina elastica interna ma anche variazioni emodinamiche con conseguente attivazione di una cascata di eventi biochimici all'interno della parete che danno inizio alla formazione dell'aneurisma. Tuttavia, affinché si arrivi alla formazione di un aneurisma, occorre che la parete vasale sia già indebolita da fattori acquisiti (fumo di sigaretta, ipertensione arteriosa, deficienza estrogenica) oppure da fattori ereditari (es. rene policistico). Ci sono, infatti, alcune alterazioni congenite o parzialmente acquisite del circolo di Willis che sono associate ad un flusso alterato e ad una maggiore frequenza di aneurisma come ad esempio una incompleta arteria comunicante posteriore spesso rilevabile in soggetti con aneurisma e con storia familiare di aneurisma. Gli aneurismi dell'arteria comunicante anteriore, comunicante posteriore e basilare spesso sono associati ad un tratto A1 ipoplasico, ad una comunicante posteriore di tipo fetale o ad un circolo di Willis asimmetrico. Molto spesso sono singole variazioni del circolo di Willis come A1 o P1 ipoplasiche ad essere sufficienti per creare importanti modificazioni di flusso.

Gli studi animali hanno mostrato che la progressione dell'aneurisma avviene in seguito ad un processo infiammatorio della parete con attivazione di fattori di

degradazione della parete che agiscono in concorso con l'insulto emodinamico<sup>(53,54)</sup>.

La crescita di un aneurisma sarebbe, infatti, determinata dall'equilibrio tra forze emodinamiche e biomeccaniche che comportano, nella parete aneurismatica, modificazioni di tipo proliferativo e degenerativo. L'equilibrio tra questi due processi mantiene l'aneurisma stabile mentre lo squilibrio, legato, secondo alcuni studi, ad un fattore emodinamico critico noto come "tensione di taglio" (Wall Shear Stress - WSS) porterebbe alla progressione dell'aneurisma e probabile rottura<sup>(57)</sup>(Fig.1).

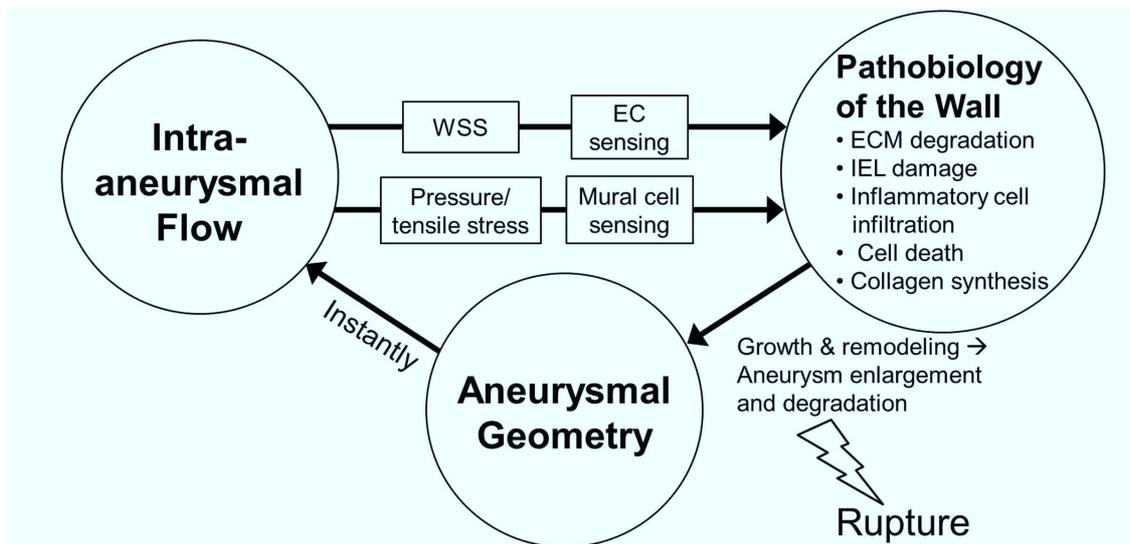


Fig.1 Relazione tra flusso, parete vascolare e geometria dell'aneurisma. Il flusso determina uno stress meccanico sulla parete del vaso che scatena meccanismi biologici cellulo-mediati. I cambiamenti biologici della parete comportano una modificazione geometrica dell'aneurisma con conseguente alterazione del flusso

Ci sono in sostanza, eventi biologici ed emodinamici variabili che determinano alterazione nell'equilibrio tra fenomeni degenerativi e riparativi in zone differenti della parete dell'aneurisma con conseguente possibile evoluzione in rottura verosimilmente in concomitanza di fattori emodinamici stressanti come attività fisica intensa, aumento della pressione arteriosa, aumento delle pulsazioni cardiache e conseguente aumento della tensione di taglio(Fig.2).

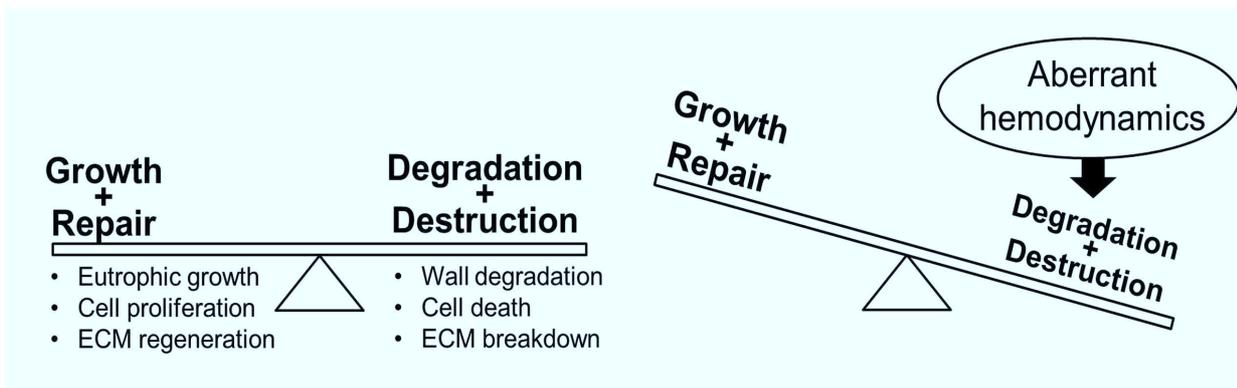


Fig.2 L'equilibrio tra i fenomeni di crescita/riparazione e degradazione/distruzione mantiene stabile l'aneurisma. Fattori emodinamici aberranti possono modificare questo equilibrio ed aggravare il processo di degradazione/distruzione.

### 3. Fattori di rischio di formazione e rottura:

Lo score PHASES, pubblicato sul Lancet nel 2014, rappresenta, ad oggi, lo studio eseguito sulla più ampia popolazione. Sono stati, infatti, analizzati dati su un campione di 8382 pazienti con 10272 aneurismi non rotti intracranici provenienti da Europa (inclusa la Finlandia), Nord America e Giappone (Tab.1).

## PHASES SCORE

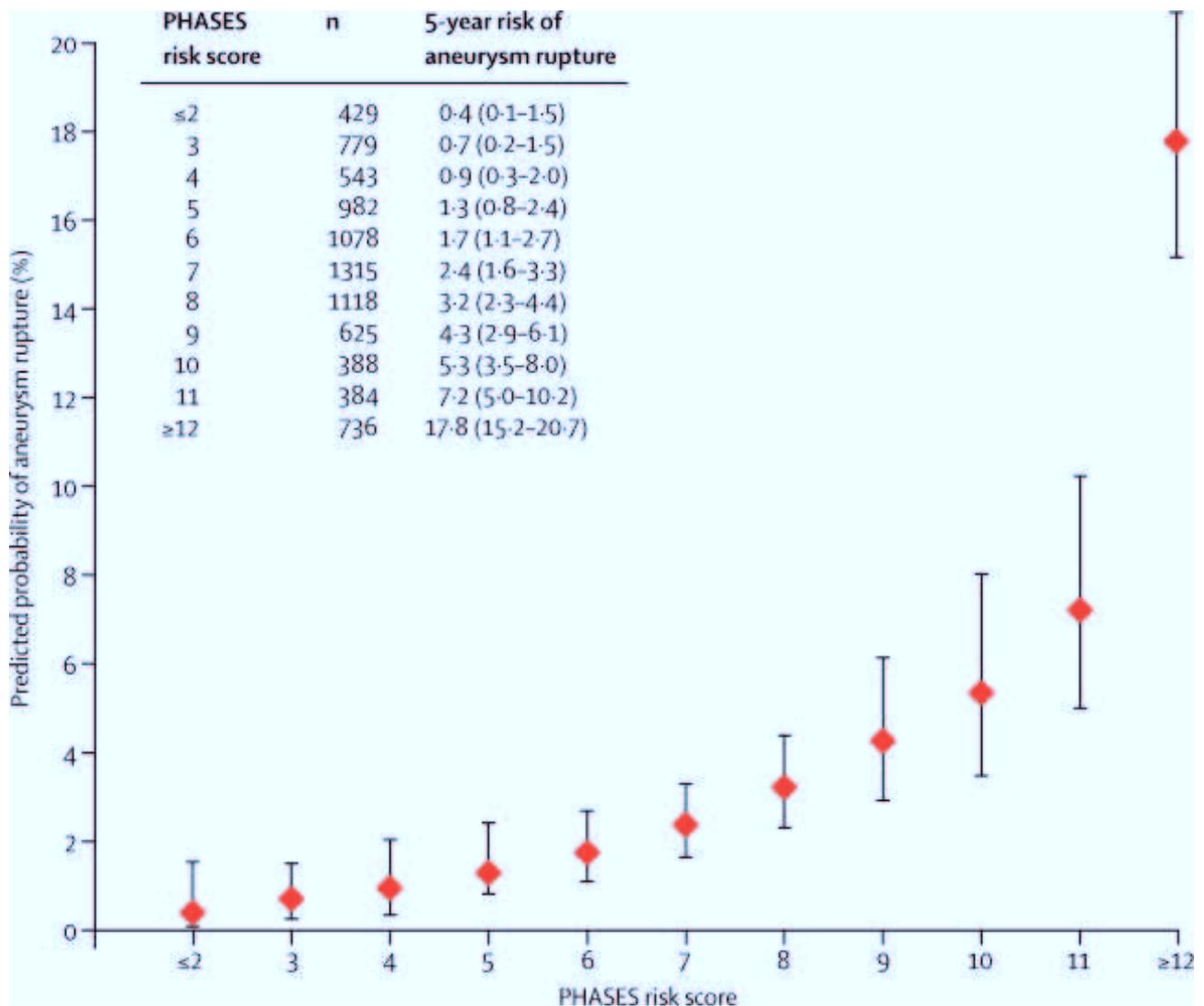
<b>POPULATION:</b> -North American, European (other than Finnish): 0 points -Japanese: 3 points -Finnish: 5 points	<b>HYPERTENSION:</b> -No: 0 points -Yes: 1 point	<b>AGE:</b> - <70 years: 0 points - ≥70 years: 1 point
<b>SIZE OF ANEURYSM:</b> - < 7 mm: 0 points - 7-9.9 mm: 3 points - 10-19.9 mm: 6 points - ≥20 mm: 10 points	<b>EARLIER SUBARACHNOID HEMORRHAGE (from other aneurysm):</b> -No: 0 points -Yes: 1 point	<b>SITE OF ANEURYSM:</b> -Internal carotid artery: 0 points -Middle cerebral artery: 2 points -Anterior communicating/Posterior communicating/Posterior circulation: 4 points
<b>5-YEAR ABSOLUTE RISK OF RUPTURE</b>		
- ≤ 2 points: 0.4% - 3 points: 0.7% - 4 points: 0.9% - 5 points: 1.3%	- 6 points: 1.7% - 7 points: 2.4% - 8 points: 3.2% - 9 points: 4.3%	- 10 points: 5.3% - 11 points: 7.2% - ≥ 12 points: 17.8%

## UIATS SCORE

<b>PATIENT:</b> -Age: _____ 0-4 points -Risk factors incidence: _____ 1-19 points Previous SAH, familial UIA or SAH, ethnicity, current smoking, hypertension, autosomal polycystic kidney disease, current drug abuse, current alcohol abuse -Clinical symptoms from UIA: 1-12 points Cranial nerve deficit, clinical or radiological mass effect, thrombo-embolic events, epilepsy -Other: _____ 1-3 points Reduced quality of life due to fear of rupture, aneurysm multiplicity -Life expectancy: _____ 1-4 points -Comorbid disease: _____ 2-7 points	<b>ANEURYSM:</b> -Maximum diameter: _____ 0-4 points ≤3.9 mm, 4-6.9 mm, 7-12.9 mm, 13-24.9 mm, ≥ 25 mm -Morphology: _____ 1-4 points Irregularity or lobulation, size ratio>3 or aspect ratio >1.6 -Location: _____ 2-11 points Basilar bifurcation, vertebrobasilar artery, anterior/posterior communicating arteries -Other: _____ 1-8 points Aneurysm growth, de novo formation, contralateral stenooclusive vessel disease	<b>TREATMENT:</b> -Age related risk: _____ 0-5 points <40, 41-60, 61-70, 71-80, >80 years -Aneurysm size-related risk: _____ 0-5 points <6 mm, 6-10 mm, 10.1-20 mm, >20 mm -Aneurysm complexity-related risk: _____ 0-3 points High, low -Intervention related risk (constant): _____ 5 points
<b>UIATS SCORE</b>		
-Favors UIA repair: points from Patient (age, risk factor incidence, clinical symptoms and other) and Aneurysm. -Favors conservative management: points from Patient (life expectancy, comorbid disease) and Treatment. <b>≥3 points difference between these two options will suggest an individual treatment recommendation</b>		

Tab.1: Fattori di rischio valutati negli studi PHASES e UIATS

In questo studio vengono identificati sei indipendenti fattori predittivi di rottura (razza, ipertensione arteriosa, età, dimensioni dell'aneurisma, pregressa emorragia subaracnoidea da altro aneurisma e sede dell'aneurisma) a cui vengono assegnati punti la cui somma (PHASES score) è associata ad un rischio di rottura più o meno elevato<sup>(15)</sup>(Tab.2).



Tab.2: Rischio di sanguinamento in base allo score PHASES

Il rischio di rottura osservato a 5 anni varia dallo 0.4% al 17,8% a seconda dello score.

Una review pubblicata quest'anno su Stroke<sup>(16)</sup> distingue i fattori di rischio per rottura di aneurisma intracranico in due categorie:

## Fattori di rischio correlati al paziente

Modificabili:

- Ipertensione arteriosa
- Abitudine tabagica
- Consumo di alcool

Non modificabili:

- Età
- Razza
- Pregressa emorragia subaracnoidea
- Sesso
- Aneurismi multipli
- Anamnesi familiare positiva per pregressa ESA o aneurisma non rotto

## Fattori di rischio correlati all'aneurisma

- Dimensioni
- Sede
- Irregolarità
- Tasso di crescita
- Presa di contrasto
- Morfologia

I fattori di rischio correlati al paziente e di tipo modificabile, oltre all'ipertensione arteriosa già dimostrata nello studio PHASES, sono il fumo di sigaretta ed il consumo di alcool.

Il fumo di sigaretta è stato recentemente associato con incrementata incidenza di emorragia subaracnoidea in particolare in base all'intensità e alla durata dell'abitudine tabagica.

L'effetto degenerativo dell'abuso alcolico non è stato invece ancora riportato in molti studi. Rimane però ancora poco chiaro quando diminuisca il rischio di rottura nei pazienti che smettono di fumare e di bere alcool e normalizzano la pressione arteriosa. E' stato inoltre ipotizzato che sostanze stimolanti, come ad esempio la cocaina, siano fattori di rischio di formazione e rottura di aneurisma ma non è ancora chiaro se siano fattori indipendenti in quanto determinano episodi di incremento pressorio e spesso sono consumate da pazienti con altri fattori di rischio (fumo, alcool) <sup>(16)</sup>.

Tra i fattori non modificabili correlati al paziente, oltre a quelli già esposti nello score PHASES (età, razza e pregressa emorragia subaracnoidea da rottura di un altro aneurisma), il più importante è sicuramente la familiarità per emorragia subaracnoidea o per presenza di aneurisma non rotto in più di 2 parenti di primo grado(Fig.3). Lo studio FIA del 2009 (Familial Intracranial Aneurysm) eseguito su parenti di primo grado di pazienti con aneurisma intracranico e abitudine tabagica o ipertensione arteriosa mostrava un rischio di rottura 17 volte superiore rispetto ai dati riportati nello studio ISUIA (International Study on Unruptured Aneurysms) per aneurismi minori di 6mm <sup>(17)</sup>.

Nonostante questo dato, non sono però stati identificati geni associati a tale aumento del rischio di rottura.

Ci sono invece dati contrastanti per quanto riguarda l'età poiché studi su popolazione finlandese e giapponese mostrano un aumento del rischio di rottura a lungo termine nei pazienti minori di 50 anni mentre nello studio PHASES, che prende in considerazione razza europea-nord americana, finlandese e giapponese, è riportato nei pazienti con più di 70 anni<sup>(58,59)</sup>.

La razza è considerata un fattore di rischio non modificabile del paziente poiché è stato evidenziato da diversi anni un aumentato tasso di rottura di aneurismi nella popolazione finlandese e giapponese. Tuttavia, rimane ancora poco chiaro quanto

il rischio dipenda dall'etnia e quanto dai fattori di rischio ambientali in queste popolazioni, essendosi riscontrata una significativa riduzione delle emorragie subaracnoidee (valore indiretto del rischio di rottura) parallela alla drastica riduzione dell'abitudine tabagica nella popolazione finlandese.

I più importanti fattori di rischio di rottura correlati all'aneurisma sono la morfologia ed eventuale irregolarità, il tasso di crescita e la presenza di infiammazione nella parete.

L'irregolarità di un aneurisma è considerata dagli studi più recenti un fattore di rischio indipendente.

La morfologia dell'aneurisma è solitamente associata ad un aumentato rischio di rottura ma i dati devono ancora essere validati da studi su campioni più significativi.

La crescita di un aneurisma avviene nel 12-18% dei pazienti con aneurisma nei primi 2 anni e nel 45% in 19 anni di follow-up ed è un noto indice di rottura<sup>(6)</sup>.

Uno studio retrospettivo su 165 pazienti e 258 aneurismi ha mostrato un rischio di rottura 12 volte superiore negli aneurismi con evidenza di crescita<sup>(44)</sup>.

Sempre più articoli riportati in letteratura evidenziano l'importanza dell'infiammazione della parete dell'aneurisma nel rischio di rottura. Tale infiammazione viene radiologicamente identificata come captazione di mezzo di contrasto alla risonanza magnetica e pare essere indipendente dalla sede e dalle dimensioni dell'aneurisma.

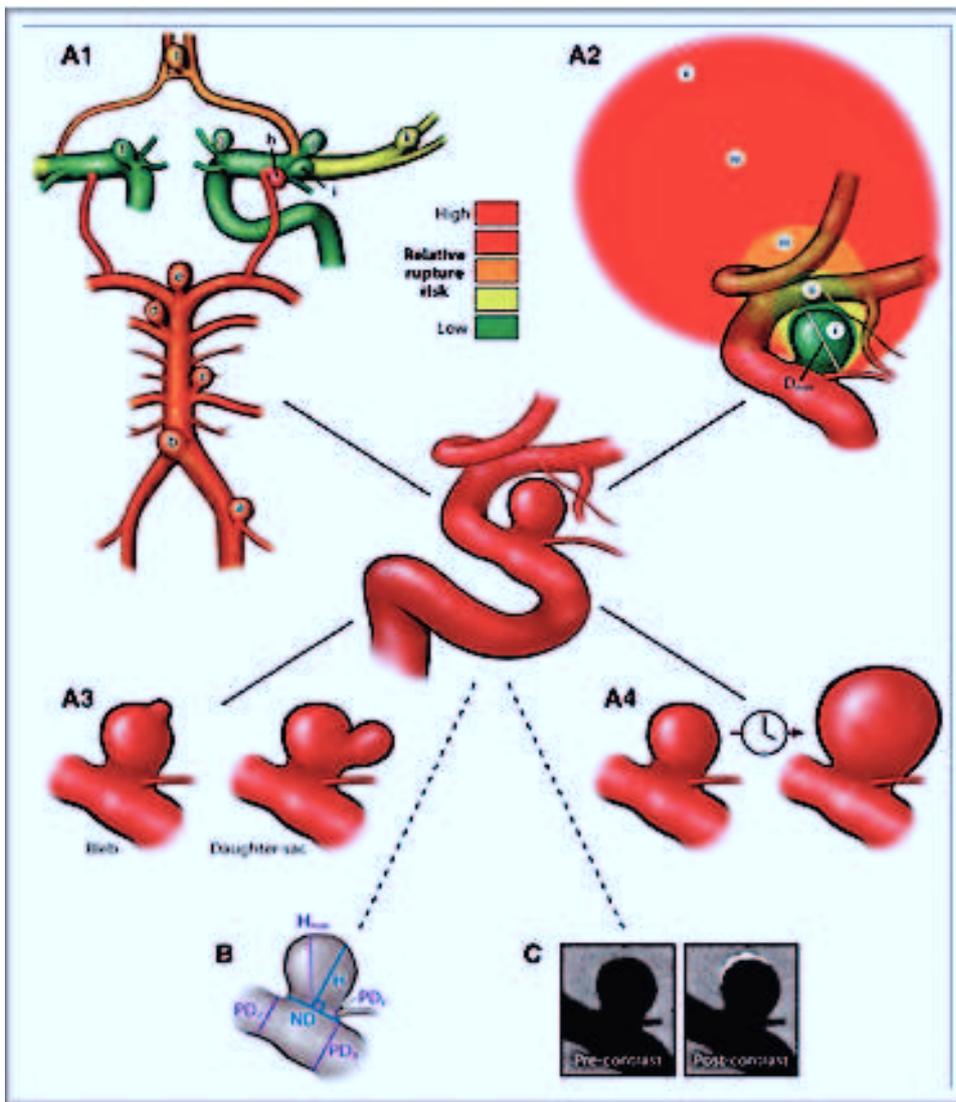


FIG. 3: A1. Sede degli aneurismi intracranici secondo lo studio PHASES e relativo rischio di rottura. Il rischio si modifica in base alla sede (basso per aneurismi del sifone carotideo, alto per aneurismi dell'arteria comunicante posteriore. A2: dimensioni dell'aneurisma. Nello studio PHASES il diametro massimo è un indice significativo di rottura. Le categorie di suddivisione sono >5mm, 5-6.9mm, 7.0-9.9 mm, 10-19.9 mm, >20 mm. A3 Irregolarità della parete aneurismatica. A4: crescita nel tempo. Viene considerata ad alto rischio una crescita >1mm in ogni diametro. B: morfologia. C: Presa di contrasto della parete. La presa di contrasto della parete indica un fenomeno infiammatorio ed una conseguente instabilità<sup>(16)</sup>.

Recentemente è stata pubblicata una meta-analisi, eseguita su 6 studi pubblicati fino al 2017 includendo un totale di 505 aneurismi saccolari (302 stabili e 203 instabili), per esaminare l'associazione tra presa di contrasto della parete ed instabilità dell'aneurisma. Lo studio ha mostrato che gli aneurismi instabili hanno una probabilità statisticamente significativa di mostrare presa di contrasto. La sensibilità della presa di contrasto alla risonanza magnetica è risultata del 95%, la

specificità del 62.7%, il valore predittivo positivo del 55,8% e negativo del 96,2%. L'accuratezza complessiva del test è risultata del 73,4% (Fig.4). Anche escludendo gli aneurismi rotti dallo studio, viene riportata una associazione statisticamente significativa tra presa di contrasto della parete e instabilità dell'aneurisma (crescita o comparsa di sintomi). Questo studio ha quindi confermato che la presa di contrasto della parete alla risonanza magnetica è significativamente più riscontrabile negli aneurismi instabili. L'alta sensibilità (95%) suggerisce che questo esame può essere utile nello screening degli aneurismi instabili. Allo stesso modo il valore predittivo negativo del 96% indica che l'assenza di presa di contrasto è fortemente associata ad aneurismi stabili <sup>(37)</sup>.

Anche gli studi pubblicati successivamente a quelli presi in esame da questo articolo ne confermano i risultati, in particolare lo studio di Lv conferma che la presenza di presa di contrasto della parete era associata alle caratteristiche solitamente correlate alla rottura, come sede e dimensioni, ma era riscontrata più frequentemente negli aneurismi non rotti con alto score PHASES <sup>(29,23)</sup>.

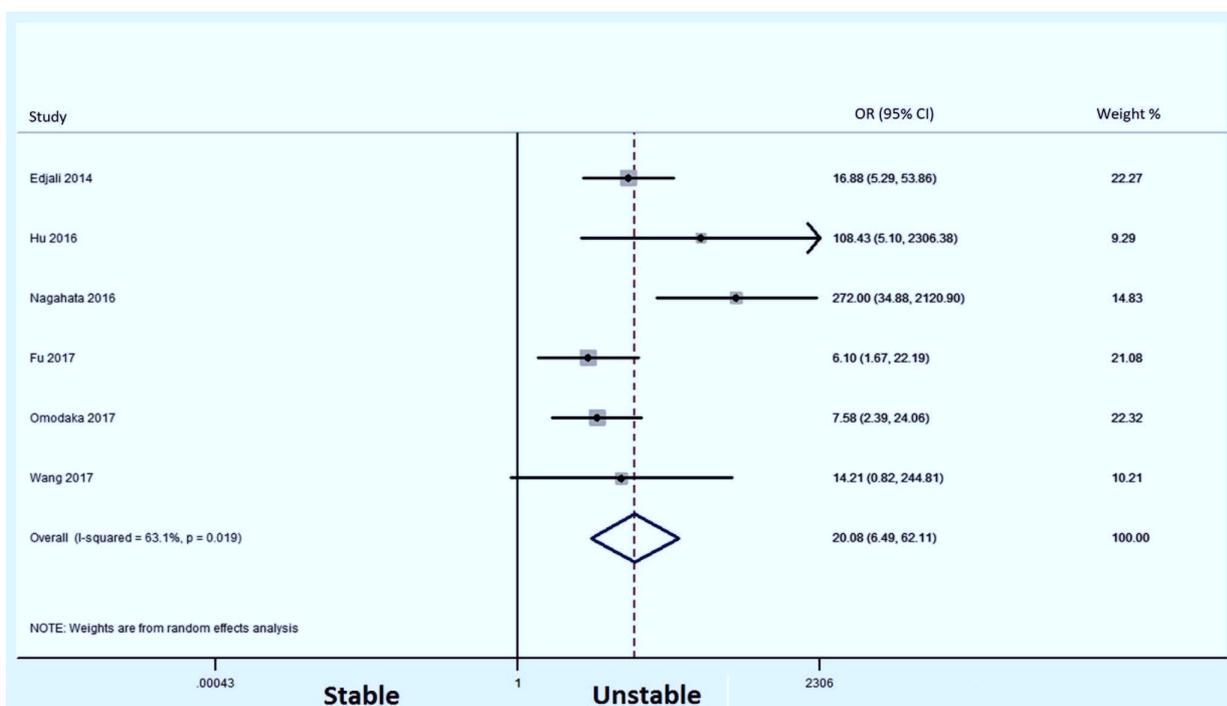


Fig.4: Meta-analisi degli studi pubblicati fino al 2017<sup>(37)</sup>

#### 4. Modificazioni istopatologiche ed emodinamiche delle pareti vasali

Le evidenze istopatologiche da studi umani ed animali supportano l'ipotesi che l'infiammazione giochi un ruolo fondamentale nella formazione, crescita e rottura di un aneurisma.

La presenza di presa di contrasto di parete in una coorte prospettica di pazienti con aneurisma rotto e non rotto (sia sintomatici che asintomatici), studiati mediante protocollo di RMN ad alto campo è stata correlata con noti fattori di rischio di rottura e con studi istologici.

L'interruzione dell'endotelio, l'apoptosi delle cellule muscolari lisce e l'invasione di cellule infiammatorie sono correlate alla rottura dell'aneurisma.

La composizione ultrastrutturale delle arterie cerebrali è, infatti, formata da uno strato di endotelio nello strato più interno del vaso, seguito da uno spesso strato di lamina elastica interna con fibre elastiche che costituisce lo strato più importante della parete vascolare cerebrale per la protezione contro lo stress emodinamico essendo in grado di sopportare una pressione di 600mmHg. Un organizzato network di cellule muscolari lisce formano la tunica media del vaso seguito da una sottile tunica avventizia contenente fibroblasti e leucociti (Fig.5).

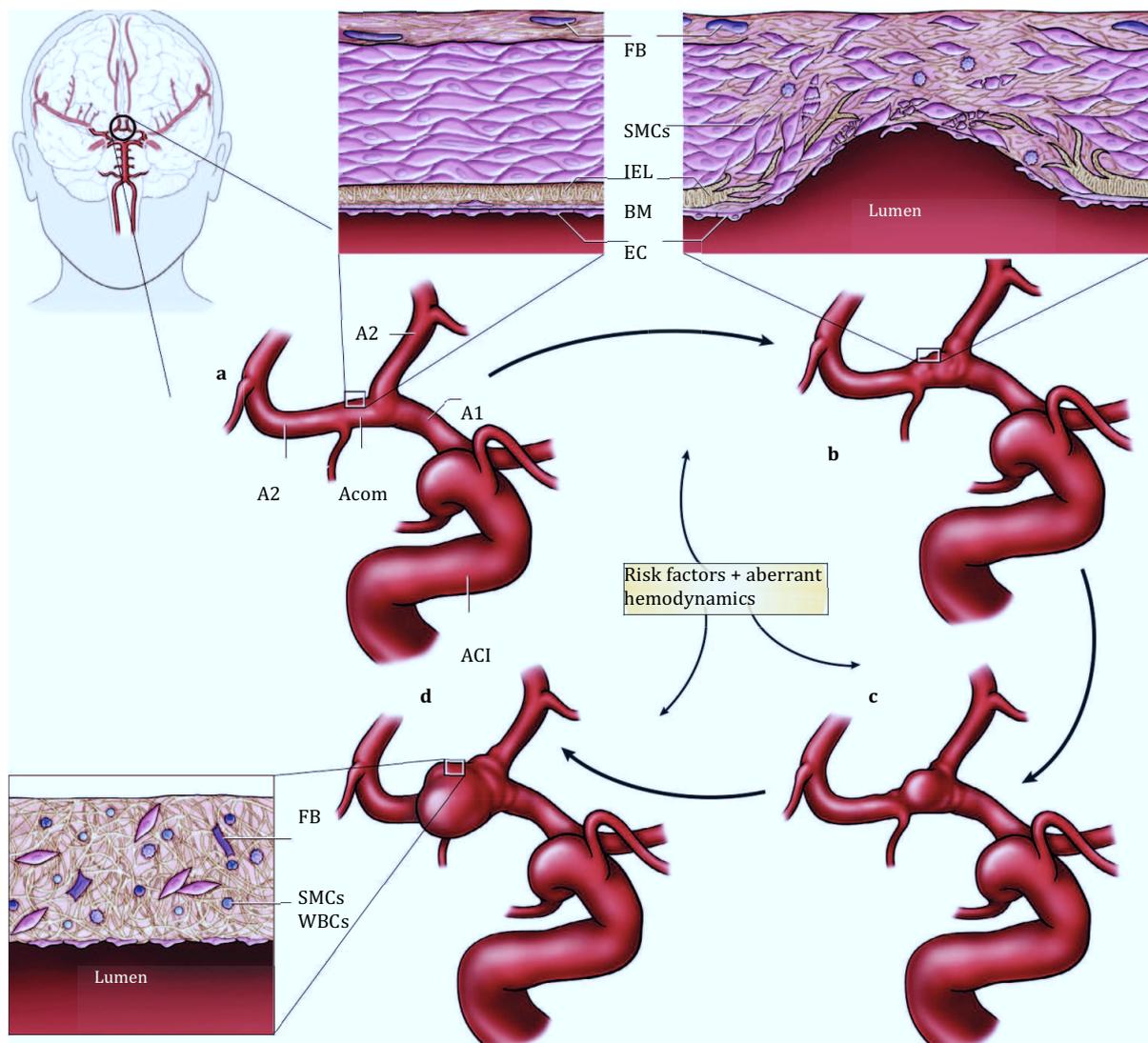


Fig.5: Patogenesi strutturale e molecolare di un aneurisma intracranico dell'arteria comunicante anteriore. La costituzione strutturale del vaso viene modificata a seguito degli insulti endoluminali conseguenti a fattori di rischio ambientali. Ne deriva un flusso alterato, sovraccarico meccanico della parete, interruzione della lamina elastica, apoptosi delle cellule muscolari lisce ed incremento dei macrofagi<sup>(1)</sup>.  
 FB: fibroblasti; SMC: cellule muscolari lisce; WBC: cellule infiammatorie; IEL: lamina elastica interna; EC: cellule endoteliali; BM: membrana basale

L'interazione tra fattori di rischio di sviluppo di aneurisma cerebrale come ipertensione arteriosa e fumo di sigaretta e le variazioni anatomiche, strutturali e la fisiologica degenerazione delle pareti vascolari possono comportare una alterazione della circolazione ematica. In conseguenza di ciò si assiste alla degenerazione della membrana elastica interna a livello della biforcazione arteriosa che costituisce una caratteristica istopatologica degli aneurismi. Questo

porta ad un flusso ematico anomalo con sovraccarico meccanico sulla parete degenerata che va incontro a modificazioni come l'apoptosi delle cellule muscolari lisce, la disfunzione delle cellule endoteliali e l'invasione di macrofagi. Il fenomeno degenerativo viene inoltre accentuato dalle risposte infiammatorie cellulari tramite attivazione di TNF, IL-1 $\beta$ , e matrice metalloproteinasi (MMPs) che promuovono l'influsso di macrofagi e la progressiva degradazione di fibre collagene ed elastiche<sup>(1)</sup>. Il flusso arterioso anomalo e l'incremento dello stress di parete portano alla formazione della sacca aneurismatica che prosegue la sua crescita finché si susseguono fenomeni di riparazione della parete vasale e degradazione della matrice extracellulare. Con il passare del tempo gli aneurismi vanno incontro a episodi disordinati o di crescita o di stabilità strutturale. Durante le fasi di crescita gli aneurismi sono più inclini alla rottura. Le cellule muscolari lisce tendono a migrare e proliferano formando un'iperplasia miointimale che rappresenta una risposta allo stress emodinamico. La parete degli aneurismi non rotti è, infatti, costituita da uno strato endoteliale intatto e da uno strato di cellule muscolari lisce intatte con macrofagi ed altre cellule infiammatorie.

Al contrario la parete degli aneurismi rotti presenta un endotelio interrotto con poche cellule muscolari lisce e diffusa invasione di macrofagi e leucociti (cellule T e neutrofili) (Fig.6).

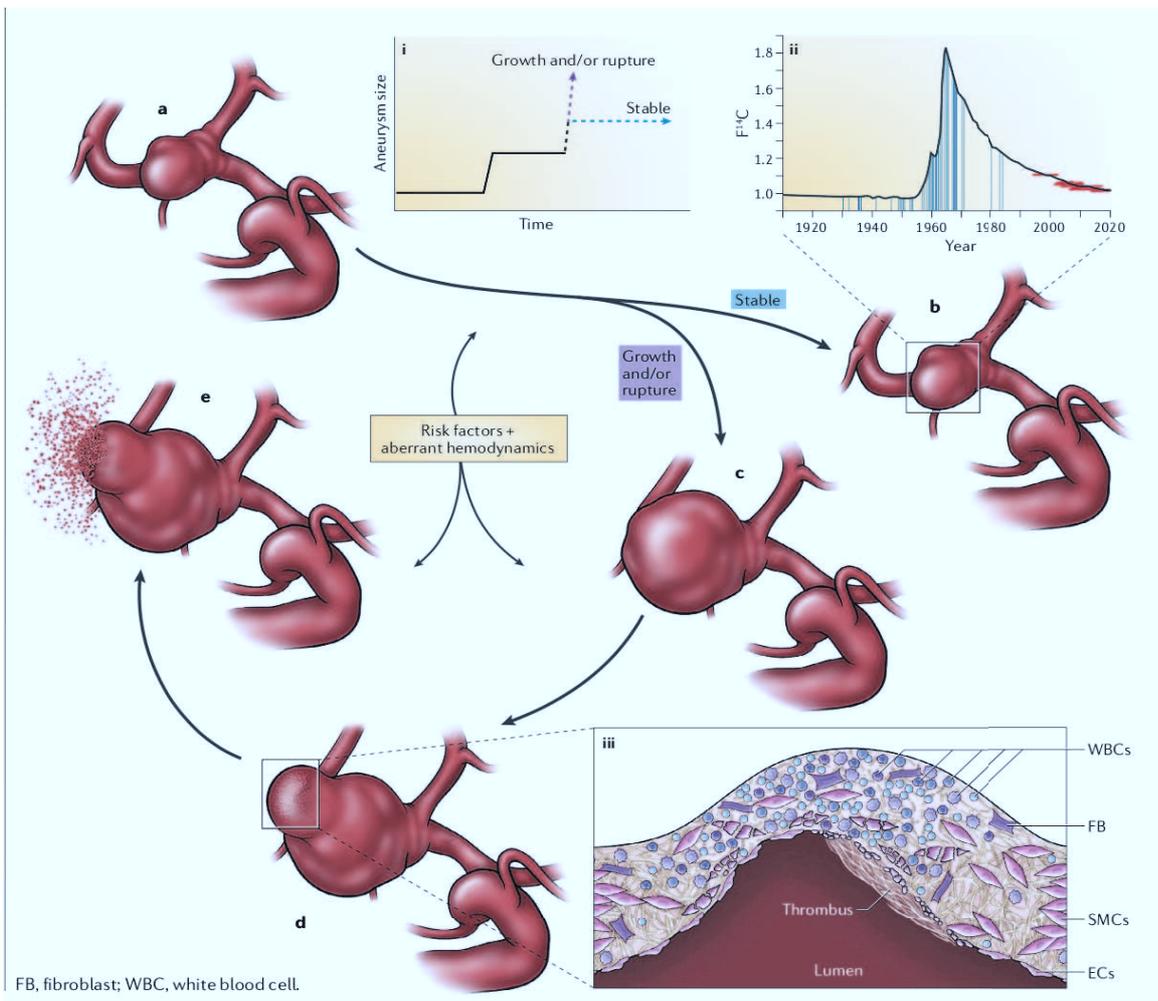


Fig 6: Progressione e rottura di un aneurisma intracranico: a seguito dell'interazione tra fattori di rischio per crescita di aneurisma, come fumo, ipertensione arteriosa e infiammazione di parete, e flusso emodinamico aberrante, a livello molecolare si verificano importanti modificazioni. Si assiste, infatti, ad una disfunzione o apoptosi delle cellule endoteliali e muscolari lisce con successiva risposta infiammatoria nella parete vasale con infiltrazione di leucociti e conseguente progressiva rottura <sup>(1)</sup>.

Anche i mastociti hanno un ruolo fondamentale nel rimodellamento e degenerazione della parete aneurismatica. I mastociti sono cellule con molti granuli citoplasmatici e partecipano attivamente in alcuni processi infiammatori mediante la degradazione dei granuli. La degradazione dei granuli dei mastociti è un fattore essenziale nell'induzione dell'infiammazione in diversi fenomeni infiammatori. I granuli dei mastociti contengono diverse citochine e fattori mediatori dell'infiammazione come ad esempio  $TNF-\alpha$ , diverse interleuchine (IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-13) e fattori di crescita (TGF- $\beta$ ). A seguito della degranolazione dei mastociti in risposta a stimoli esterni, una notevole quantità di

citochine vengono rilasciate nello spazio extracellulare e innescano la cascata dell'infiammazione. Il fattore di crescita dell'endotelio vascolare ed il fattore di crescita dei fibroblasti sono espressi negli aneurismi saccolari intracranici e la loro espressione è associata a rimodellamento e rottura della parete. I mastociti, inoltre, attivano la matrice metalloproteinasi che degrada i vari componenti della matrice extracellulare contribuendo alla perdita della tensione di parete dei vasi. Questi dati sono confermati dal fatto che, in modelli murini, inibendo farmacologicamente la degranolazione dei mastociti si riducono le dimensioni dell'aneurisma e si previene l'assottigliamento della parete dell'aneurisma. Anche la neovascolarizzazione è stato visto essere associata al rimodellamento ed in particolare alla degenerazione degli aneurismi. I vasi neoformati nella parete degli aneurismi sono fragili e soggetti a piccole rotture e inoltre le proteasi rilasciate dai mastociti e da altri leucociti possono favorirne l'ulteriore rottura con conseguente microemorragia. Gli eritrociti stravasati vengono fagocitati dai macrofagi tissutali, altri si lisano con fuoriuscita di emoglobina che, una volta complessata con l'aptoglobina, viene fagocitata dai macrofagi CD 163+. In ogni caso i macrofagi convertono l'emoglobina ingerita in emosiderina. Il ferro non fagocitato e quello rilasciato dai macrofagi forma depositi extracellulari che stimolano l'infiammazione locale e lo stress ossidativo. L'evidenza di una marcata deposizione di ferro nella parete degli aneurismi associata alla presenza di macrofagi CD 163+ e CD 68+ indica un ruolo dei macrofagi nella clearance del ferro nella parete aneurismatica. Questo accumulo di ferro si verifica in particolare nelle aree con neovascolarizzazione e mastociti che sono quindi implicati nella rottura dei neovasi con conseguenti microemorragie. Il ferro ha quindi un ruolo nel rimodellamento della parete degli aneurismi intracranici verosimilmente potenziando l'infiammazione e rendendo la parete più fragile.

I mastociti sono stati rilevati in prossimità d'infiltrati di altre cellule infiammatorie con alto numero di macrofagi CD-68+ e linfociti T CD-3+ e pertanto potrebbero regolare, assieme ad altre cellule, le reazioni infiammatorie nella parete degli aneurismi. Infatti i mastociti, rilasciando proteasi triptasi e chimasi, degradano le matrici pericellulari e possono intervenire nel processo di apoptosi delle cellule muscolari lisce e nell'interruzione della continuità delle cellule endoteliali <sup>(18)</sup>.

Questi fenomeni infiammatori sono già presenti immediatamente dopo la rottura e non aumentano con il passare del tempo tra la rottura e l'escissione chirurgica suggerendo che tali fenomeni infiammatori siano già presenti nelle pareti aneurismatiche prima che la rottura avvenga e che non siano il risultato della rottura.

Sono state dimostrate differenze istopatologiche tra aneurismi propensi alla rottura. Gli aneurismi con strati ordinati di cellule muscolari lisce ed endotelio intatto hanno meno probabilità di rottura a differenza degli aneurismi con parete costituita da strati disordinati di cellule muscolari lisce in cui la probabilità di rottura è leggermente più elevata<sup>(36)</sup>. Gli aneurismi con parete con ridotta componente muscolare liscia e iperplasia miointimale o formazione di trombi organizzati hanno una inclinazione alla rottura maggiore di quelli con cellule muscolari lisce (Fig.7).

La presenza di presa di contrasto di parete in una coorte prospettica di pazienti con aneurisma rotto e non rotto (sia sintomatici che asintomatici), studiati mediante protocollo di RMN ad alto campo è stata correlata con noti fattori di rischio di rottura e con studi istologici.

Gli aneurismi non rotti presentano istologicamente uno strato di endotelio e di cellule muscolari lisce intatto, con pochi macrofagi e cellule infiammatorie nella parete dell'aneurisma. Al contrario, gli aneurismi rotti presentano uno strato

endoteliale interrotto con poche cellule muscolari lisce ed una diffusa invasione di macrofagi e leucociti (Linfociti T e neutrofili) nella parete aneurismatica.

Diversi studi istologici hanno descritto il rimodellamento ed i processi infiammatori che si verificano durante l'evoluzione di un aneurisma sacculare, compresa l'invasione di macrofagi ed altre cellule infiammatorie nella parete dell'aneurisma. L'infiltrazione dei mastociti si associa a fenomeni di neovascolarizzazione e degenerazione della parete.

Gounis et al, in uno studio del 2014, avevano mostrato come la Mieloperossidasi (MPO), enzima secreto dai granulociti neutrofili, fosse abbondante nella parete di aneurismi con alto rischio di rottura a 5 anni. Per tale motivo la MPO può essere utilizzato come biomarker di instabilità<sup>(45)</sup>. L'infiltrazione di neutrofili con MPO è associata alla formazione e presenza di *vasa vasorum* che ne facilitano l'ingresso nella parete. Le pareti arteriose dei giovani, infatti, non presentano *vasa vasorum*. Essi si sviluppano con l'età, in particolare nei segmenti prossimali intracranici delle arterie carotide interna, vertebrale e basilare come fenomeno degenerativo. La presa di contrasto della parete avrebbe due meccanismi differenti poiché nella popolazione giovane potrebbe verificarsi per un danno endoteliale con infiammazione acuta, nei soggetti anziani invece, in alcuni tipi di aneurismi e in alcune fasi della formazione delle placche aterosclerotiche, mediante i *vasa vasorum*. Una recente pubblicazione di Larsen et al, ha mostrato, su un campione di 13 aneurismi, la presenza di Mieloperossidasi solo negli aneurismi con captazione di contrasto nella parete, ma non in tutti (4/5). Nel campione MPO negativo ma con presa di contrasto, erano presenti *vasa vasorum*. L'invasione di cellule infiammatorie nella parete è associata ad una alta densità di neovasi ma non necessariamente ciò si verifica in ogni aneurisma. I *vasa vasorum* sono più frequentemente riscontrati negli aneurismi di diametro superiore ai 4 mm e si pensa si formino non solo per un'infiammazione cronica murale ma anche per il

rimodellamento vascolare<sup>(30)</sup>. Queste modificazioni infiammatorie sono già presenti immediatamente dopo la rottura e non aumentano nell'intervallo tra rottura dell'aneurisma e trattamento chirurgico, suggerendo che l'infiammazione della parete sia presente prima della rottura e non ne sia invece conseguenza.

Ad oggi, solo pochi studi in letteratura dimostrano l'invasione della parete aneurismatica da parte di linfociti e macrofagi alla Risonanza Magnetica di parete<sup>(23,30)</sup>. Non vi sono pubblicati studi di coorte in letteratura che dimostrino le basi istopatologiche dell'enhancement di parete confermando così che la presa di contrasto negli aneurismi rotti è conseguente all'alterazione istologica della parete ed al successivo reale rischio di rottura.

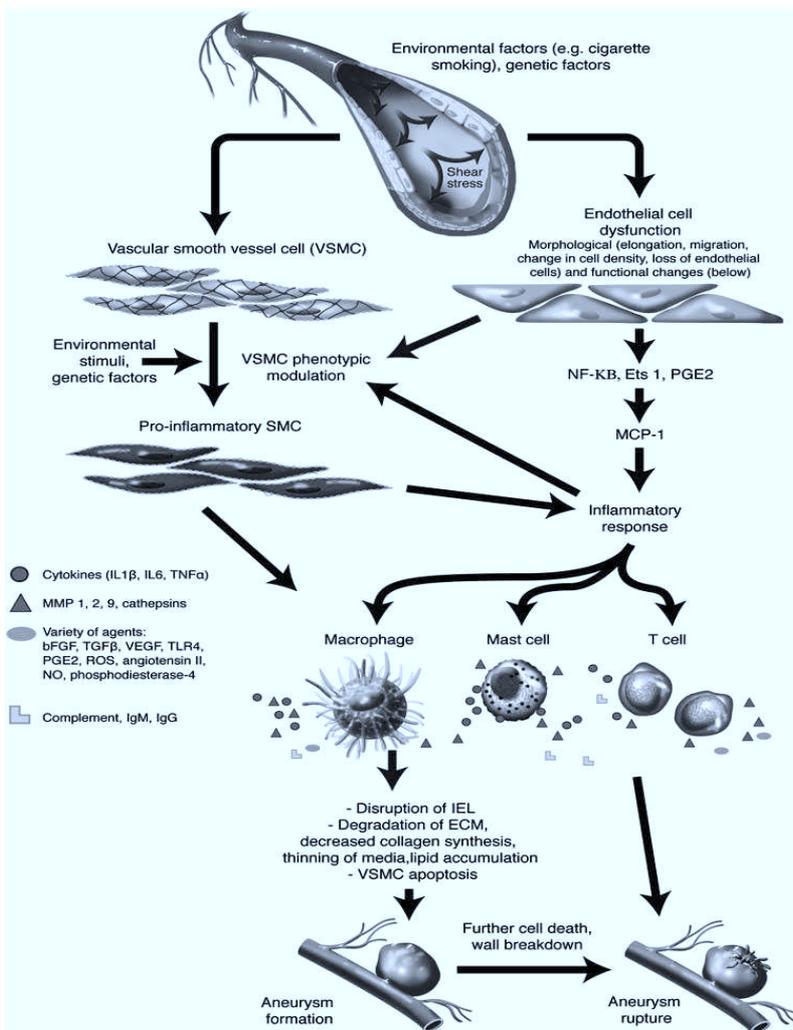


Fig.7: Reazione infiammatoria associata alla formazione di aneurisma intracranico. La formazione dell'aneurisma si instaura a partire da fattori genetici e ambientali che stressano la parete endoteliale con conseguente risposta infiammatoria e modificazioni fenotipiche delle cellule muscolari lisce. Nelle pareti dei vasi si assiste quindi all'interruzione dello strato endoteliale, rimodellamento della matrice extracellulare e formazione graduale dell'aneurisma<sup>(36)</sup>

## 5. Il ruolo delle cellule muscolari lisce nella formazione e rottura degli aneurismi sacculari intracranici

Molte delle attuali conoscenze sui processi cellulari e molecolari che portano alla formazione degli aneurismi derivano dagli studi sperimentali su modelli animali introdotti da Hashimoto et al (19-20).

L'evento principale nella formazione dell'aneurisma è l'interruzione delle lamine elastiche della parete vasale che sono fondamentali nel mantenere l'elasticità della parete. La perdita della lamina elastica determina l'esposizione delle fibre collagene ad un maggiore carico meccanico con conseguente incremento del danno degenerativo e necessità di riparazione e sostituzione delle fibre collagene.

Le cellule muscolari lisce sono capaci di sintetizzare collagene ma una condizione di flusso non fisiologico determina una infiltrazione di macrofagi ed apoptosi delle cellule muscolari lisce mediali.

L'apoptosi è in parte indotta o favorita dalle cellule infiammatorie che inoltre riducono la sintesi di collagene nelle pareti arteriose cerebrali.

Inoltre i macrofagi producono metalloproteinasi (MMP-9 e MMP-2) che degrada il collagene esistente con conseguente interruzione dei componenti della matrice.

Le cellule muscolari lisce giocano un ruolo importante anche nel richiamo dei macrofagi in quanto la proteina-1 chemotattica per i monociti (MCP-1), che media l'infiltrazione dei macrofagi nella parete dell'aneurisma, è indotta nelle cellule muscolari lisce dall'attivazione del fattore di trascrizione (Ets-1).

In sostanza, condizioni di flusso non fisiologiche inducono alterazioni nell'interazione tra endotelio e cellule muscolari lisce che a loro volta determinano infiltrazione di macrofagi nella parete dell'arteria.

Il processo di formazione dell'aneurisma sembra comunque differente da quello che ne determina la rottura.

Lo studio istologico della parete dell'aneurisma non rotto mostra infatti iperplasia miointimale o neointimale dovuta ad un danno da stress a carico delle cellule muscolari lisce o dell'endotelio.

In queste lesioni iperplastiche le cellule muscolari lisce sembrano essere differenti da quelle dello strato medio e vengono considerate di fenotipo sintetico in contrasto con il fenotipo contrattile dello strato medio (Fig.8).

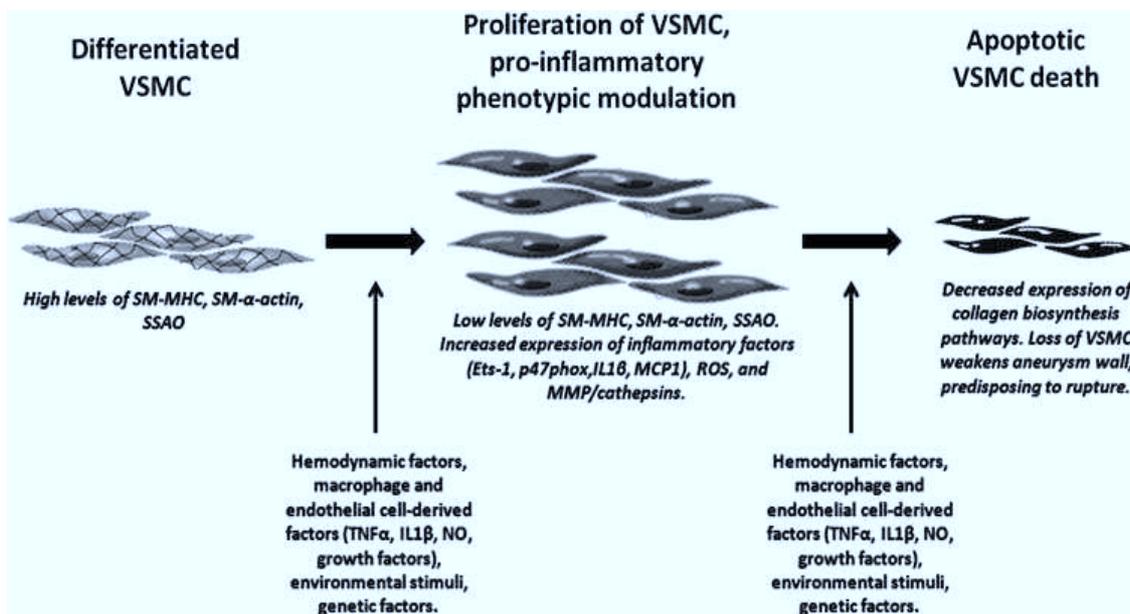


Fig.8: Modificazione fenotipica delle cellule muscolari lisce delle pareti vascolari da un fenotipo contrattile ad un fenotipo pro-infiammatorio che determina iperplasia miointimale, infiammazione e degenerazione della parete vasale. La successiva apoptosi delle cellule muscolari lisce comporta un assottigliamento della parete ed un incremento della suscettibilità alla rottura <sup>(36)</sup>.

Il fenotipo sintetico, infatti, produce MMPs che degrada i componenti della matrice ma le cellule muscolari lisce intimali proliferano a loro volta e sintetizzano collagene e altri componenti della matrice che rafforzano la parete vasale.

Studi istopatologici che confrontano la parete degli aneurismi rotti e non rotti dimostrano che la perdita delle cellule muscolari lisce murali, la degenerazione della matrice extracellulare e l'infiltrazione di cellule infiammatorie, associate all'attivazione del sistema immunitario umorale sono caratteristiche della parete

degli aneurismi rotti, mentre i non rotti mostrano iperplasia dell'intima. Queste osservazioni suggeriscono che la perdita delle cellule muscolari lisce e la conseguente iperplasia intimale sono direttamente correlate alla degenerazione ed eventuale rottura della parete dell'aneurisma che perde la capacità di riparare il danno allo stress meccanico e proteolitico <sup>(21)</sup>.

In sintesi, il processo infiammatorio cronico sembra avere diverse conseguenze nella parete degli aneurismi, favorendone da un lato la degenerazione e dall'altro i fenomeni riparativi. Resta da capire se, negli aneurismi non rotti, il fenomeno raggiunga uno stato di equilibrio che permette di stabilizzarlo nel tempo oppure se il processo degenerativo si rallenti ma prosegua costantemente.

Dati rilevati da studi sperimentali su umani ed animali hanno mostrato come un aneurisma intracerebrale si formi e si accresca in risposta ad un processo infiammatorio innescato da fenomeni biomeccanici e contesti pro-infiammatori<sup>(53,54,55)</sup>. Il rilascio di fattori di crescita da parte delle cellule infiammatorie innesca una proliferazione delle cellule muscolari lisce che però assumono un fenotipo sintetico di tipo non contrattile. Tuttavia, il contesto citotossico dovuto alla presenza di cellule infiammatorie, all'incremento della matrice ed allo scarso apporto di ossigeno ricevuto a causa dell'ispessimento della parete, determina la morte delle cellule muscolari lisce della parete<sup>(35,56)</sup>.

Le cellule endoteliali danneggiate, inoltre, rilasciano mediatori infiammatori che attivano la cascata coagulativa antifibrinolitica. Le strutture protrombotiche subendoteliali vengono in contatto con le piastrine promuovendo la formazione del trombo. Sia gli eritrociti che le piastrine vengono quindi intrappolati nella componente fibrinosa del trombo e, sia per chemiotassi che per l'espressione di molecole di adesione cellulare, si verifica l'infiltrazione di neutrofili e macrofagi nella zona danneggiata. La lisi degli eritrociti porta al rilascio dei componenti

intracellulari che inducono lo stress ossidativo e attivano il complemento che produce anafilotossine che sono chemotattiche per le cellule infiammatorie(Fig.9). L'effetto finale di questi fenomeni è la morte cellulare e la riduzione del turnover della matrice con progressiva degenerazione della parete aneurismatica, perdita di elasticità ed, infine, rottura<sup>(52)</sup>.

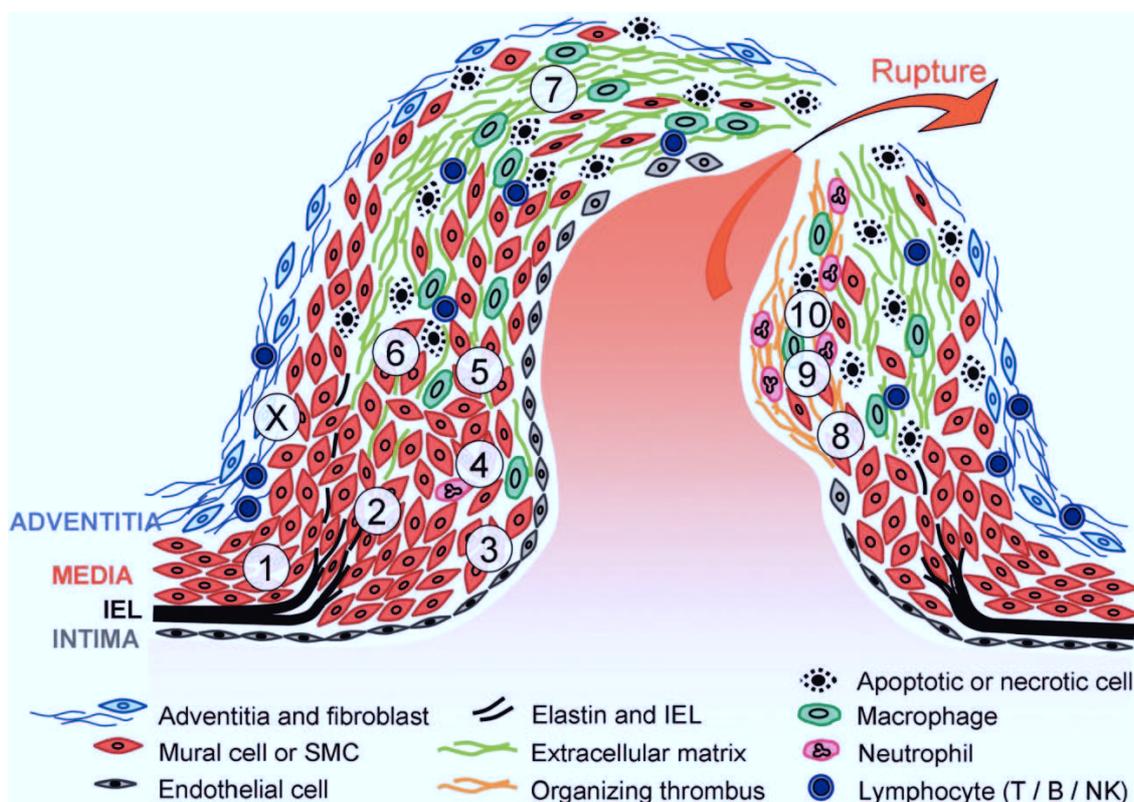


Fig.9 L'aneurisma comincia, ipoteticamente, a formarsi nel punto di interruzione endoteliale (1) con conseguente iperplasia miointimale (2). Le progressive modificazioni della parete portano ad una disfunzione endoteliale e richiamo chemotattico di cellule infiammatorie (3-4). Allo stesso tempo si assiste ad un incremento della sintesi della matrice per supportare la funzione elastica mediata dai macrofagi che ne rilasciano fattori di crescita (5). Questo contesto infiammatorio determina però la morte delle cellule muscolari lisce della parete(6). Il turnover della matrice si riduce per ridotta produzione e aumento della lisi da parte delle metalloproteinasi (7). A seguito dei fenomeni di stress e degenerazione l'endotelio subisce alterazioni strutturali che portano alla formazione di trombi (8) che a loro volta richiamano neutrofili (9) potenti produttori di enzimi proteolitici. Tutti questi fattori determinano progressivo assottigliamento della parete fino alla rottura<sup>(52)</sup>

## 6. Tecniche Neuroradiologiche

Le tecniche convenzionali per la visualizzazione delle arterie intracraniche sono l'Angio-TC cerebrale, l'Angio-RMN encefalo e l'Angiografia di sottrazione digitale. Queste tecniche rivelano anomalie del lume del vaso, ma possono non mostrare completamente patologie proprie della parete vascolare.

Per tale motivo, nel corso degli ultimi anni, c'è stato un crescente interesse nella visualizzazione diretta della parete del vaso mediante uno studio di Risonanza Magnetica ad ampio campo della parete vasale (VW-MR imaging).

Con la maggiore disponibilità e diffusione di alcune sequenze, è possibile ottenere uno studio di parete vasale di sufficiente qualità per un uso clinico semplicemente modificando parametri di sequenze esistenti.

Le principali caratteristiche per lo studio di RMN della parete vasale sono l'alta risoluzione spaziale (alto campo - 3 Tesla), l'acquisizione multiplanare 2D o 3D, sequenze a pesatura multipla, soppressione RMN di sangue e liquor.

Lo spessore fisiologico di parete dell'arteria cerebrale media ed arteria basilare è 0.2-0.3 mm, che corrisponde all'incirca ad un decimo del diametro del lume vascolare ed è più piccolo delle dimensioni del voxel di RMN attualmente disponibile. Tuttavia è possibile ottenere immagini della parete del vaso perché essa genera un segnale rilevabile in RMN sopprimendo il segnale del sangue all'interno e del liquor circostante nel medesimo voxel. Oltre a ciò, spesso un danno nella parete del vaso determina un ispessimento della parete stessa ed un conseguente aumento della sua consistenza <sup>(22)</sup>.

Per lo studio della parete l'alto campo ad almeno 3T è preferibile per la risoluzione spaziale submillimetrica e per i risultati attesi. Molte tecniche esistono ad oggi per fornire una ottima risoluzione spaziale ed una precisa delimitazione della parete dei vasi circondati dai flussi ematico e liquorale e sono sia 2D che 3D.

Le tecniche 2D sono molto diffuse e in genere un'immagine 2D in un piano perpendicolare al piano del lume è la più importante perché permette una dettagliata valutazione del danno del lume e della morfologia della lesione, una stima della sottigliezza della parete e riduce gli artefatti da volume.

I vantaggi delle tecniche 3D sono legati alla maggiore ampiezza di campo con conseguente aumento della copertura cerebrale e la capacità di ottenere acquisizioni isotropiche. La tecnica 3D più utilizzata è la *variable refocusing flap angle* (VRFA) eseguita con sequenze T1-T2 e Proton density dopo somministrazione di mezzo di contrasto.

Esistono poi alcune tecniche di soppressione del segnale ematico e liquorale utilizzate per migliorare la visualizzazione della parete vasale<sup>(23)</sup>. Le tecniche di soppressione liquorale più utilizzate sono la DANTE (Delayed alternating with nutation for tailored excitation) e l'antidrive. Quelle di soppressione ematica sono la DANTE, MSDE (motion-sensitive driven equilibrium), DIR (double inversion recovery), QIR (quadruple inversion recovery). Mentre alcune di queste tecniche di soppressione (MSDE, DANTE, antidrive) sono utilizzate con studio 3D HR-VWI, altre possono essere utilizzate solo con tecniche 2D (DIR, QIR). Dopo acquisizione di sequenze 3D, le pareti aneurismatiche vengono visualizzate in sequenza T1-pesata 3D black-blood capace di sopprimere il flusso ematico prima e dopo iniezione di mezzo di contrasto<sup>(27)</sup>.

Diversi spettri di captazione del mezzo di contrasto in parete alla RMN sono stati riscontrati in base alla differente tipologia di aneurisma<sup>(23)</sup>

Negli aneurismi saccolari, l'assenza di presa di contrasto sembra essere un forte indicatore di un aneurisma asintomatico quando associato a regolare morfologia.

Quasi tutti gli aneurismi rotti, al contrario presentano presa di contrasto circonferenziale oppure focale nel punto di rottura<sup>(23)</sup>.

Studi recenti suggeriscono che aneurismi con presa di contrasto nella parete sono spesso instabili e che richiederebbero un trattamento precoce rispetto a quelli senza presa di contrasto che appaiono stabili e possono essere trattati tardivamente o seguiti nel tempo<sup>(26, 46)</sup>

Anche dopo coiling è presente presa di contrasto, in particolare subito dopo la procedura, verosimilmente a causa della risposta infiammatoria al trattamento<sup>(47)</sup>.

Altre forme di aneurisma, considerate forme a sè stanti, come l'aneurisma parzialmente trombizzato o l'aneurisma fusiforme o quello disseccante presentano spettri di captazione del mezzo di contrasto differenti (Fig.10).

**TABLE 1. Summary of typical vessel wall imaging findings and the clinical significance by aneurysm type**

Aneurysm Type	Key Aneurysm Wall Imaging Findings
Saccular	Lack of enhancement on HR-VWI appears to be a strong indicator of an asymptomatic aneurysm w/ stable morphology. Limited data suggest that most symptomatic or morphologically changing aneurysms demonstrate circumferential wall enhancement. Nearly all ruptured aneurysms demonstrate circumferential enhancement or focal enhancement on HR-VWI at the rupture site.
Multiple aneurysms in the setting of SAH	Several cases reported indicating the enhancement on HR-VWI usually identifies the culprit aneurysm.
Aneurysm after endovascular treatment	Frequent enhancement that can temporarily increase after treatment and can persist for years. Enhancement can persist w/ or w/o a remnant. Enhancement is typically smooth & circumferential, but can be nodular. Most studies employ conventional-resolution MRI rather than HR-VWI.
Partially thrombosed	An onion-skin pattern w/ peripheral T1 hyperintensity is common w/in the thrombosed portion. Absent wall enhancement on conventional-resolution MRI is associated w/ decreased growth rates. Decreased enhancement after treatment on conventional-resolution MRI is associated w/ aneurysm shrinkage. The intramural thrombosed component is well delineated from the lumen on HR-VWI.
Chronic fusiform	Enhancement is frequent on conventional-resolution MRI & is associated w/ aneurysm growth. Intramural thrombus & peripheral T1 hyperintensity consistent w/ repeated intramural hemorrhage is associated w/ aneurysm growth. Current literature has employed conventional-resolution MRI.
Acute dissecting	Degree of aneurysmal dilatation, intramural hematoma, & wall enhancement decrease w/ time w/ HR-VWI. Some aneurysmal dilatation & wall enhancement can persist in the chronic phase.
Blood blister	A focal hematoma may be identified on the outer surface in the setting of rupture on HR-VWI. Enhancement is variable but can be present in actively enlarging aneurysms based on scant data.
Oncotic	Variable appearance of thrombosed components and variable enhancement on HR-VWI, the significance of enhancement needs further study. HR-VWI delineates the lumen and thrombosed components in both treated & untreated aneurysms.
Mycotic	Circumferential enhancement on conventional-resolution MRI is reported in several patients w/ different underlying infectious etiologies; the significance of enhancement & patterns of enhancement on HR-VWI need further study.

Fig.10 Differenti tipi di captazione di mezzo di contrasto nella parete a seconda del tipo di aneurisma

## 7. Trattamento neurochirurgico ed endovascolare:

In pazienti con aneurisma non rotto si può decidere di seguire il paziente nel tempo oppure di escludere l'aneurisma dal circolo mediante clipping chirurgico o trattamento neuroradiologico endovascolare.

La scelta ovviamente dipende dalla presenza di sintomi o dal riscontro incidentale, dal rischio di rottura dell'aneurisma e dalla mortalità e morbilità del trattamento proposto, considerando che i pazienti con aneurisma non rotto non sempre sono asintomatici.

Le meta-analisi più recenti, come quella pubblicata da Kotowski utilizzando dati riferiti a 9845 pazienti da 60 studi pubblicati tra il 1990 ed il 2011, mostrano, dopo trattamento chirurgico, un tasso globale di mortalità del 1,7% e di morbilità (modified Rankin Scale score >2 e Glasgow Outcome Scale score <4) del 5% a 1 anno di distanza.

I valori dei vari studi sono però molto contrastanti in particolare per quanto concerne la morbilità.

Lo studio ISAT (International Subarachnoid Aneurysm Trial) pubblicato su Lancet nel 2005 è uno studio randomizzato su 2143 pazienti con aneurisma rotto ed assegnati al trattamento neurochirurgico o endovascolare<sup>(49)</sup>. I risultati hanno mostrato un tasso di mortalità o disabilità a 1 anno dal trattamento del 23,7% nei pazienti trattati per via endovascolare contro il 30,6% di quelli sottoposti a clipping chirurgico.

Il rischio di risanguinamento era però superiore nei pazienti sottoposti a trattamento endovascolare. Il trial ISAT presenta alcune criticità tra cui la prematura analisi dei dati ed il follow-up non a lungo termine; tuttavia, studi pubblicati successivamente hanno confermato, seppur con percentuali differenti,

che la mortalità e morbidità sono maggiori nei pazienti sottoposti a trattamento chirurgico.

Il tasso di risanguinamento periprocedurale non mostrava significative differenze mentre il risanguinamento entro un mese dalla procedura era superiore nei pazienti sottoposti ad embolizzazione con conseguente alto tasso di mortalità ad un mese per il contemporaneo utilizzo di agenti anticoagulanti dopo la procedura.

In linea generale si può affermare che diversi fattori dovrebbero essere considerati nella selezione del management ottimale di un aneurisma non rotto, comprese la dimensione, la sede, le caratteristiche morfologiche e l'eventuale crescita dell'aneurisma, l'età del paziente, la familiarità, una pregressa emorragia subaracnoidea o patologie cerebrovascolari pregresse o concomitanti. I pazienti, ad ogni modo, vanno bene informati su rischi e benefici di entrambi i trattamenti per prevenire la rottura dell'aneurisma e ottenerne l'esclusione dal circolo.

I dati di studi prospettici e retrospettivi di multipli centri internazionali confermano che la chiusura chirurgica mediante clipping del colletto dell'aneurisma offre una maggiore protezione dal rischio di ricanalizzazione ma il trattamento endovascolare mantiene un tasso minore di mortalità, morbidità e minori giorni di degenza<sup>(50,51)</sup>. In particolare, il trattamento endovascolare è da preferire in aneurismi non rotti in sedi gravate da un alto rischio di morbidità chirurgica, come l'apice della basilare o il sifone carotideo, o nei pazienti anziani.

Considerando che il rischio di trattamento è correlato all'età, alle comorbidità ed alla sede e dimensione dell'aneurisma, in pazienti >65 anni ed in quelli con comorbidità e piccoli aneurismi non rotti e con localizzazione e morfologia a basso rischio di rottura, l'osservazione può essere una valida alternativa al trattamento, allo stato delle evidenze attuali.

# Stato dell'Arte

Gli studi più noti in letteratura attribuiscono un aumentato rischio di rottura alla presenza di uno o più fattori di rischio modificabili o meno (PHASES) o a dimensioni e sede dell'aneurisma (ISUIA) <sup>(24)</sup>.

Le recenti pubblicazioni suggeriscono, inoltre, che anche la presa di contrasto della parete possa identificare uno stato d'instabilità di un aneurisma intracranico sacculare e pertanto prevederne una possibile precoce rottura. Le tecniche di imaging RMN della parete vasale (IVW-MRI) sono in continua evoluzione e i dati presenti in letteratura sono basati su piccole serie o su studi retrospettivi. La Risonanza Magnetica della parete vasale è potenzialmente in grado di identificare immagini suggestive di patologia di parete (infiammazione, neoangiogenesi, emorragia intramurale).

Vi sono dati contrastanti in letteratura circa la relazione tra presa di contrasto della parete dell'aneurisma e dimensione dell'aneurisma e solo pochi dati riguardo al significato della presa di contrasto della parete vasale.

Rimane ancora oggetto di studio ma di fondamentale importanza, la capacità della Risonanza Magnetica della parete vasale (IVW-MRI) di predire il rischio di rottura attraverso caratteristiche di imaging come lo spessore di parete o la presa di contrasto.

Uno studio pilota del 2012 su 5 casi con emorragia subaracnoidea mostrava che la presa di contrasto della parete dell'aneurisma era presente in tutti gli aneurismi rotti <sup>(25)</sup>.

Uno studio del 2014 confrontava la presa di contrasto della parete tra 31 aneurismi "instabili" (rotti, sintomatici o con modificazioni morfologiche) e 77 "stabili"

(incidentali, stabili morfologicamente) mediante RM 3T con sequenze 3D T1 pesate pre e post-contrasto. La parete del vaso presentava presa di contrasto nell'87% degli aneurismi instabili e in solo il 29% degli stabili<sup>(46)</sup>.

Un altro studio pubblicato nel 2016 su 117 pazienti consecutivi di cui 61 con emorragia subaracnoidea e riscontro di 61 aneurismi rotti e 83 non rotti e 56 pazienti senza emorragia subaracnoidea, usando un protocollo con e senza mezzo di contrasto in risonanza magnetica, ha mostrato presa di contrasto debole o intensa nel 73.8% degli aneurismi rotti e solo nel 4.8% dei non rotti <sup>(26)</sup>.

Lo studio pubblicato nel 2016 di Liu et al, condotto su 61 aneurismi non rotti ha mostrato presa di contrasto in 33 aneurismi ed ha evidenziato come l'enhancement sia correlato alle dimensioni dell'aneurisma e come sia correlato a fenomeni infiammatori <sup>(27)</sup>.

In un articolo pubblicato nel 2018 viene riportato un totale di 45,3% di presa di contrasto (151 aneurismi su un campione di 333) con incremento significativo dell'enhancement negli aneurismi instabili (43,3%) e viene evidenziato come lo spessore dell'enhancement (> 1mm) ha la più alta specificità (>85%) ed accuratezza diagnostica nella distinzione tra aneurismi stabili ed instabili <sup>(28)</sup>.

Anche lo studio di Lv, pubblicato nel 2018, mostra una correlazione tra la presa di contrasto della parete ed i fattori di rischio convenzionalmente utilizzati negli altri studi <sup>(29)</sup>.

In particolare si evidenzia come, in accordo con lo studio ISUIA, la dimensione dell'aneurisma è maggiore negli aneurismi con presa di contrasto nella parete e quest'ultima è più frequentemente osservata negli aneurismi delle arterie cerebrali anteriore, comunicante posteriore e del circolo posteriore identificati come ad alto rischio nello studio ISUIA.

In rapporto allo studio PHASES ed al punteggio in esso proposto per valutare il rischio di rottura, lo studio di Lv conferma che all'aumentare del rischio di rottura vi

è un incremento del numero di aneurismi con captazione del contrasto nella parete.

Nonostante non venga calcolata nello score PHASES, anche la irregolarità della parete viene considerata come un fattore predittivo del rischio di rottura con parallelo aumento della percentuale di aneurismi con presa di contrasto.

Un recente studio di Larsen analizza l'imaging di risonanza magnetica e le caratteristiche istologiche in 13 pazienti (5 uomini e 8 donne) di età compresa tra 36 e 73 anni tutti con aneurisma dell'arteria cerebrale media e con diametro massimo compreso tra 4 e 17 mm<sup>(30)</sup>.

Cinque aneurismi mostravano intensa presa di contrasto e di questi 4 erano positivi per la presenza di mieloperossidasi con rilievo di cellule CD-34+ in 3 e di *vasa vasorum* in 2.

Sette aneurismi erano invece privi di enhancement contrastografico ed 1 presentava scarsa impregnazione. Questi aneurismi non presentavano all'esame istologico mieloperossidasi né cellule CD-34 e assenza di *vasa vasorum*.

Questo studio rafforza pertanto l'idea che la presa di contrasto della parete sia legata alla presenza di infiltrazione di cellule infiammatorie, neovascolarizzazione e *vasa vasorum*. Il contrasto non è presente nelle pareti dei vasi che non presentano segni d'infiammazione<sup>(30)</sup>.

In considerazione della nota difficoltà nella stratificazione del rischio di rottura degli aneurismi non rotti, la RM di parete vasale può essere utile per identificare una sottostante infiammazione di parete che può essere il fattore scatenante nella patogenesi della crescita dell'aneurisma e della potenziale rottura.

Uno schema riassuntivo della letteratura sull'argomento è mostrato nella tabella allegata(Fig.11).

Study	Journal	Year	N	Type of patients	MRI	Sequences	Results	Notes
Matouk	Neurosurgery	2013	5 (Multiples)	ruptured and unruptured	3T Siemens	3D TOF, 3D black-blood T1 VISTA pre/post mdc	Wall enhancement in all ruptured	histology
Nagahata	Clinical neuroradiol	2014	117	ruptured and unruptured	3T Philips	motion-sensitized driven equilibrium (MS-DE-3D-TSE)	Wall enhancement frequently observed on ruptured	Strong/Faint/No enhancement
Edjlali	Stroke	2014	87	ruptured and unruptured	3T GE	3D FSE pre and post mdc	Wall enhancement frequently observed on instable	
Vakil	AJNR	2015	23	unruptured	3T/1.5 Siemens	3D TOF, multiphase 3D T1 GE acquired every 5-8 second.	Permeability correlates with aneurism size and high risk	Pilot
Matsushige	AJNR	2015	14	unruptured	3T Toshiba	HOP: combination of 3D TOF and flow-sensitive black-blood.	Correlation with histologic atherosclerotic plaque	? Fusiformes
Liu	Interventional neuroradiology	2016	48	unruptured	3T Philips	3D TOF, 3D black-blood T1WVISTA pre post mdc	Wall enhancement independently associated aneurism size	
Omokada	AJNR	2016	82	ruptured and unruptured	3T/1.5 GE	3D TOF, 3D FSE pre and post mdc	Wall enhancement in ruptured	Index wall enhancement index (WEI)
Hu	Neuroradiology	2016	25	ruptured and unruptured	3T Siemens	3D TOF, 3D HR pre y post	Wall enhancement in symptomatic	Histology
Fu	Clinical neuroradiol	2017	45	unruptured	3T Siemens	3D TOF, T1 and T2	Wall enhancement in headache and 3 nerve palsy	
Omokada	Neurosurgery	2017	26 (Multiples)	ruptured	3T/1.5 GE	3D TOF, 3D FSE pre and post mdc	Wall enhancement associated with rupture risk independently from size and clinical characteristi	Index wall enhancement index (WEI)
Edjlali	Radiology	2018	263 (multiples)	ruptured and unruptured	3T GE	3D FSE pre and post mdc	thick (>1mm) circumferential wall enhancement in unstable aneurysm	
Lv	Neurosurgery	2018	110 (multiples)	unruptured	3T GE	3D TOF, T1 black-blood FSE pre post mdc	Wall enhancement associated with conventional high risk rupture characteristics and more frequently in unstable aneurysms	

Fig.11: overview della letteratura

## Ipotesi

L'ipotesi principale dello studio è che l'enhancement della parete vasale alla risonanza magnetica ad alta risoluzione (3T-MRI) sia un marcatore potente ed affidabile della infiammazione della parete dell'aneurisma e della sua conseguente rottura.

# "Research Challenge"

Ogni anno approssimativamente il 35% dei pazienti con aneurisma cerebrale muore prima dell'arrivo in ospedale.

Il progetto si prefigge di prevenire la morte da rottura di aneurisma cerebrale in una ampia popolazione di pazienti, spesso giovani.

La presa di contrasto della parete vasale alla Risonanza Magnetica, associata alla presenza di marcatori ematici dell'infiammazione, potrebbe evidenziare il rischio di rottura prevenendo la morte o la disabilità a lungo termine.

## Scopi e obiettivi

### Obiettivo principale:

Questo progetto di ricerca è uno studio isto-radiologico prospettivo.

L'obiettivo principale dello studio è di confermare su una coorte prospettica di pazienti che la presa di contrasto della parete vasale alla Risonanza Magnetica di parete (IVW-RM) riflette l'infiammazione della parete stessa e può, quindi, essere considerata come fattore di rischio di rottura dell'aneurisma intracranico. Di conseguenza, potrebbe essere considerato come il primo fattore di rischio che prende in considerazione il meccanismo fisiopatologico della rottura stessa, vale a dire l'infiammazione delle pareti (Fig.12).

## **Obiettivi secondari:**

Obiettivi secondari dello studio sono:

-la correlazione tra presa di contrasto della parete e biomarkers ematici di infiammazione,

-lo studio la parete vasale in RM

-il monitoraggio clinico e neuroradiologico nel tempo dei pazienti che non vengono trattati ma sottoposti a follow-up (ad. es. cambiamenti nella infiammazione di parete e nelle dimensioni/morfologia, comparsa di sintomi).

La correlazione tra enhancement di parete e biomarkers infiammatori ematici è stata effettuata valutando l'eventuale aumento dei biomarkers infiammatori ematici in tutti i pazienti, con e senza presa di contrasto di parete alla RMN.

Lo studio dell'enhancement di parete è stato effettuato anche su pazienti con emorragia subaracnoidea e/o multipli aneurismi. Di routine, è stato trattato all'inizio l'aneurisma posto anatomicamente vicino alla localizzazione del sanguinamento subaracnoideo: è stato successivamente analizzato in Risonanza Magnetica quale aneurisma captava il mezzo di contrasto.

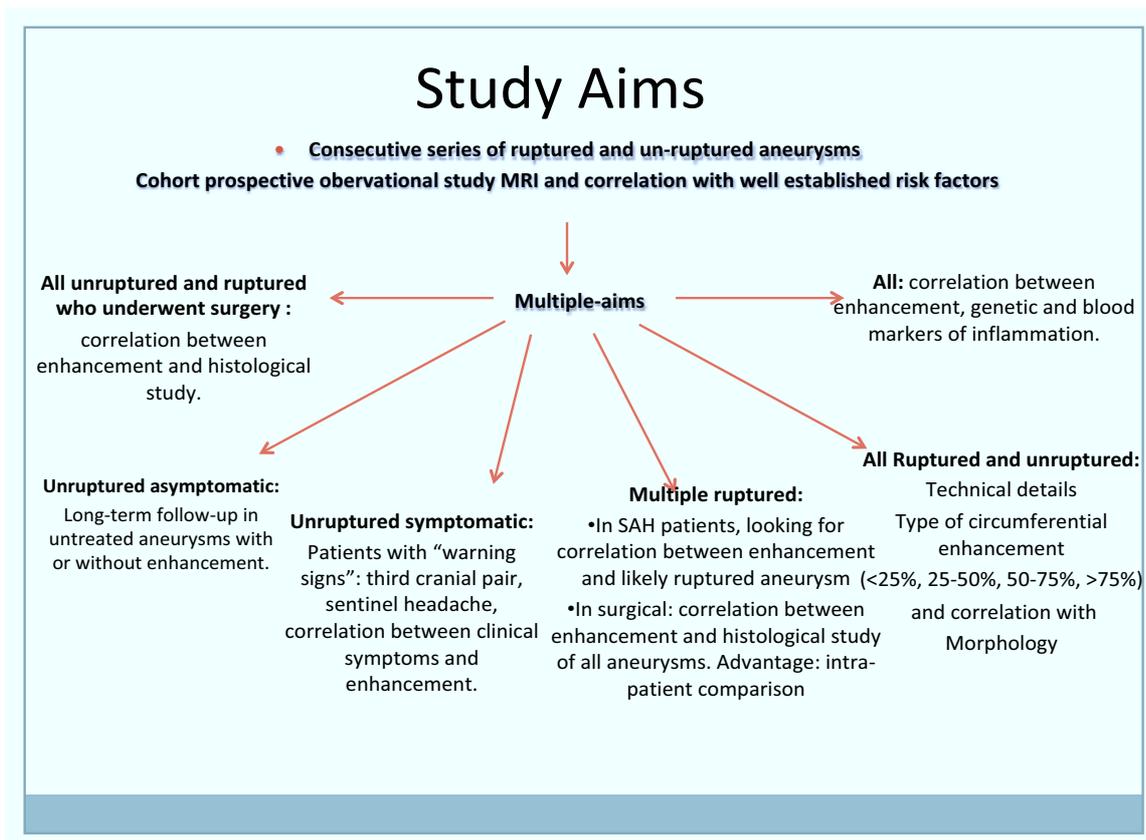


Fig.12: Obiettivi dello studi

## Materiali e Metodi

Il progetto di ricerca consiste in uno studio osservazionale prospettico di coorte. Nello studio sono stati inclusi 61 pazienti consecutivi ricoverati presso l’Ospedale Universitario Vall d’Hebron nell’arco di un anno sia sintomatici che asintomatici. I pazienti inclusi sono stati suddivisi in tre gruppi in relazione alle caratteristiche cliniche.

- pazienti con aneurisma incidentale
- pazienti con sintomi moderati (paralisi dei nervi cranici o cefalea sentinella),
- emorragia subaracnoidea (da zero a cinque giorni post-emorragia)

I fattori di rischio per rottura di aneurisma considerati sono:

- Tabagismo
- Età (maggiore o minore di 70 anni)
- Sesso femminile
- Dimensioni dell'aneurisma (<7, 7-9.9, 10-19.9, >20 mm)
- Localizzazione dell'aneurisma (ICA, MCA, ACA/PcoA/Aneurismi del circolo posteriore)
- Morfologia irregolare dell'aneurisma
- Pregressa emorragia subaracnoidea da altro aneurisma
- Anamnesi familiare di aneurisma intracranico
- Ipertensione arteriosa
- Presenza di aneurismi multipli
- Varianti anatomiche del circolo di Willis
- Cefalea sentinella
- Deficit del III Nervo cranico
- Residenza geografica del paziente (Caucasico, Finlandese, Giapponese, Africano, Ispanico)
- Fattori scatenanti nei pazienti con emorragia subaracnoidea (ponzamento, coito, uso di caffeina, episodi di angor, intensa attività fisica).

Altre variabili cliniche considerate sono il diabete, l'ipercolesterolemia, la dislipidemia, l'abuso alcolico e di droghe, pregressi ictus o patologia cerebrovascolare, malattia del rene policistico, disordini del tessuto connettivo, uso di antiaggreganti o anticoagulanti orali, l'occupazione ed altre comorbidità.

Per quanto riguarda le variabili neurologiche analizzate, è stata presa in considerazione la presentazione di qualsiasi sintomo neurologico di tipo focale, sia acuto che cronico.

Sono state, inoltre, applicate la Modified Rankin Scale e la Glasgow Come Scale su tutti i pazienti presi in esame (Fig.13).

I criteri di esclusione dallo studio sono stati i seguenti:

- Aneurisma precedentemente trattato
- Aneurisma fusiforme o parzialmente trombizzato
- Aneurisma gigante (>25mm)
- Controindicazioni all'esecuzione della Risonanza Magnetica
- Allergia nota al mezzo di contrasto
- Gravidanza

E' importante sottolineare che la decisione di trattare un aneurisma o meno è stata presa da un comitato interdisciplinare di patologia neurovascolare, composto da neurochirurghi e neuroradiologi, indipendentemente dalla presenza o meno di presa di contrasto della parete alla Risonanza Magnetica, basandosi su ben noti fattori di rischio in accordo con le recenti linee guida.

# Study Design

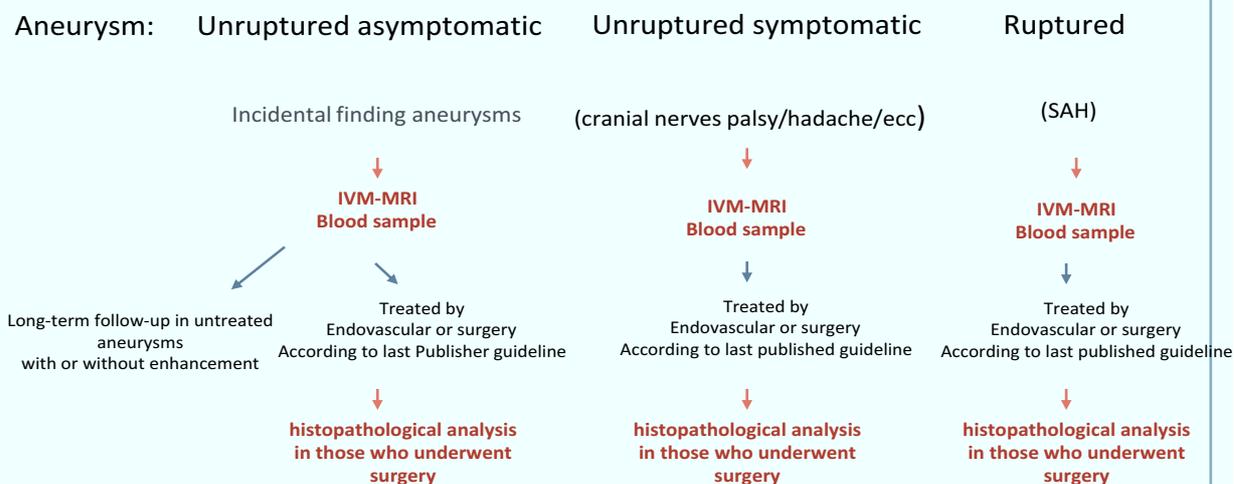


Fig.13: Disegno dello studio

Tutti i pazienti studiati hanno ricevuto informazioni dettagliate sullo studio ed è stato raccolto il loro consenso informato.

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Ospedale Universitario Vall d'Hebron.

## 1. Risonanza Magnetica

Lo studio di Risonanza Magnetica della parete è stato effettuato utilizzando una RM a 3T (Magnetom TRIO, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany) con bobine a 32 canali.

Il protocollo dell'encefalo comprende immagini di 3 mm di spessore in sequenze

assiali DWI, SWI, T2-FLAIR e 3D-TOF intracranico; le sequenze ad alta risoluzione per lo studio della parete dei vasi è effettuato mediante immagini di 2 mm di spessore in sequenze T1 (pre- e post-contrasto) e T2 perpendicolari alla parete del vaso.

Due esperti neuroradiologici con rispettivamente 10 e 15 anni di esperienza in neuroradiologia hanno studiato indipendentemente le immagini valutando lo spessore e la presenza di presa di contrasto della parete. Essi hanno inoltre evidenziato la presenza di eventuali esiti a livello cerebrale e di anomalie di parete extra-aneurismatiche.

I due refertatori hanno eseguito lo studio neuroradiologico "in cieco", in relazione ai dati clinici del paziente.

### **Sequenze eseguite per lo studio:**

- TOF e piano di acquisizione

### **Sequenze per parenchima cerebrale**

- DWI 3 mm (lesioni ischemiche acute)
- T2 FLAIR 3 mm (emorragia subaracnoidea, lesioni ischemiche croniche)
- SWI (sanguinamenti cronici)

### **Sequenze ad alta risoluzione per studio di parete dell'aneurisma:**

- T1 2mm, pre-contrasto, lungo i principali assi dell'aneurisma (altezza, larghezza e lunghezza)
- Somministrazione di mezzo di contrasto
- T2 sull'asse maggiore dell'aneurisma (altezza +/- larghezza e lunghezza minori, se è presente trombosi parziale)
- T1 post-contrasto lungo i principali assi dell'aneurisma (altezza, larghezza e lunghezza)

## 2. Angiografia a sottrazione digitale (DSA)

L'Angiografia a sottrazione digitale (DSA) è stata eseguita come esame di routine utilizzando un angiografo bi-piano (Allura Clarity 20/20, Philips).

E' stato utilizzato un catetere diagnostico mediante accesso femorale unilaterale, con paziente in anestesia locale, per ottenere proiezioni standard 2D. Al termine è stata eseguita un'angiografia rotazionale 3D.

## 3. Tecnica chirurgica:

Tutti i pazienti sottoposti a trattamento neurochirurgico sono stati trattati mediante approccio pterionale transilviano. Il management pre e post-operatorio dei pazienti è stato effettuato secondo gli standard istituzionali.

La necessità di resezione del fondo dell'aneurisma non implica alcun cambiamento sostanziale nell'approccio all'aneurisma. Solo per evitare artefatti causati dall'uso della coagulazione bipolare è preferibile evitare la dissezione con utilizzo di coagulatore preferendo la detensione del parenchima cerebrale mediante apertura delle cisterne basali con l'utilizzo di micro-forbici e la successiva dissezione del parenchima cerebrale e dell'aneurisma con micro-dissettori. Una volta posizionata la clip ne è stata verificata la completa esclusione mediante video-angiografia intraoperatoria o arteriografia intraoperatoria. Il fondo dell'aneurisma è stato sezionato con micro-forbici. Per ottenere la maggiore quantità di campione, il taglio è stato eseguito subito al di sopra della clip. Il campione è stato quindi immediatamente inviato a fresco per lo studio istopatologico.

Dopo il clipping, il fondo dell'aneurisma, non coagulato, è stato sezionato mediante microforbici ed inviato per studio istopatologico.

#### 4. Studio dei marcatori d'infiammazione nel sangue periferico

Le risposte infiammatorie cellulare ed umorale costituiscono l'evento fondamentale nella formazione e rottura di un aneurisma. Queste risposte, mediate da citochine infiammatorie come il Tumor Necrosis Factor (TNF), l'interleuchina IL-1 $\beta$  e la metalloproteinasi (MMPs), promuovono l'ingresso di macrofagi e degradano il collagene e le fibre elastiche della parete.

I campioni di sangue sono stati utilizzati per rilevare multipli biomarkers di infiammazione (IL-1, MMP-2, MMP-9, TNF alpha).

Le provette sono state centrifugate a 5000 rpm per 15 minuti, conservate a 86° e successivamente analizzate dall'Istituto di Ricerca Vall d'Hebron.

#### 5. Studio genetico:

La formazione di un aneurisma intracranico è influenzata da una complessa interrelazione tra fattori genetici e fattori di rischio ambientali che spesso si rafforzano a vicenda. Sono stati identificati 3 polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) che erano stati associati alla presenza di aneurismi intracranici sporadici. Tutte le varianti sono presenti in loci che ospitano polimorfismi comuni legati all'incremento dell'incidenza di deficienze e malattie strutturali cardiovascolari. Gli SNP erano localizzati sul cromosoma 9, 8 e la prova più evidente per il collegamento era con un locus su 7q11 vicino al gene che codifica per l'elastina, una proteina che è coinvolta nella preservazione dell'integrità della parete del vaso. I campioni di sangue per lo studio genetico sono stati conservati a -20 °C per lo studio presso l'Istituto di ricerca Vall D'Hebron.

## 6. Studio istologico ed immunoistochimico

Gli studi istologici sono stati eseguiti su campioni inviati dal neurochirurgo al laboratorio di istopatologia. Sono stati ricercati la presenza di cellule infiammatorie nella parete aneurismatica, l'interruzione della lamina elastica interna, gli strati disorganizzati di cellule muscolari lisce, l'iperplasia miointimale e la presenza di trombi organizzati.

E' infatti noto che lo stress ossidativo porta all'accumulo e invasione di cellule infiammatorie attraverso un progressivo incremento di citochine chemotattiche.

In pazienti sottoposti ad intervento chirurgico è stato eseguito uno studio istologico ed una colorazione immunoistochimica al fine di individuare e confermare la presenza di endotelio intatto e cellule muscolari lisce ordinate nelle pareti di aneurismi non rotti e, al contrario, endotelio interrotto ed invasione di cellule muscolari lisce con macrofagi e cellule infiammatorie negli aneurismi rotti. Studi pubblicati in letteratura evidenziano come la presenza di diversi markers infiammatori sia effettivamente associata ad aneurismi rotti o con tendenza alla rottura. In particolare uno studio su popolazione finlandese su 66 aneurismi (24 non rotti e 42 rotti) ha mostrato nella parete degli aneurismi rotti l'assenza dell'endotelio, la presenza di trombi freschi o organizzati, una iperplasia intimale ed una infiltrazione leucocitaria (CD45, CD3, CD 11b, CD 68 e CD 163)<sup>(31)</sup>. E' Interessante notare come in questo studio la parete degli aneurismi classificati come familiari in quanto presenti in pazienti con positività anamnestica familiare per aneurisma cerebrale, fosse identica a quelli sporadici ed il dato comune a tutti era la perdita di lamina elastica. Inoltre la presenza di calcificazioni di tipo ateromasico era presente in soli 5 aneurismi rotti e 2 non rotti mentre una parete endoteliale con iperplasia miointimale era un reperto comune ai due gruppi. La struttura di parete dell'aneurisma è stata quindi catalogata in 4 gruppi: il gruppo A

comprendeva aneurismi con parete endoteliale costituito da cellule muscolari lisce organizzate, il gruppo B con cellule muscolari lisce disorganizzate, nel gruppo C erano inseriti aneurismi con parete ipocellulare e presenza di iperplasia miointimale o trombi organizzati e nel gruppo D quelli con endotelio molto sottile ed ipocellulare. I dati dello studio hanno dimostrato che aneurismi con endotelio di tipo D erano associati a rottura nel 100% dei casi, il tipo C nel 64%, il tipo B nel 55% ed il tipo A nel 42%. Alcuni aneurismi presentavano inoltre composizione eterogenea di parete con graduale differenziazione dal gruppo A e B al C e D in particolare verso il fondo dell'aneurisma stesso. La presenza di fenomeni trombotici freschi o organizzati era più frequentemente riscontrata negli aneurismi rotti (70%) rispetto ai non rotti (25%)(Fig.14).

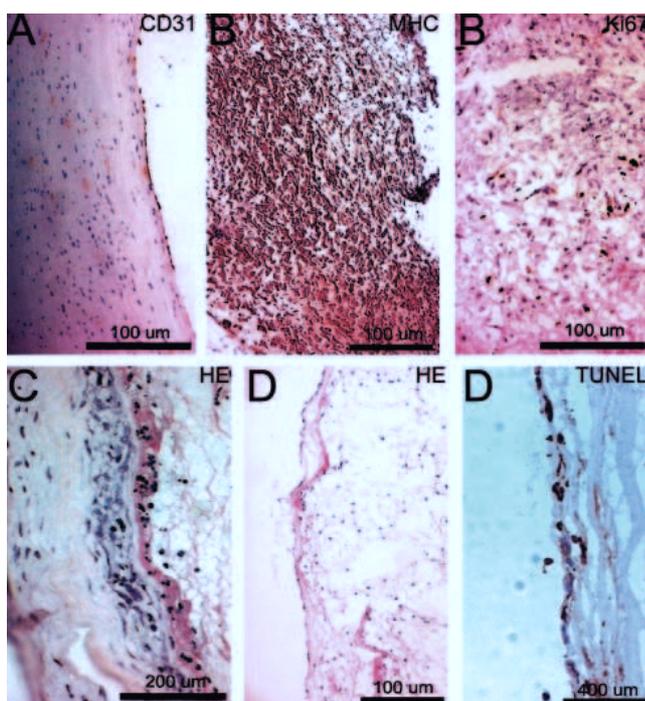


Fig.14: i 4 tipi di parete descritti nello studio di Frösen (2004): A: parete endoteliale con cellule muscolari lisce organizzate linearmente. B: parete ispessita con cellule muscolari disorganizzate (55% dei rotti). C: parete ipocellulare con iperplasia intimale e trombi organizzati (64% dei rotti). D: parete ipocellulare estremamente sottile con trombosi lineare (100% dei rotti)<sup>(31)</sup>

La parete degli aneurismi rotti era caratterizzata da perdita di endotelio, trombosi fresca o organizzata, iperplasia miointimale e infiltrazione leucocitaria.

Negli aneurismi sottoposti a trattamento neurochirurgico tra 3,5 e 48h dopo la rottura il tasso di proliferazione miointimale e la densità di cellule T (CD3) e

macrofagi (CD163) era aumentata già 12h prima della rottura ma rimaneva stabile nelle altre aree dell'aneurisma. La densità d'infiltrati leucocitari nelle aree di iperplasia miointimale rispetto alle altre zone erano significativamente associati alla analisi di regressione lineare multipla ( $R^2=0.82$ ;  $P<0.001$ ).

I markers immunoistochimici utilizzati nel presente studio sono il CD68 (marker dei macrofagi), CD3 (T cell receptor), CD34 (marker localizzato nella superficie dei vasa vasorum), CD31 (PECAM-1 Platelet endothelial cell adhesion molecule fondamentale nel processo di angiogenesi), CD45 (tirocin-fosfatasi di membrana coinvolta nell'attivazione cellulare e generalmente espressa ad elevate concentrazioni su linfociti e monociti), triptasi (enzima secreto dai mastociti), Ki67 (proteina nucleare associata alla proliferazione cellulare) e AML (actina delle cellule muscolari lisce- indice di iperplasia miointimale)(Fig.15,16)

Histology/Immunoistochemistry markers	Marker
Macrophage Marker	CD68
T-cell receptor	CD3
Mast-cells	Triptase
Cell proliferation	Ki67
Alfa-smooth muscle actin	AML
Vasa Vasorum	CD34
Platelet endothelial cell adhesion molecule	CD31
Fe+	Perls
Leukocyte Common Antigen	CD45

Fig.15: Markers immunoistochimici analizzati



Fig.16: diffusa infiltrazione di macrofagi

L'anticorpo monoclonale CD68 ed il policlonale CD3 sono da tempo noti per essere markers rispettivamente di macrofagi/monociti e di cellule T (Fig.17,18).

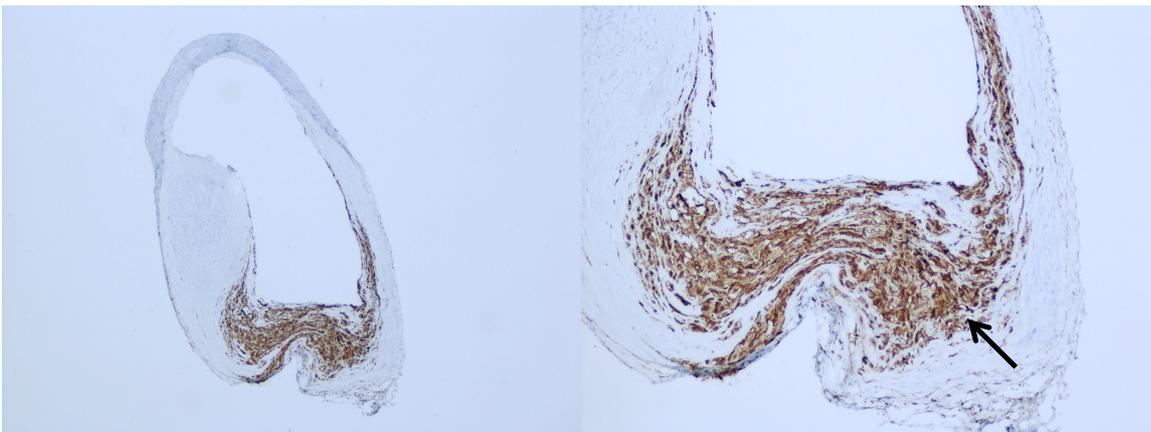


Fig.17: Anticorpo monoclonale CD68

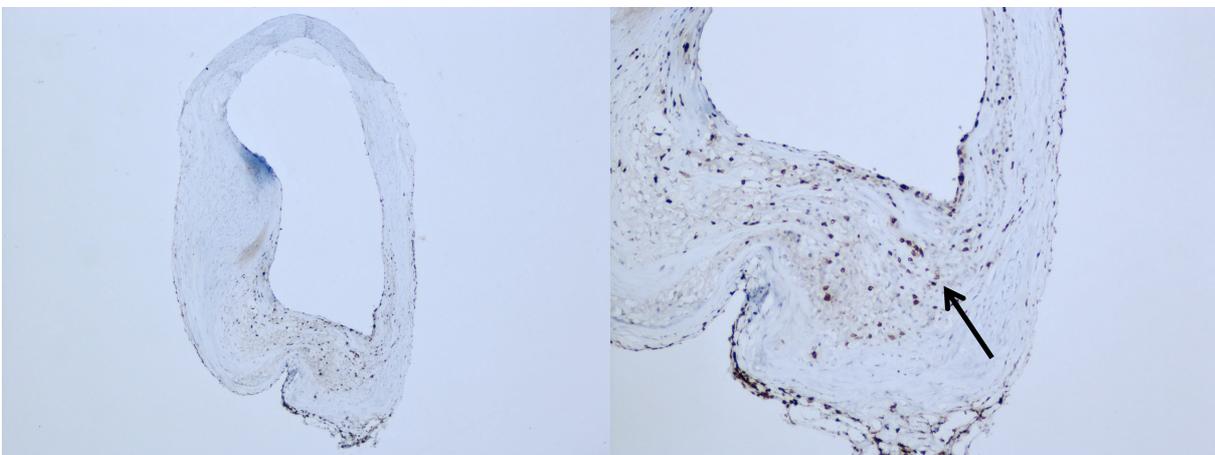


Fig.18: Anticorpo monoclonale CD3

Già nel 1999 uno studio americano su 25 aneurismi aveva evidenziato la presenza di macrofagi/monociti (identificati mediante CD68) e linfociti T (CD3) nelle pareti degli aneurismi ma non in quelle delle arterie di controllo, confermando il dato mostrato da Kosierkiewicz nel 1994 che, utilizzando gli stessi markers aveva osservato l'infiltrazione di macrofagi attivati e linfociti T, ma non linfociti B, nella parete degli aneurismi. Il CD45 invece è un antigene comune leucocitario<sup>(32-33)</sup>.

I markers CD31 e CD34 vengono utilizzati per identificare cellule endoteliali e *vasa vasorum*. I *vasa vasorum* sono plessi avventiziali derivati da piccoli rami di vasi più grandi e sono essenziali per l'apporto di ossigeno e nutrienti all'avventizia e alla media. Le arterie intracraniche nei bambini non hanno *vasa vasorum* mentre negli adulti sono presenti nelle arterie extracerebrali ma, a livello intracranico, solo nei segmenti prossimali della carotide interna e delle arterie vertebrali. Questo dato conferma che i *vasa vasorum* nelle arterie intracraniche è un fenomeno acquisito. I CD31 hanno come target le cellule endoteliali ed infiammatorie mentre i CD34 sono predominanti nelle cellule totipotenti del sistema ematopoietico<sup>(34)</sup>(Fig.19,20).

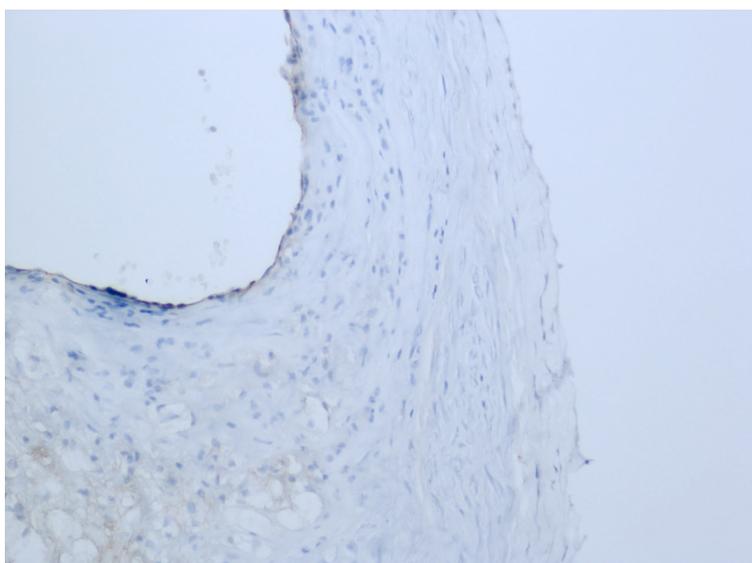


Fig.19: Markers CD31 (*vasa vasorum*)

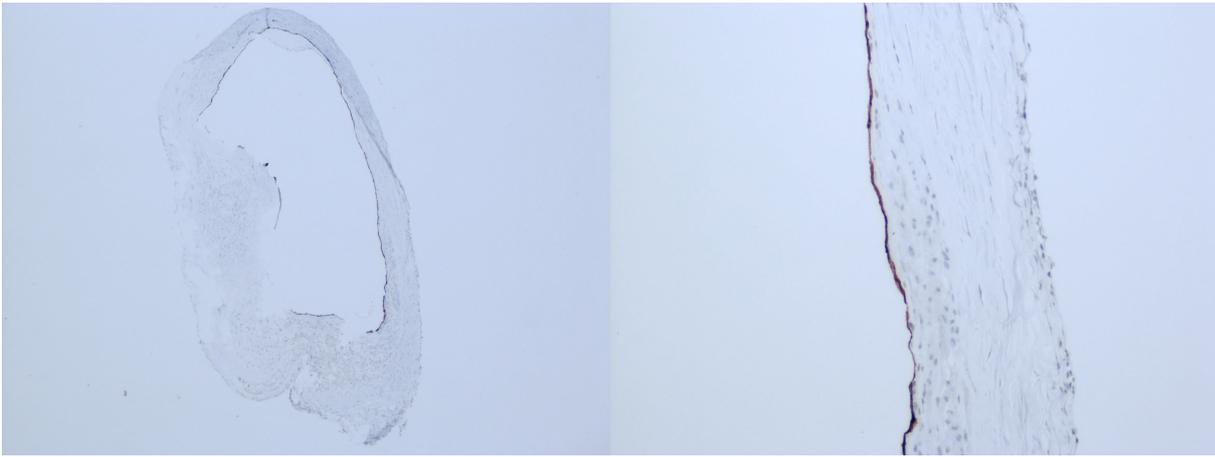


Fig.20: markers CD34 (*vasa vasorum*)

Il marker Perls identifica invece i depositi di Ferro che si formano dall'emoglobina non fagocitata o rilasciata dai macrofagi e contribuisce alla stimolazione infiammatoria ed allo stress ossidativo.

Infine l'actina delle cellule muscolari lisce (AML) è nota ridursi nelle arterie con aneurisma dove le cellule muscolari lisce si modificano e perdono l'attività contrattile, come già spiegato da Mandelbaum nel 2013<sup>(35)</sup>(Fig.21).

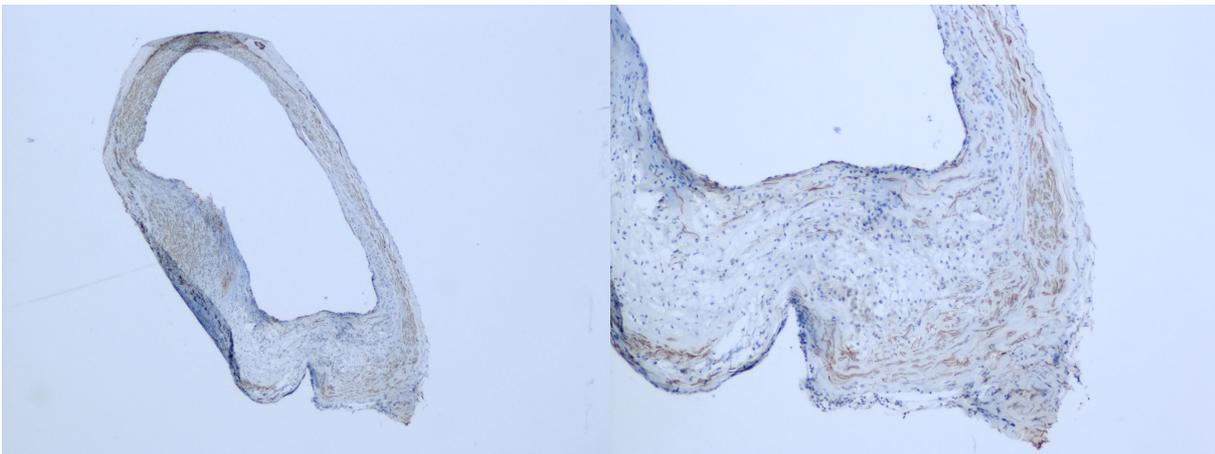


Fig.21: AML nella parete aneurismatica

Un esperto anatomopatologo ha analizzato i campioni senza conoscere informazioni cliniche nè radiologiche del paziente e classificando gli aneurismi come:

-STABILE,

-INSTABILE,

-ROTTA,

in base alle caratteristiche istopatologiche.

## 7. Analisi statistica

Sono state effettuate analisi statistiche descrittive e di frequenza e confrontate mediante l'utilizzo del pacchetto IBM SPSS Statistics, versione 22.0 per Windows. L'accordo inter e intra-valutatore per la presenza di enhancement delle pareti dei vasi è stato analizzato usando i coefficienti Kappa (k) con i loro intervalli di confidenza al 95%. La significatività statistica per le differenze intergruppo è stata valutata dal chi-quadrato di Pearson o dal test esatto di Fisher per le variabili dicotomiche o nominali, il test lineare del chi-quadrato di tendenza per le variabili ordinali e il test t di Student o ANOVA per le variabili continue. Le variabili quantitative senza una distribuzione approssimativa normale sono state confrontate con il test U di Mann-Whitney (2 gruppi) o con il test di Kruskal-Wallis (più di 2 gruppi). E' stata eseguita un'analisi di regressione logistica multipla per determinare se l'aumento della parete su IVW-MRI è associato indipendentemente allo stato di stabilità dopo aggiustamento da altri fattori potenziali. Un valore  $p < 0,05$  è stato considerato statisticamente significativo.

## 8. Limitazioni dello studio

La severità del quadro clinico del paziente con emorragia subaracnoidea da rottura di aneurisma (stato di coma/necessità di intubazione oro-tracheale) ha generato ovviamente delle limitazioni logistiche nell'inclusione del paziente. Infatti in alcuni casi la risonanza magnetica non è stata effettuata per evitare un ritardo nel trattamento.

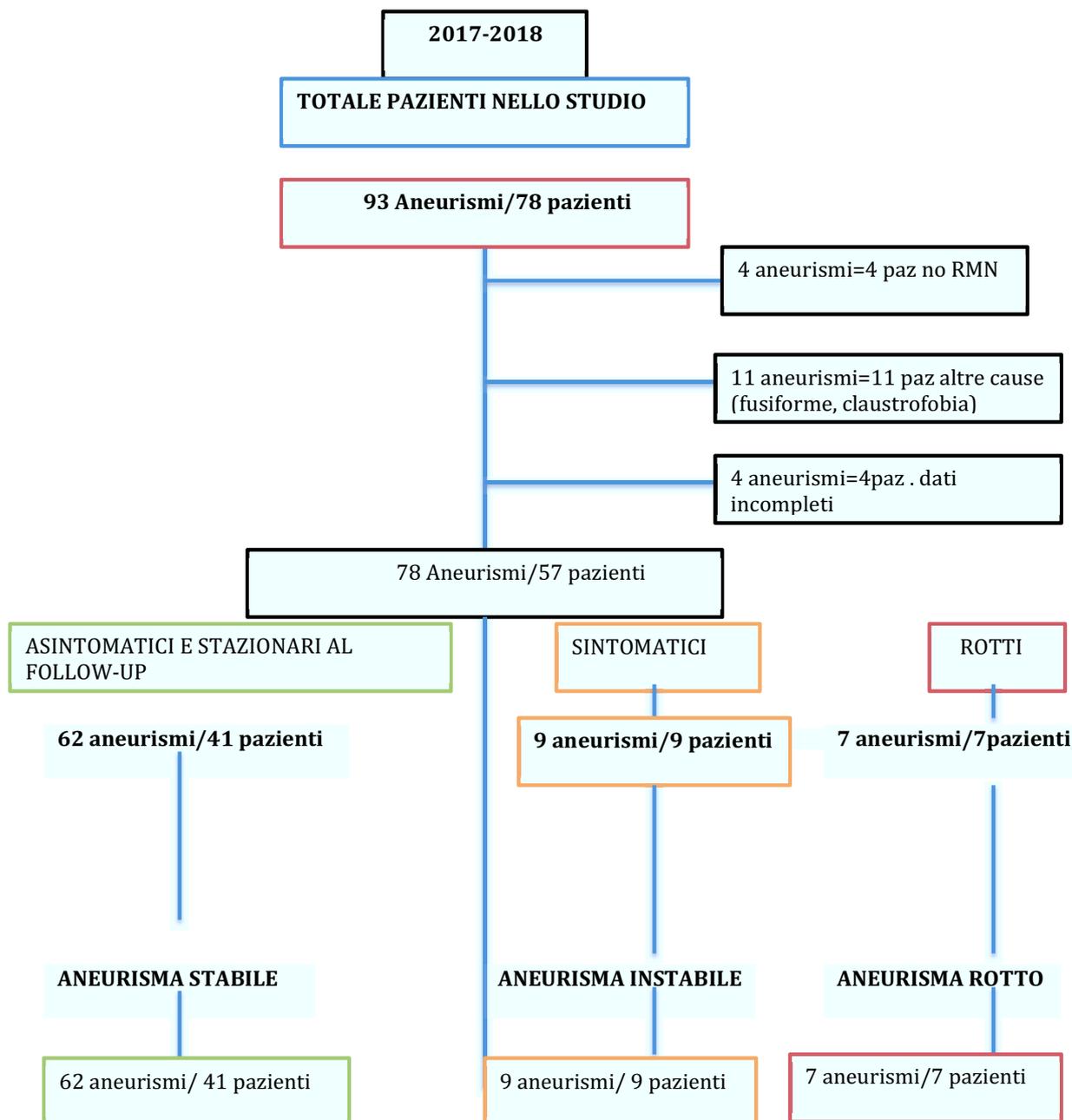
Inoltre, poiché nel centro di studio la maggior parte degli aneurismi vengono trattati per via neurochirurgica o endovascolare, vi è un rallentamento nel tasso di inclusione nel sottogruppo di pazienti non trattati che eseguono solo la risonanza magnetica ed il controllo clinico.

# Risultati

Allo stato attuale, sono stati inclusi 76 pazienti, giunti alla nostra osservazione presso l'Ospedale Vall D'Hebron di Barcellona (Spagna) durante un periodo di un anno, tra ottobre 2017 ed ottobre 2018.

Dei 76 pazienti inclusi nello studio, 4 hanno, in seguito rinunciato a realizzare RM, 3 sono stati esclusi per claustrofobia, 1 paziente è stato escluso in quanto già incluso in altri studi per pregressa diagnosi di sclerosi multipla, 1 paziente per Rankin elevato (pluripatologia), 1 paziente perchè portatrice di pacemaker e pertanto impossibilitata ad eseguire RMN encefalo, 1 paziente è stato escluso per la successiva diagnosi di aneurisma fusiforme, 2 pazienti sono stati trattati prima di poter realizzare la RM, 2 pazienti perché l'aneurisma non era visualizzabile alla Risonanza Magnetica per le ridotte dimensioni.

Dei rimanenti 61 pazienti, 4 sono stati esclusi dall'analisi dei risultati attuali per incompletezza dei dati. (Schema 1)



Schema 1 : casistica selezionata per lo studio

L'età media dei pazienti era 57 anni (mediana 56), compresa tra 32 e 82 anni, di questi 37 (64,9%) erano donne e 20 (35,1%) uomini. Il 91,2% (n=52) dei pazienti era di razza caucasica, in minore percentuale di razza ispanica ed africana.

L'analisi finale è stata eseguita su da 57 pazienti, portatori di 78 aneurismi, che sono stati sottoposti a studio di Risonanza Magnetica di parete ad alto campo

3T. I pazienti con aneurisma unico erano 42 (73,3%) mentre 15 pazienti (26,3%) presentavano aneurismi multipli, in particolare 10 pazienti (17,5%) erano portatori di 2 aneurismi, 4 pazienti (7%) di 3 aneurismi ed una paziente (1,8%) di quattro aneurismi (FIG 22).

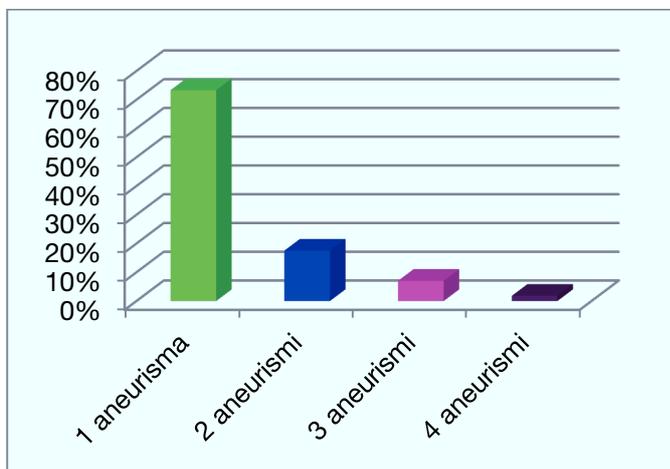


Fig. 22

Dei 57 pazienti reclutati per lo studio, 17 (29,8%) sono stati sottoposti a clipping dell'aneurisma e 8 di questi a sezione microchirurgica del fondo dell'aneurisma e analisi istopatologica, 31 pazienti (54,4%) sono stati sottoposti a trattamento endovascolare, e 9 (15,8%) sono seguiti in follow-up (Fig.23).

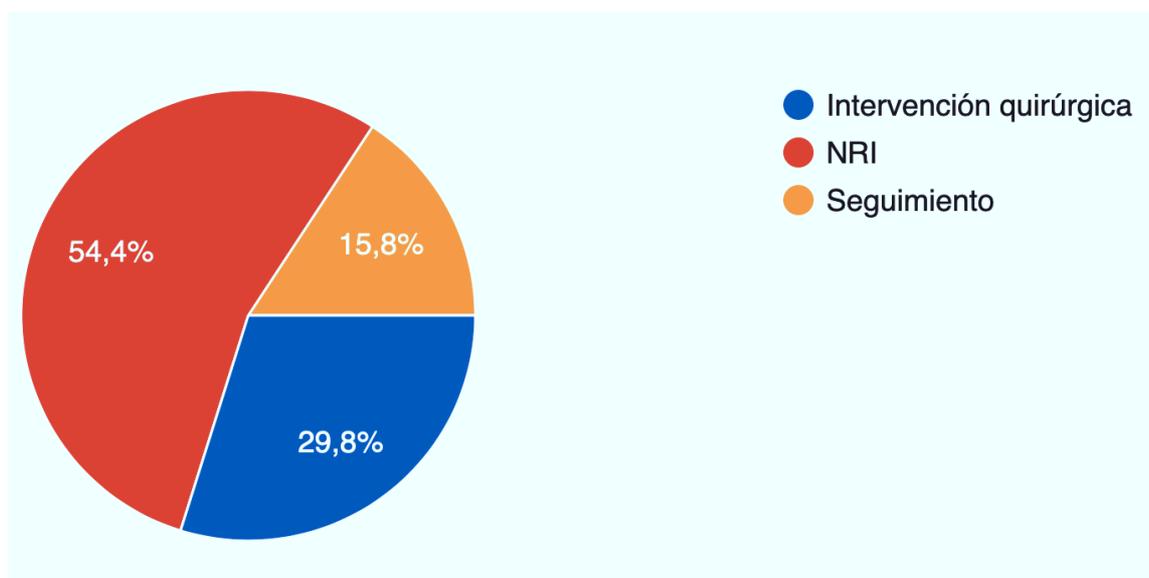


Fig.23: Diagramma della distribuzione in base al trattamento effettuato sulla popolazione oggetto di studio

L'analisi dei markers infiammatori nel siero è stata eseguita su 37 dei 41 campioni prelevati prima del trattamento o al momento del ricovero per eseguire la RMN.

I pazienti, dopo aver firmato il consenso informato, sono stati sottoposti ad un questionario al fine di identificare e catalogare sintomi e eventuali fattori di rischio.

I fattori di rischio considerati sono sia i modificabili che i non modificabili. L'età è stata classificata considerando un cut-point a 70 anni come da dati di letteratura. Sono stati suddivisi in fattori di rischio di rottura e fattori di rischio cerebrovascolare.

Tra i fattori di rischio cerebrovascolare è stata posta attenzione a diabete (riscontrato nel 19,3% dei pazienti), ipercolesterolemia (33,3%), dislipidemia (24,6%), abuso di alcol (12,5%) e droga (2%), pregresso episodio cerebrovascolare (22,10%), rene policistico(1,80%), patologie del tessuto connettivo e alla terapia antiaggregante (19,30%) o anticoagulante (3,5%) in corso(Fig.24).

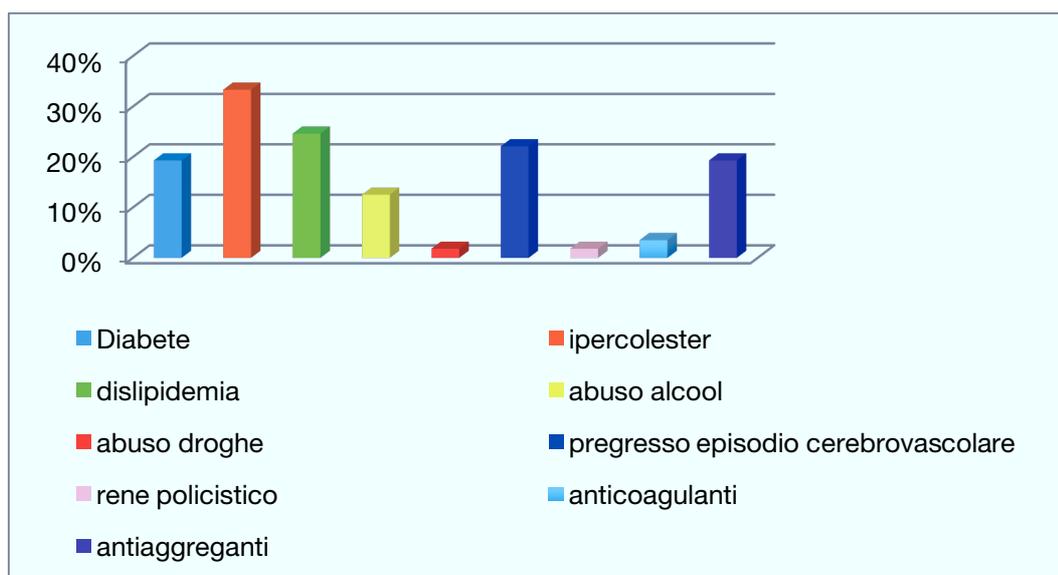


Fig.24. Distribuzione percentuale dei fattori di rischio cerebrovascolare analizzati nello studio

I fattori di rischio di rottura presi in esame sono stati l'età (86% dei pazienti <70 anni e 14%>70 anni), il sesso (66,% donne e 32,3% uomini), il fumo di sigaretta (50,9%), un pregresso episodio di emorragia subaracnoidea da altro aneurisma (7%), sede e dimensioni dell'aneurisma, familiarità per aneurismi cerebrali (5,3%) e ipertensione arteriosa (43,9%)(Fig.25).

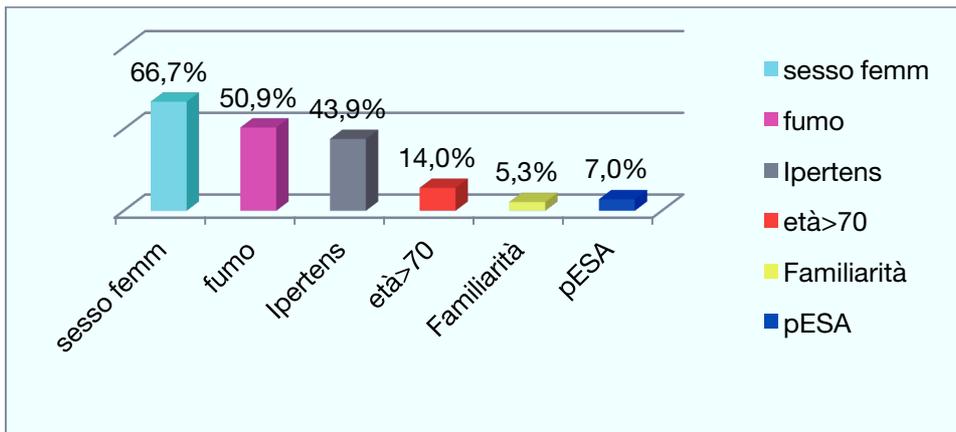


Fig.25. Distribuzione percentuale dei fattori di rischio di rottura nella popolazione studiata

Le dimensioni dell'aneurisma sono state classificate, secondo i criteri utilizzati negli studi di letteratura, creando 4 sottoclassi (<7mm, 7-9.9mm, 10-19.9mm e >20mm).

La maggior parte degli aneurismi presi in esame (40 pari al 70,2%) era di dimensioni minori di 7 mm, 7 aneurismi (12,3%) erano di dimensioni comprese tra 7 e 9,9mm, 6 (10,5%) avevano diametro tra 10 e 19,9 mm e 4 (7%) erano considerati aneurismi giganti (diametro > 20mm) (Fig.26).

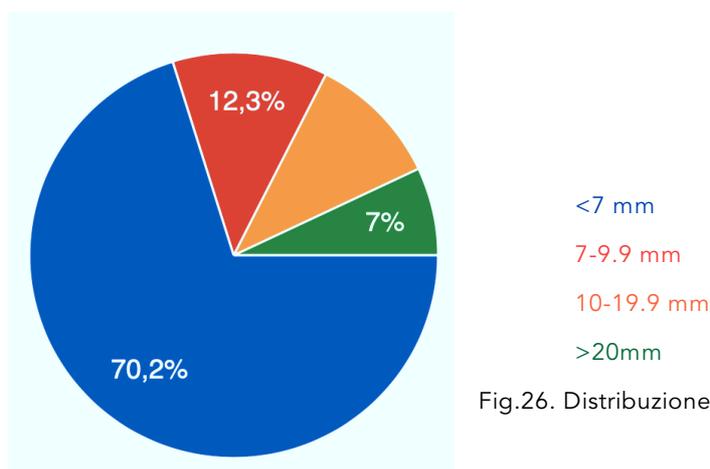


Fig.26. Distribuzione degli aneurismi per dimensioni

Per quanto riguarda la sede nel poligono di Willis, 28 aneurismi (49,1%) erano localizzati nell'arteria carotide interna, 13 (22,3%) nella biforcazione dell'arteria cerebrale media, 7 (12,3%) nell'arteria comunicante anteriore, 4(7%) nell'arteria comunicante posteriore, 3 (5,3%) nell'arteria cerebrale anteriore e 2(3,5%) nel circolo posteriore (incluso arteria cerebrale posteriore e arteria basilare)(Fig.27).

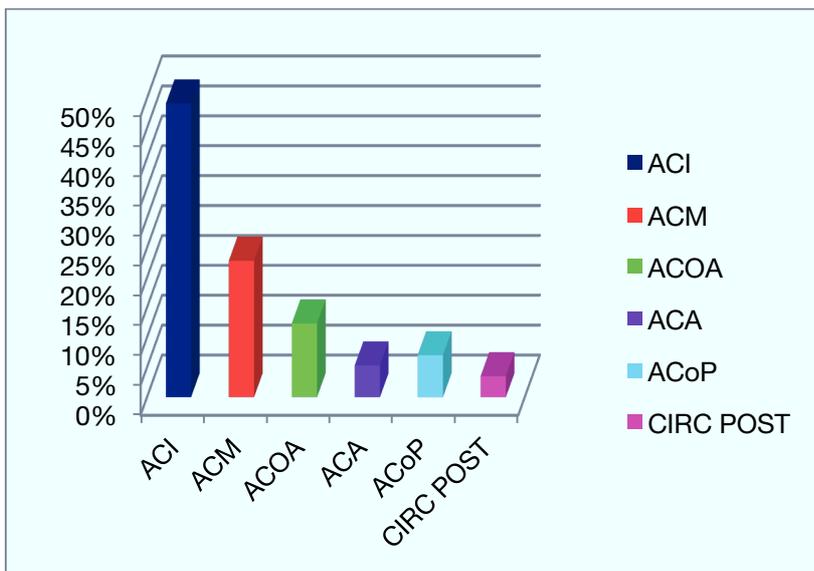


Fig.27. Distribuzione degli aneurismi per sede nel poligono di Willis

Escludendo quelli considerati mediani (arteria comunicante anteriore e basilare), 26 (45,6%) aneurismi erano a carico dell'emisfero di sinistra e 22 (38,6%) a destra.

A tutti i pazienti inclusi nello studio è stato calcolato lo score PHASES(Fig.28).

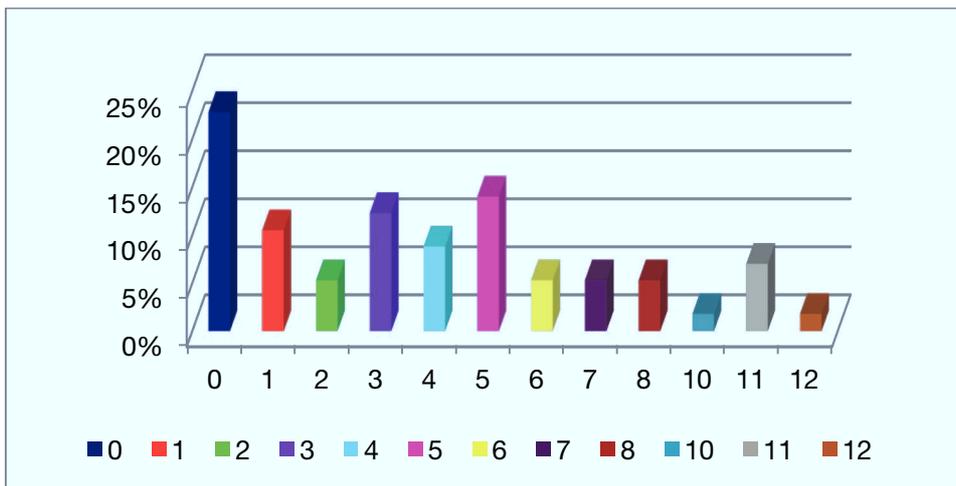


Fig28. Score Phases nei pazienti inclusi nello studio

I pazienti in esame sono stati divisi in 3 gruppi:

- Asintomatici (42 pazienti 73,7%)
- Sintomatici con aneurisma non rotto (8 pazienti 14%)
- Sintomatici con aneurisma rotto (7 pazienti 12,3%)

I sintomi sono stati distinti tra quelli prodromici (warning-signs) per prossima rottura (cefalea sentinella, deficit del III nervo cranico e deficit del VII nervo cranico) e quelli da rottura (cefalea violenta, emiparesi/emipoestesia, disturbi del linguaggio, riduzione del livello di coscienza fino al coma, disturbi visivi/diplopia, altri sintomi di ipertensione endocranica)(Fig.29,30).

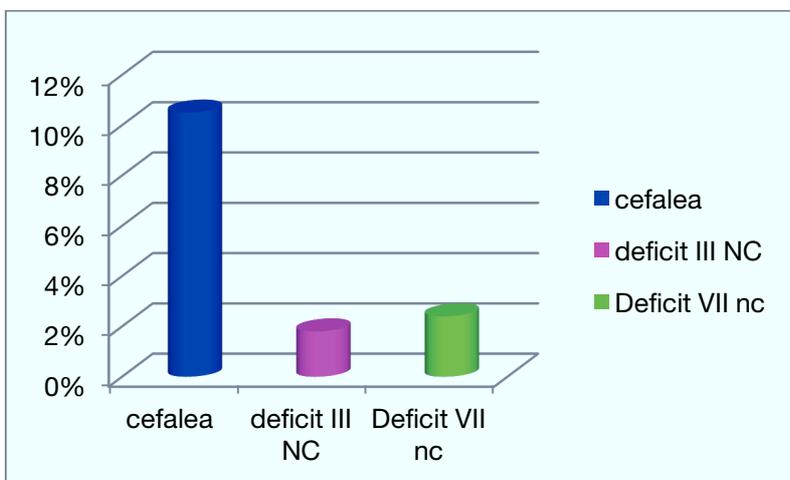


Fig.29 Sintomi prodromici

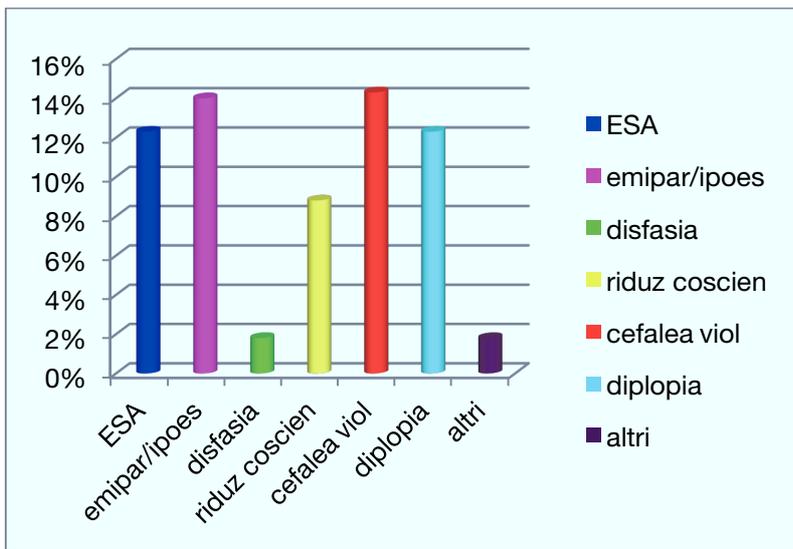


Fig.30 Sintomi di rottura

Sette pazienti (12,3%) sono giunti alla nostra osservazione per emorragia subaracnoidea da rottura di aneurisma. L'emorragia subaracnoidea era classificabile come grado 2 secondo la scala di Fisher in 1 paziente (14,3%) così come per il grado 3, mentre in 5 pazienti (71,4%) era di grado 4.

Tutti i pazienti inclusi nello studio sono stati sottoposti a Risonanza Magnetica di parete ad alto campo in apparecchio a 3Tesla (Magnetom TRIO, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany).

In 25 pazienti (43,9%) vi era captazione di mezzo di contrasto nella parete aneurismatica in particolare di tipo circonfrenziale (66,7%) e nella maggior parte dei casi (55,60%) per una quantità >75% della parete(Fig.31).

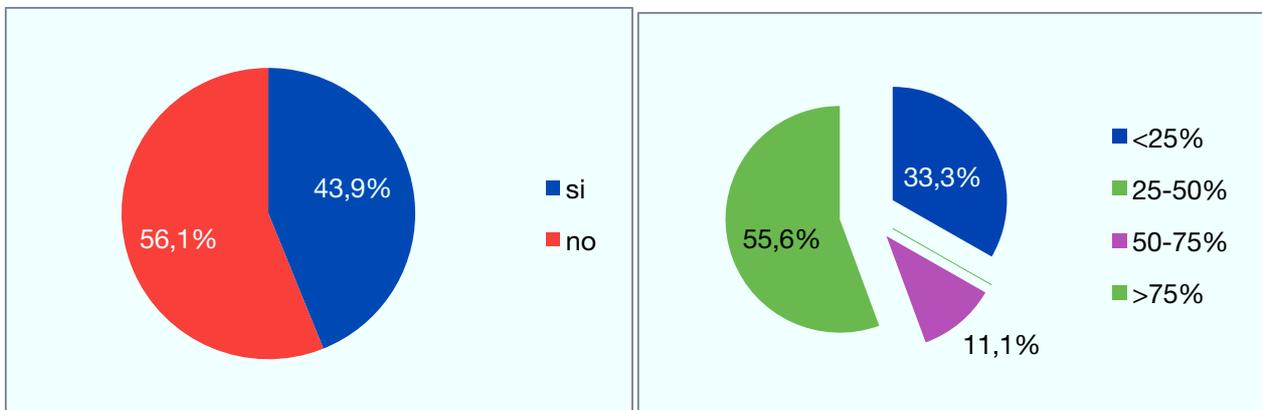


Fig.31 Distribuzione della captazione di mezzo di contrasto e percentuale quantitativa della captazione circonfrenziale.

I 7 (12,3%) pazienti con aneurisma rotto presentavano captazione di contrasto nella parete. Tra i 50 pazienti con aneurisma non rotto la captazione era presente negli 8 (14%) sintomatici. La presa di contrasto di parete in alcuni dei 42 pazienti con aneurisma asintomatico non rotto è da attribuire alla verosimile instabilità dell'aneurisma visto l'alto valore predittivo positivo per instabilità e rottura.

L'integrazione degli esami di neuroimaging, RMN ed Angiografia hanno inoltre permesso di evidenziare la presenza di anomalie di parete extra-aneurismatiche come infundiboli o tortuosità nel 20,4% dei casi, di morfologia irregolare dell'aneurisma nel 40% e la presenza di bleb nell'aneurisma nel 14,3%.

Nel 16,7% (2) dei pazienti con aneurismi multipli era presente captazione di parete anche nel secondo aneurisma mentre in quelli con più di due aneurismi, i restanti aneurismi non mostravano captazione di parete.

## **Analisi istologica**

Nel gruppo dei 17 pazienti sottoposti a trattamento chirurgico, in 8 casi è stato possibile prelevare un campione del fondo per sottoporlo ad analisi istologica. In un caso, però, alcuni markers non erano valutabili per esiguità del campione raccolto. I risultati ottenuti, pertanto, riguardano per alcuni markers solo 7 campioni.

I markers dei macrofagi CD68 sono stati rilevati in 3 casi su 7. Quantificando la loro densità in una scala crescente da 1 a 3, sono stati rilevati in poca quantità in 2 casi (28,6%) ed in quantità maggiore in 1 caso (14,3%). I campioni istologici privi di CD68 erano 4 (57,1%)(Fig.32).

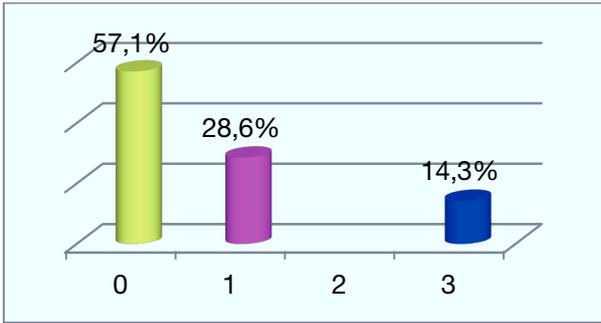


Fig.32 Markers dei macrofagi (CD68) distribuiti per quantità

I markers CD34 sono stati invece analizzati sia nel rivestimento endoteliale che nella parete e sono considerati associati alla presenza di *vasa vasorum*.

I CD34 di parete sono stati classificati in base alla loro presenza (3 casi 42,9%) o assenza (4 casi 57,1%). La loro presenza nel rivestimento endoteliale, invece, è stata catalogata quantitativamente secondo una scala da 0 (assenza) a 3 (abbondanza). I campioni senza cellule con CD34 nel rivestimento endoteliale erano 3 (42,9%), 2 (28,6%) ne avevano poche, 1 (14,3%) in media quantità ed 1(14,3%) in abbondante quantità(Fig.33).

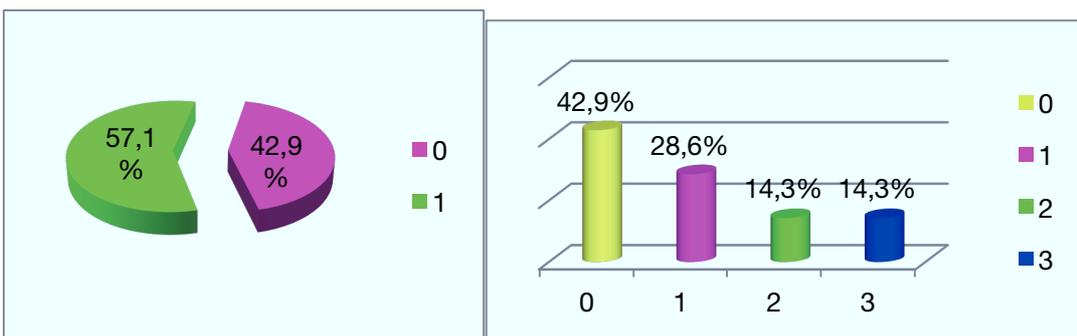


Fig.33 Presenza nella parete e distribuzione quantitativa nel rivestimento endoteliale dei markers CD34 (Vasa Vasorum)

La ricerca di cellule con markers CD31 (PECAM-1 Platelet endothelial cell adhesion molecule), implicati nel processo di neoangiogenesi e pertanto indice di fenomeno infiammatorio ormai conclamato, ha mostrato la loro presenza in 4 casi

(57,1%) e assenza nei restanti 3 (42,9%). Solo in 1 caso (14,3%) è risultata positiva la ricerca del CD31 nella parete mentre nel rivestimento endoteliale era presente in 4 casi (57,1%) e assente negli altri 3 (42,9%). L'analisi quantitativa ha mostrato 2 casi (26,8%) con quantità modesta di CD31, 1 caso con quantità media (14,3%) ed 1 caso (14,3%) con abbondanti cellule CD31+(Fig.34).

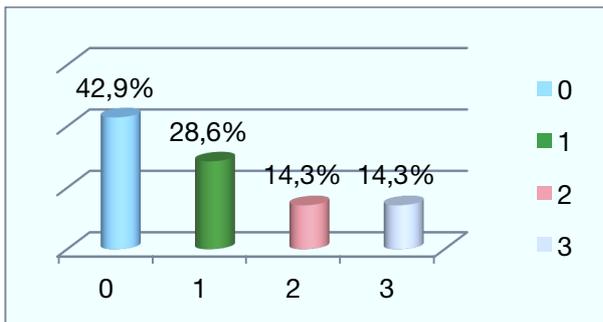


Fig.34 Distribuzione quantitativa dei markers CD31 nel rivestimento endoteliale.

La presenza di cellule CD3+ (T cell receptor) è stata identificata in tutti i campioni esaminati e la loro valutazione quantitativa ha mostrato una distribuzione equivalente (4 casi 50%) nei sottogruppi 1 e 2 (poche-moderate cellule).

Nell'analisi delle cellule CD45+, invece, due campioni sono risultati non valutabili e pertanto l'esame è stato eseguito su 6 campioni. Tutti i campioni sono risultati positive per la presenza di cellule CD45+ e anche la loro distribuzione quantitativa era equivalente (3 casi 50%) per i sottogruppi 1 e 2.

La ricerca di cellule muscolari iperplastiche e disorganizzate (AML) è risultata positiva nei 7 casi esaminati (1 non valutabile) e in 4 casi (57,1%) queste cellule erano diffuse. In 2 casi (28,6%) le cellule avevano una distribuzione focale e nel caso rimanente (14,3%) era parziale(Fig.35).

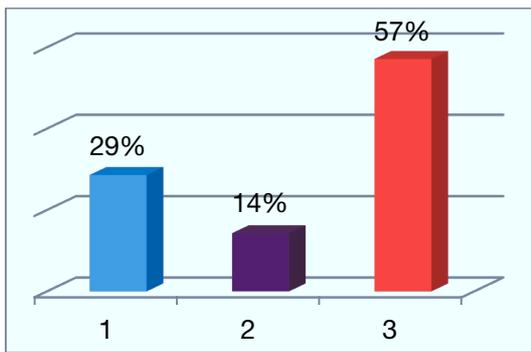


Fig.35 Cellule muscolari lisce (AML) ipertrofiche e disorganizzate (100% dei casi) distribuite in base alla loro presenza nel campione in esame in focale (1), parziale (2) o diffusa (3).

La triptasi, markers dei mastociti, è risultata positiva in 1 caso (12,5%) mentre il marker Ki67, indicatore di proliferazione cellulare, era positivo in 3 casi (37,5%)  
 In sintesi la presenza di cellule infiammatorie e le alterazioni delle cellule muscolari lisce di parete sono state riscontrate in 5 casi (83,3%) su 6(Fig.36).

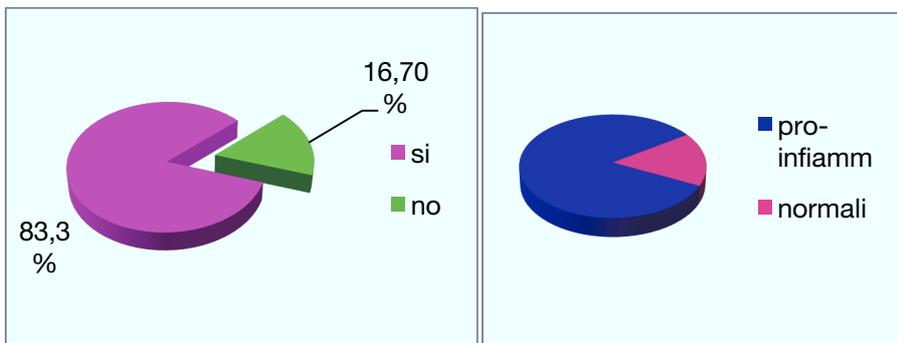


Fig.36 A sin. Diagramma che rappresenta la presenza di cellule infiammatorie. A destra il tipo di cellule muscolari lisce riscontrate

La presenza di cellule di tipo linfocitario si è rilevata in 6 casi (85,7%) su 7 mentre cellule T erano presenti in 7 casi (87,5%) su 8(Fig.37).

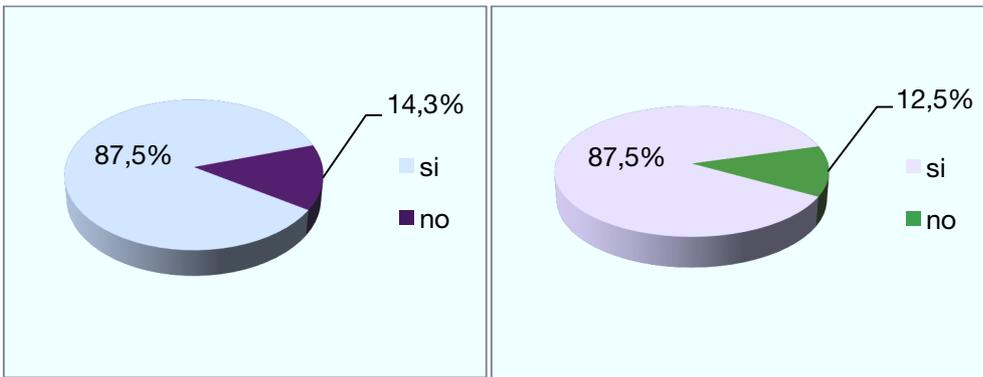


Fig.37 Presenza di cellule di tipo linfocitario (sin) e di cellule T (dx)

Infine è stata ricercata anche la presenza o meno di fenomeni trombotici, distinti in trombi intramurali o intraluminali e la loro presenza si è riscontrata in 4 pazienti (66,7%) su 6 (2 non valutabili)(Fig.38).

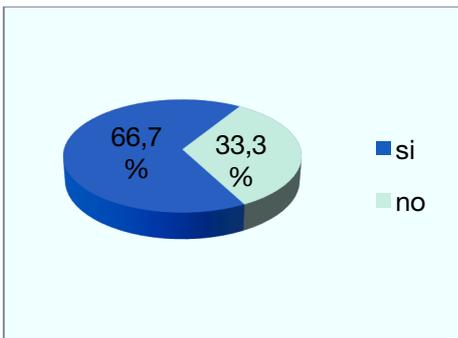


Fig.38 Diagramma con percentuale della presenza o meno di trombi (endoluminali e intramurali) hanno identiche percentuali

## Analisi statistica

### Analisi dei sintomi:

Una correlazione descrittiva delle variabili analizzate in base all'appartenenza ad uno dei tre gruppi analizzati (*asintomatici, sintomatici non rotti, sintomatici rotti*) è mostrata in tabella 2.

Variabili demografiche e caratteristiche aneurismi				
variabili analizzate	Asintomatici non rotti	Sintomatici non rotti	Rotti	p
<b>Numero aneurismi   </b>	1 (1-1)	1 (1-1)	2 (1-3)	<b>0,003</b>
Età †	57,4±10,9	56,6±10,8	58,2±15,2	n.s.
Sesso(femminile)	26 (61,9%)	6 (75%)	5 (71,4%)	n.s.
Fumo	23(54,8%)	3 (37,5%)	3 (42,9%)	n.s.
ESA previa	0	0		n.s.
Dimensioni >7 mm	11 (26,2%)	3 (37,5%)	3 (42,9%)	n.s.
Storia familiare aneurismi	3 (7,1%)	0	3 (5,3%)	n.s.
Varianti anat. Willis	32(76,2%)	6 (75%)	4 (57,1%)	n.s.
Iperensione arteriosa §	16 (38,1%)	4 (50%)	5 (71,4%)	n.s.
Abuso droghe	1 (2,4%)	0	0	n.s.
Abuso alcool	6 (14,6)	0	1 (14,3%)	n.s.
<b>Cefalea sentinella</b>	1 (2,4%)	2 (25%)	2 (28,6%)	<b>0.017</b>
<b>Paralisi nervi cranici</b>	<b>0</b>	<b>3 (37,5%)</b>	<b>1 (14,3%)</b>	<b>0.002</b>
<b>Emiparesi</b>	2 (4,8%)	3 (37,5%)	3 (42,9%)	<b>0.003</b>
<b>Cefalea violenta</b>	2 (4,8%)	0	6 (85,7%)	<b>&lt;0.001</b>
<b>Disturbi visivi</b>	1 (2,4%)	5 (62,5%)	1 (14,3%)	<b>&lt;0.001</b>
<b>Alterazione livello coscienza</b>	0	1 (12,5%)	4 (57,1%)	<b>0.000</b>
Terapia antiaggregante	9 (21,4%)	2 (25%)	0	n.s.
<b>Captazione</b>	14 (33,3%)	4 (50%)	7 (100%)	<b>0.003</b>
Localizzazione Ant	38 (90,5%)	8 (100%)	5 (71,4%)	n.s.
Morfologia irregolare	15 (37,5%)	3 (37,5%)	5 (57,1%)	n.s.
<b>Aneurismi multipli</b>	10 (23,8%)	0	5 (71,4%)	<b>0.006</b>

Nota. - Se non diversamente indicato, i dati sono numeri e i dati tra parentesi sono percentuali.

† I dati sono media ± deviazione standard.

§ Iperensione arteriosa 140 / 90 mm Hg.

|| I dati sono mediane; i dati tra parentesi sono lo scarto interquartile.

Tab 2. Variabili demografiche e caratteristiche aneurismi

Nell'analisi della distribuzione tra sintomatici e asintomatici, i fattori di rischio di rottura presi in considerazione come età, sesso, abitudine tabagica, pregressa emorragia subaracnoidea, storia familiare di aneurismi cerebrali, varianti anatomiche del poligono di Willis, razza, diabete, ipercolesterolemia, dislipidemia, abuso di alcool e droghe, pregresso ictus e la presenza di bleb e anomalie nella parete non sono risultati statisticamente influenti.

Gli aneurismi rotti erano localizzati prevalentemente nelle arterie comunicante

anteriore e comunicante posteriore mentre quelli non rotti e asintomatici erano prevalentemente localizzati nell'arteria carotide interna. Una correlazione positiva è stata rilevata tra ipertensione arteriosa ed aneurismi rotti mentre statisticamente significativa ( $p=0.006$ ) si è mostrata la rottura in pazienti con aneurismi multipli. La cefalea sentinella era lamentata con tendenza maggiore dai pazienti sintomatici.

I pazienti con aneurisma non rotto più frequentemente assumevano terapia antiaggregante al contrario di quelli con aneurisma rotto. Gli aneurismi sintomatici e rotti hanno una tendenza a presentare maggiore irregolarità di parete.

L'analisi della paralisi dei nervi cranici in pazienti sintomatici rispetto ai non sintomatici ha mostrato un valore statisticamente significativo di positività ( $p=0.002$ ) così come la presenza di emiparesi ( $p=0.003$ ). I pazienti con disturbi visivi erano portatori di aneurismi non rotti ma sintomatici ( $p=0.000$ ).

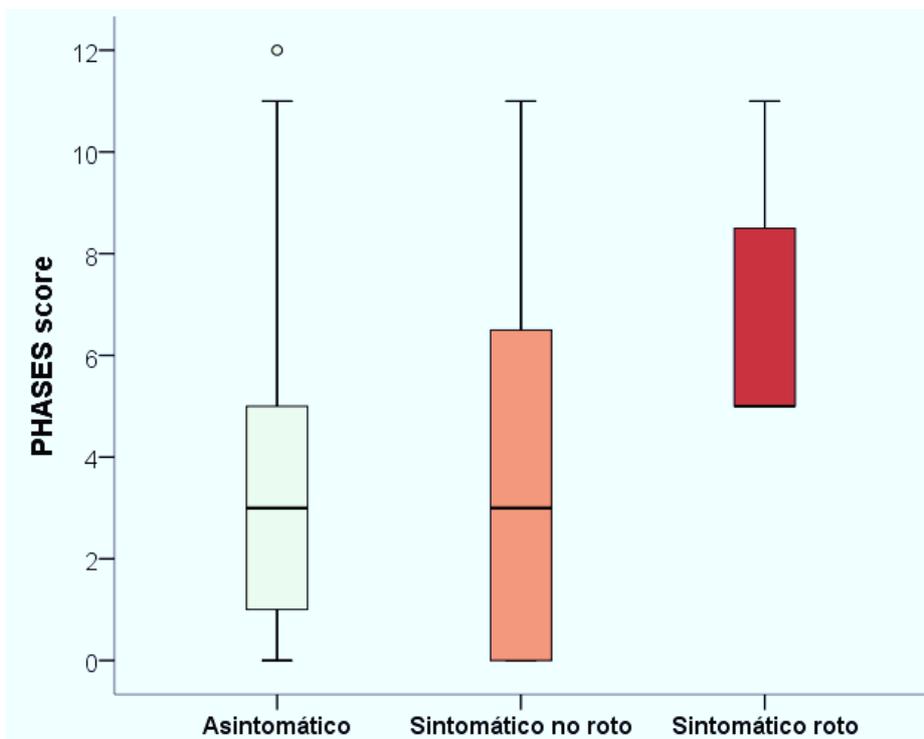


Figura 39: box-plot di correlazione tra sintomatologia e scala PHASES

## Analisi della captazione:

L'analisi della relazione tra la captazione di parete nei tre gruppi di pazienti studiati ha mostrato come la captazione di contrasto fosse significativamente presente nel 100% degli aneurismi rotti; nei pazienti sintomatici la captazione era presente nel 50% dei casi mentre tra gli asintomatici nel 33% ( $p=0.003$ ) (Fig.40,41).

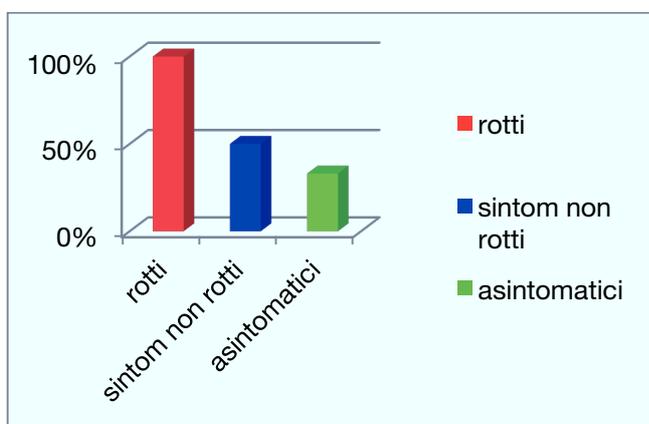


Fig. 40 Percentuale di pazienti con captazione di contrasto nella parete

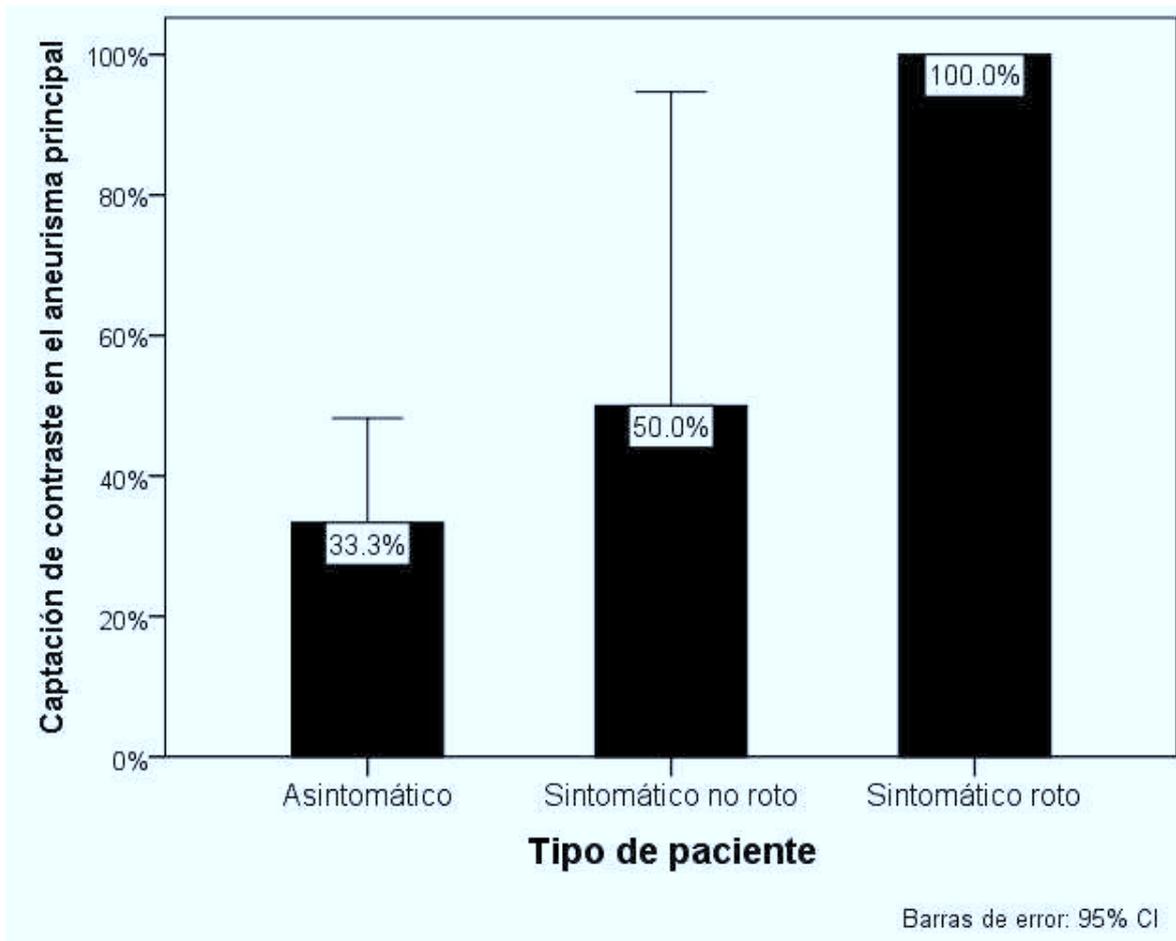


Fig.41 Correlazione tra la captazione di parete e sottogruppi di pazienti (p=0.003)

La correlazione completa tra la captazione di parete e le variabili prese in esame è riportata in tabella 3.

Una correlazione statisticamente significativa è risultata esserci in caso di ipertensione arteriosa (p=0.002), nei pazienti con aneurisma rotto (p=0.003), in relazione alle dimensioni (p=0.0001), nei pazienti con varianti anatomiche del poligono di Willis (p=0.038) e morfologia irregolare dell'aneurisma (p=0.015).

variabili analizzate	Captazione		p
	SI	NO	
Età	<70aa 19 (76%) e >70aa 6 (24%)	<70aa 30 (93,8%) e >70aa 2 (6,3%)	n.s.
Sesso femminile	13 (52%)	24 (75%)	0.071
Fumo	13 (52%)	16 (50%)	n.s.
<b>ESA acuta</b>	7(28%)	0	<b>0.002</b>
<b>Dimensioni &lt;7 mm</b>	11 (44%)	29 (90,6%)	<b>&lt; 0.001</b>
Storia familiare aneurismi positiva	0	2 (100%)	n.s.
<b>Varianti anat. Willis presenti</b>	10 (40%)	5 (15,6%)	<b>0.038</b>
Ipertensione arteriosa	12 (48%)	13 (40,6%)	n.s.
Abuso droghe	1 (4%)	0	n.s.
Abuso alcool	5 (20,8%)	2 (6,3%)	n.s.
Localizzazione anter.	20 (80%)	31 (96,9%)	n.s.
<b>Morfologia irregolare</b>	14 (58,3%)	8 (25,8%)	<b>0.015</b>
Aneurismi multipli positivi	8 (32%)	7 (21,9%)	n.s.
Bleb	6 (24%)	2 (6,5%)	n.s.
Numero di aneurismi	1(1-2)	1(1-1)	n.s.
Cefalea sentinella	3 (12%)	2 (40%)	n.s.
<b>Paralisi nervi cranici</b>	<b>3 (12%)</b>	<b>1 (3,1%)</b>	n.s.
Emiparesi	5 (20%)	3 (9,4%)	n.s.
Cefalea violenta	6 (25%)	2 (6,3%)	0.063
Disturbi visivi	4 (16%)	3 (9,4%)	n.s.
<b>Alterazione livello coscienza</b>	5 (20%)	0	<b>0.013</b>
Terapia antiaggregante	5 (20%)	6 (18,8%)	n.s.
ESA previa	2 (50%)	2 (50%)	n.s.

Nota. - Se non diversamente indicato, i dati sono numeri e i dati tra parentesi sono percentuali.

|| I dati sono mediane; i dati tra parentesi sono lo scarto interquartile.

Tab.3: correlazione tra captazione di parete e variabili prese in esame

Anche un'elevazione dello score PHASES ha mostrato una correlazione statistica con la captazione. E' stata individuata una linea di taglio di circa 4 al di sopra della quale la maggior parte degli aneurismi comincia a captare ( $p < 0.001$ )(Fig.42, 43 a-b)

Interessante notare, altresí, come il sesso maschile abbia una tendenza positiva ( $p = 0.096$ ) rispetto al femminile che però presenta una maggiore incidenza di aneurismi.

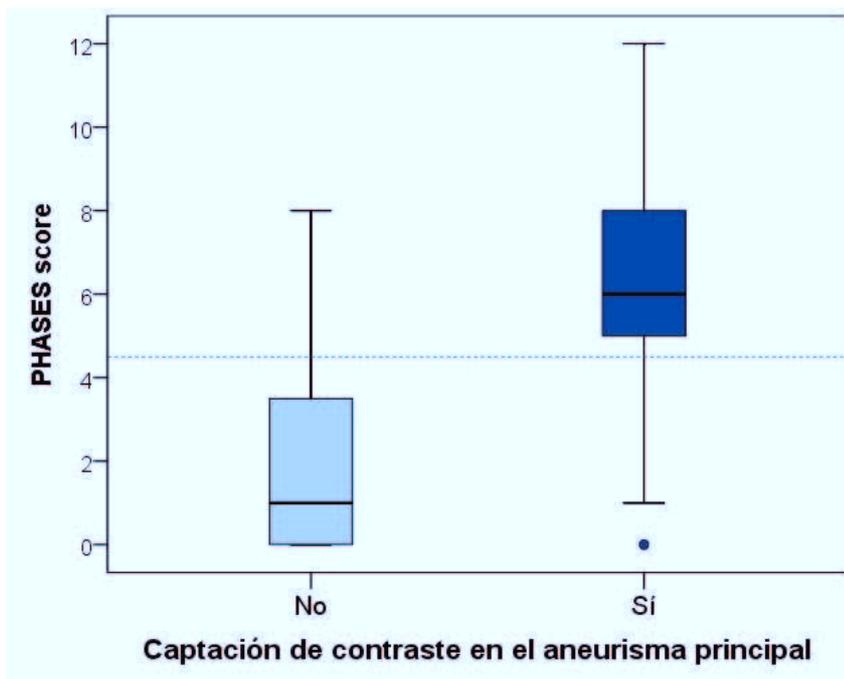


Fig.42: Box-plot tra captazione e score PHASES con linea di taglio ottimale di 4 punti. PHASES > 4: 82,6% Captanti ; PHASES <= 4: 17,6% Captanti (P <0,001 )

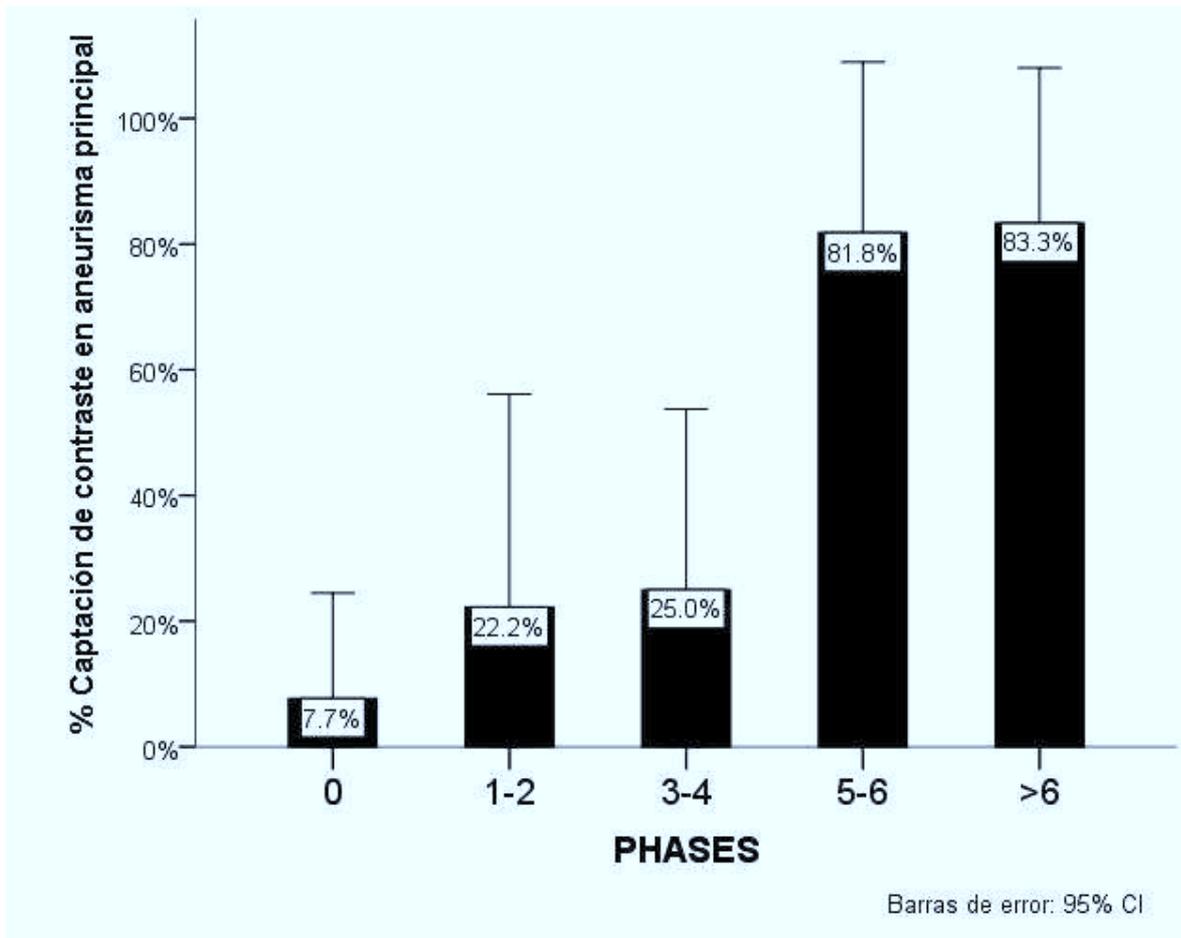


Fig 43a: grafico a barre della percentuale di captazione in relazione allo score PHASES

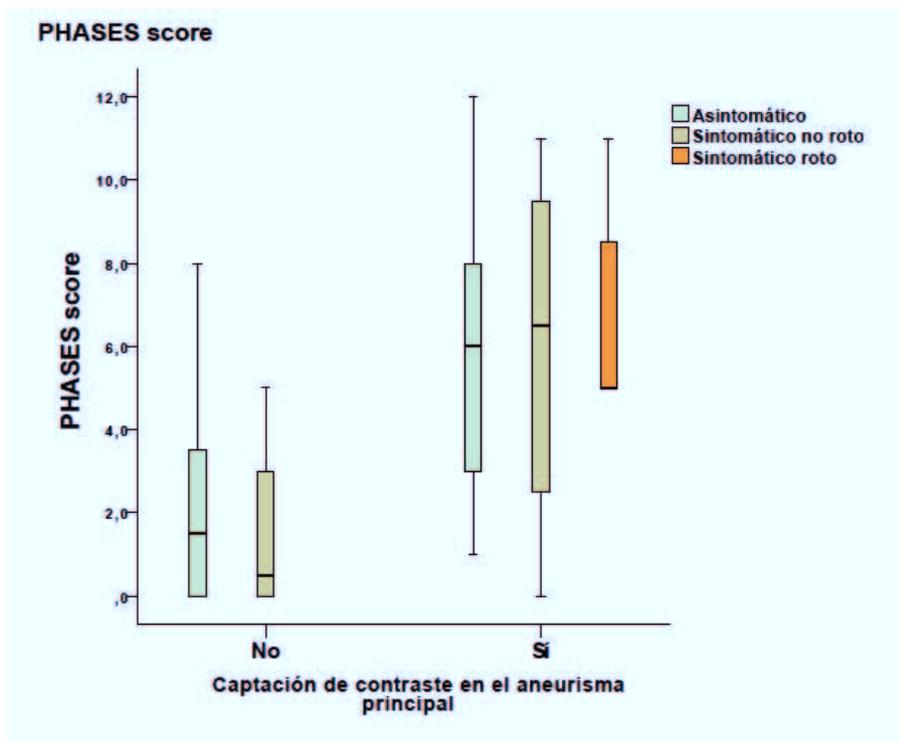


Fig.43b: Correlazione tra captazione e score PHASES in relazione al tipo di paziente.

### Regressione logistica:

L'analisi di regressione logistica ha dimostrato che sono predittori indipendenti di rottura:

- la captazione ( $p=0.018$ ) (Tab.4)
- la presenza di aneurismi multipli ( $p=0.016$ ) (Tab.2, Fig.44)

Predittori indipendenti di captazione dell'aneurisma:

- le dimensioni dell'aneurisma ( $p=0.001$ ), (Fig.45, 46 a-b),
- la presenza di variabili anatomiche del circolo di Willis ( $p=0.005$ ), (Fig.47 a-b)
- la morfologia irregolare dell'aneurisma ( $p=0.016$ ), (Fig.48 a-b).

Dal grafico in fig.46b si può, inoltre notare come anche in pazienti con aneurismi di piccole dimensioni (<7 mm) fosse presente captazione in caso di rottura.

Variable	Captazione			Aneurisma Rotto		
	Univariate p-value	Multivariate Analysis		Univariate p-value	Multivariate Analysis	
		OR (CI 95%)	p-value		OR (CI 95%)	p-value
<b>Captazione</b>	--	--	--	<b>0.002</b>	<b>15.0 (1.6-142.7)</b>	<b>0.018</b>
Dimensioni >7 mm	<0.001	61.5 (5.4-704.1)	0.001	0.415	--	--
Varianti anatomiche del poligono di Willis	0.038	28.9 (2.8-296.0)	0.005	0.365	--	--
Morfologia irregolare	0.015	14.8 (1.6-132.9)	0.016	0.419	--	--
<b>Aneurismi múltipli</b>	0.389	--	--	<b>0.011</b>	<b>8.1 (1.5-44.8)</b>	<b>0.016</b>

Tab.4: Analisi di regressione logistica per i fattori associati con captazione o rottura dell'aneurisma

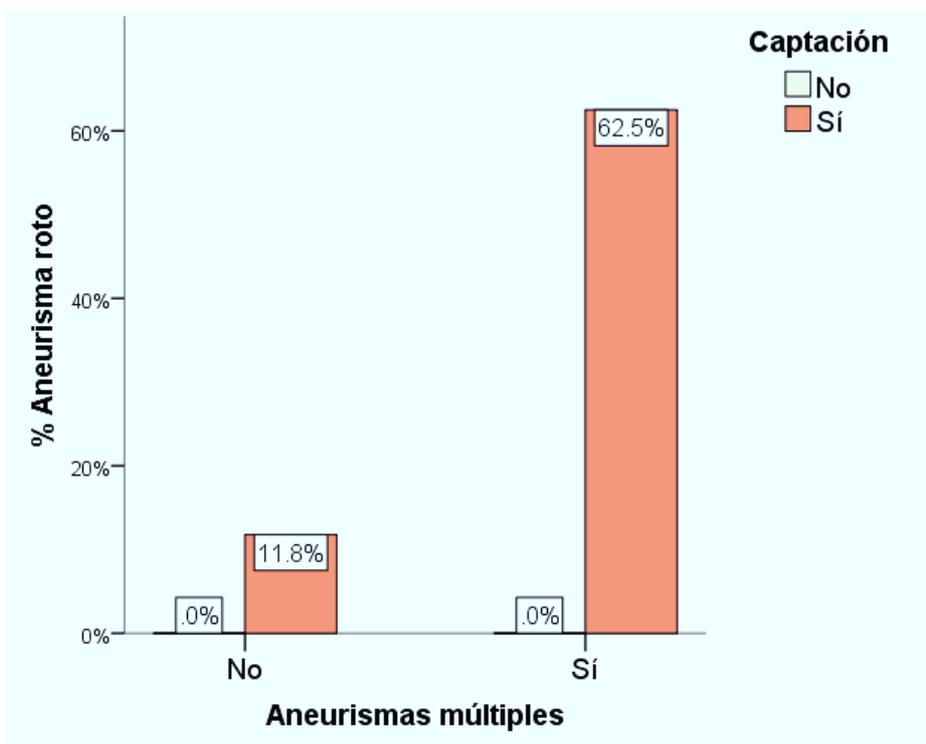


Fig.44: Correlazione tra percentuale di rottura e presenza di aneurismi multipli p=0.016

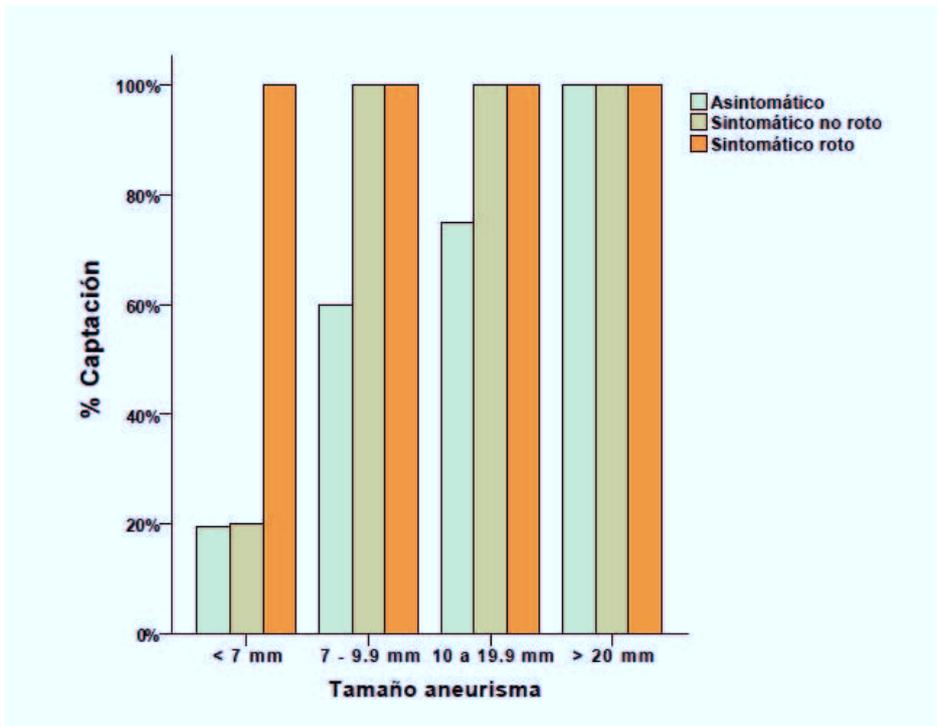


Fig.45 Correlazione tra percentuale di captazione e dimensioni dell'aneurisma in base ai sintomi presentati.

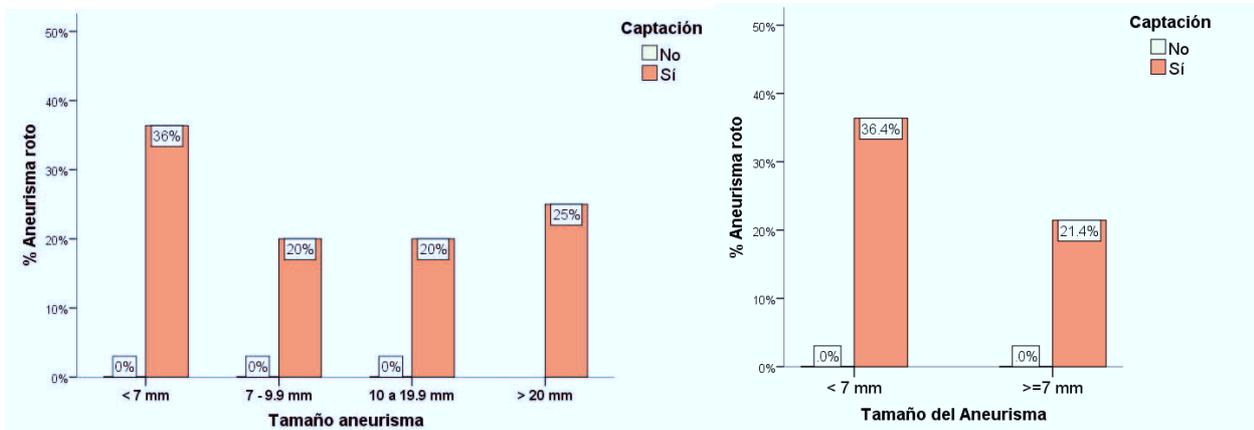


Fig..46 a-b: Correlazione tra percentuale di captazione e dimensioni dell'aneurisma categorizzate (p=0.0001) Si osserva come la captazione sia importante per qualsiasi dimensione, specialmente negli aneurismi di piccole dimensioni.

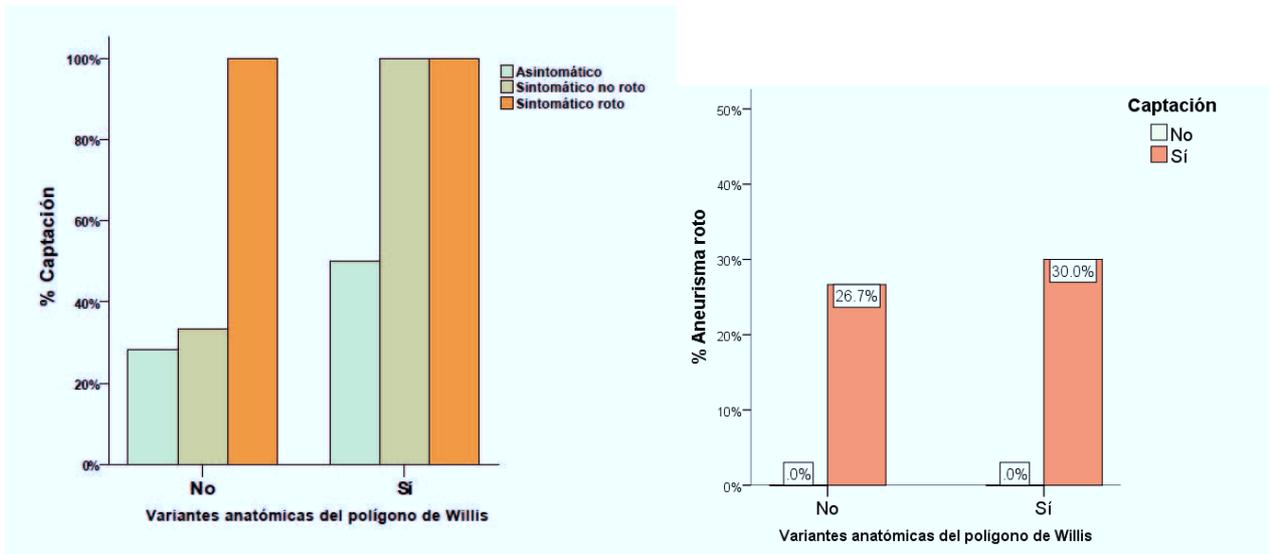


Fig.47 a-b: Correlazione tra percentuale di captazione e presenza di varianti anatomiche del poligono di Willis, anche in base ai sintomi presentati (p=0.005)

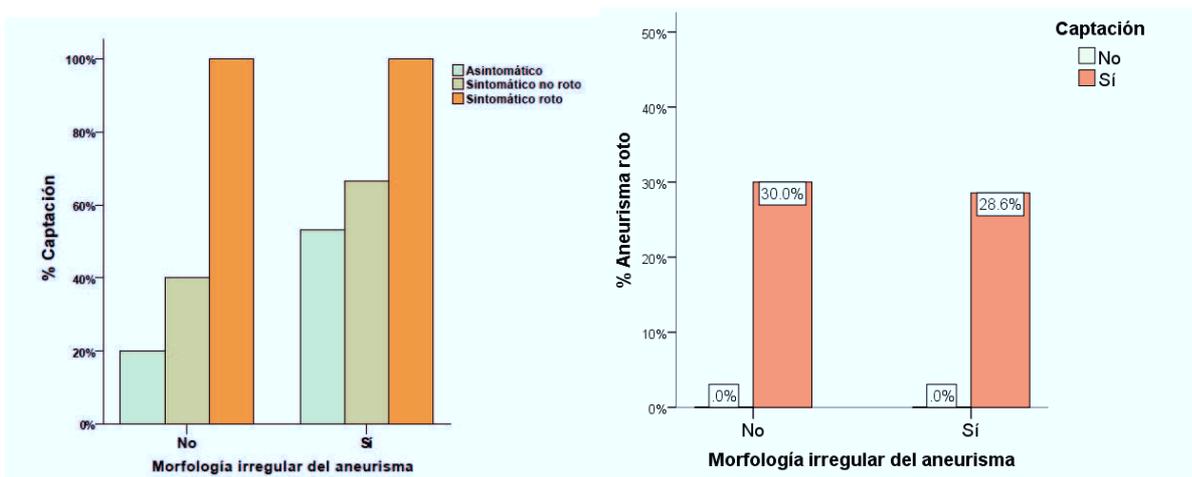


Fig.48 a-b: Correlazione tra percentuale di captazione e morfologia dell'aneurisma (p=0.015)

L'analisi di sensibilità e specificità della captazione come predittore di rottura ha dimostrato (p=0.002):

**-Sensibilità: 100%**

**-Specificità: 64%**

**-VP positivo: 28%**

**-VP negativo: 100%**

## Analisi dei markers ematici:

Lo studio dei vari markers d'inflammation non ha portato ad evidenziare differenze significative nei vari gruppi di pazienti, in relazione alla captazione.

Come illustrato nei grafici, sembra esistere una tendenza ad una maggiore presenza di IL-1beta ed MMP-9 negli aneurismi rotti ma il dato non è supportato statisticamente.

Pertanto, non sembra possibile, a differenza di altre patologie sistemiche, allo stato attuale poter individuare dei marcatori d'inflammation periferica che siano indicativi di una probabile inflammation di parete ed, indirettamente, del rischio di rottura (Fig.49,50).

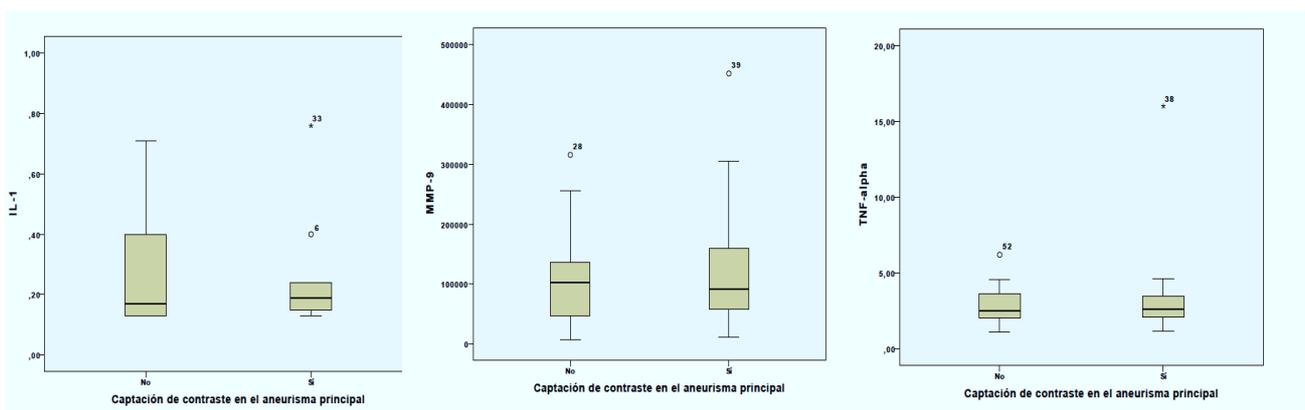


Fig.49 Distribuzione dei markers ematici in relazione alla captazione

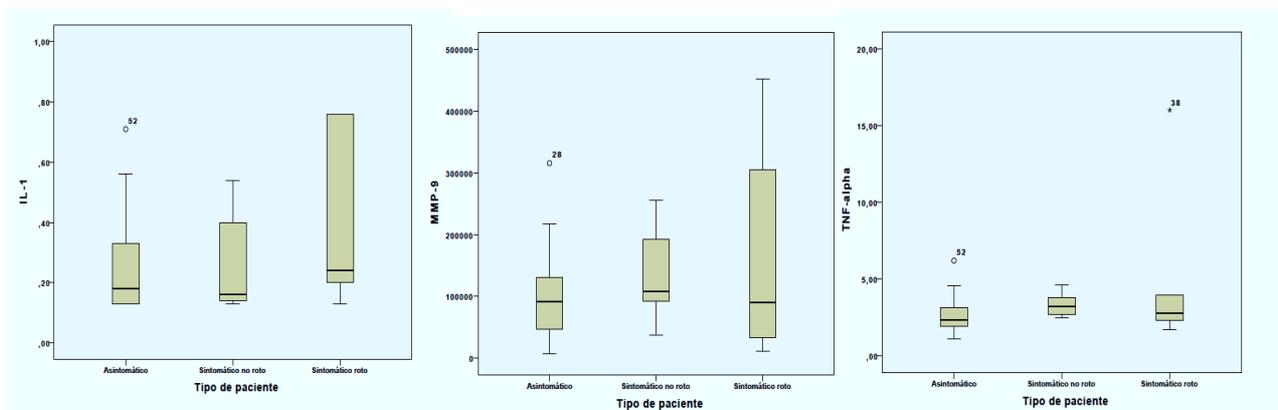


Fig.50 Distribuzione dei markers nei distinti gruppi di pazienti

## Analisi dello studio istologico ed immunohistochimico:

Lo studio è stato eseguito su un totale di 8 pazienti, 7 con aneurisma non rotto e 1 rotto. L'analisi dei dati ottenuti ha mostrato, sui risultati istologici, la tendenza degli aneurismi con captazione di contrasto nella parete alla RMN ad avere positività nella presenza dei markers CD3 e CD45. I markers CD34 e CD31, indici di alterazione della parete endoteliale, erano più alti negli aneurismi captanti il contrasto, dimostrando così un danno endoteliale (endothelium leak). In particolare entrambi erano presenti maggiormente nel rivestimento endoteliale invece che nella parete, con un lieve maggiore rappresentanza dei CD31 rispetto ai CD34.

Anche la presenza di alterazioni delle cellule muscolari lisce (AML) era più alta negli aneurismi captanti.

L'analisi del CD 68 non ha mostrato una distribuzione preferenziale nei sottogruppi, a differenza di quanto evidenziato negli studi di Frösen. Questo fatto potrebbe essere dovuto alla minore casistica o alla differente tecnica utilizzata per la valutazione quantitativa del marcatore.

I markers CD3 e CD34 (linfociti T e vasa vasorum) sono tendenzialmente più alti nei pazienti captanti ( $p=0.061$  e  $p=0.083$ ), pur non raggiungendo la significatività statistica per lo scarso campione (Fig.52). Un alto valore predittivo positivo hanno mostrato il Ki67 e le triptasi (100% in entrambi), dato che necessita conferma in campioni più ampi (Fig.53).

Data la disponibilità di un campione ristretto di studi istologici, è stata generata una scala cumulativa dei sette markers d'infiammazione presi in analisi nell'indagine immunohistochimica, al fine di ottenere un indice complessivo del grado di infiammazione di parete dell'aneurisma.

Come dimostrato in fig.51, esisteva una correlazione diretta tra il numero di

marcatori d'inflammatione alterati e la presenza di captazione di parete con un cut-off di circa 7.

Pazienti con un indice al di sotto del 7 non mostravano captazione mentre tutti i pazienti con un indice superiore mostravano captazione alla RM ( $p=0.043$ ).

Un punteggio superiore a 7, offre un 100% di sensibilità, specificità, VPP e VPN in relazione alla presenza di captazione aneurismatica.

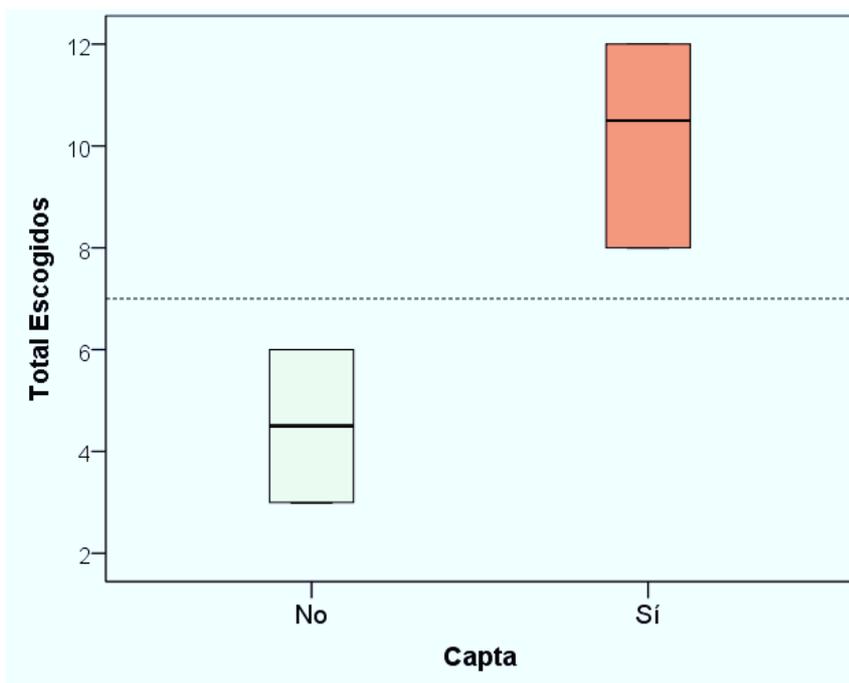


Fig.51: Correlazione tra captazione e indice cumulativo di inflammatione di parete (CD3+CD45+CD34endot+CD31endot+AML+triptasa+Ki67)  $p=0.043$ . Un punteggio superiore a 7 offre un 100% di sensibilità, specificità, VPP e VPN in relazione alla presenza di captazione aneurismatica.

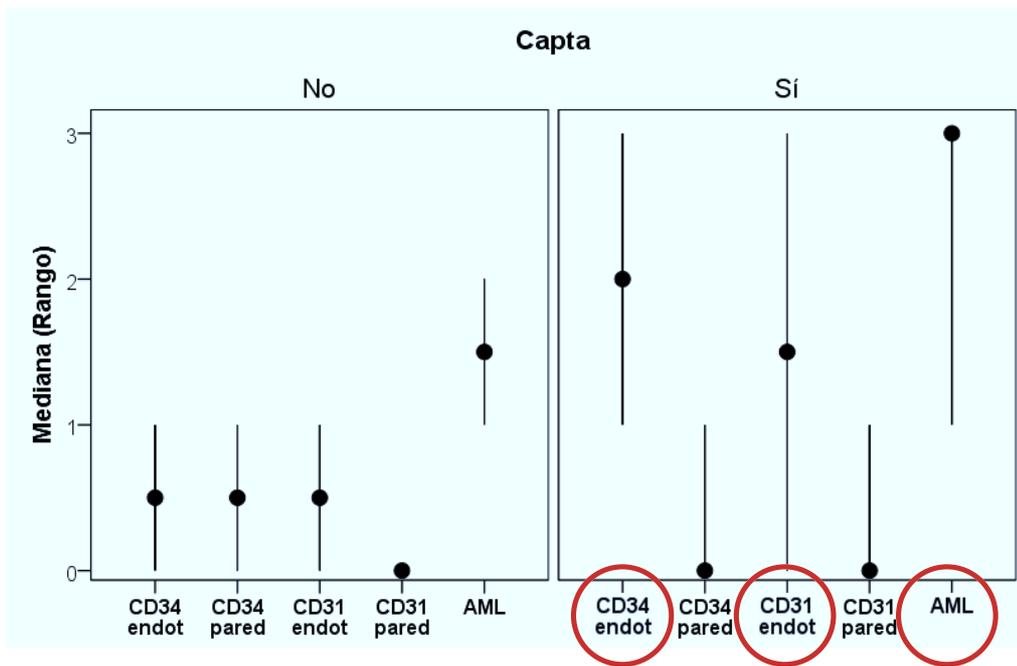
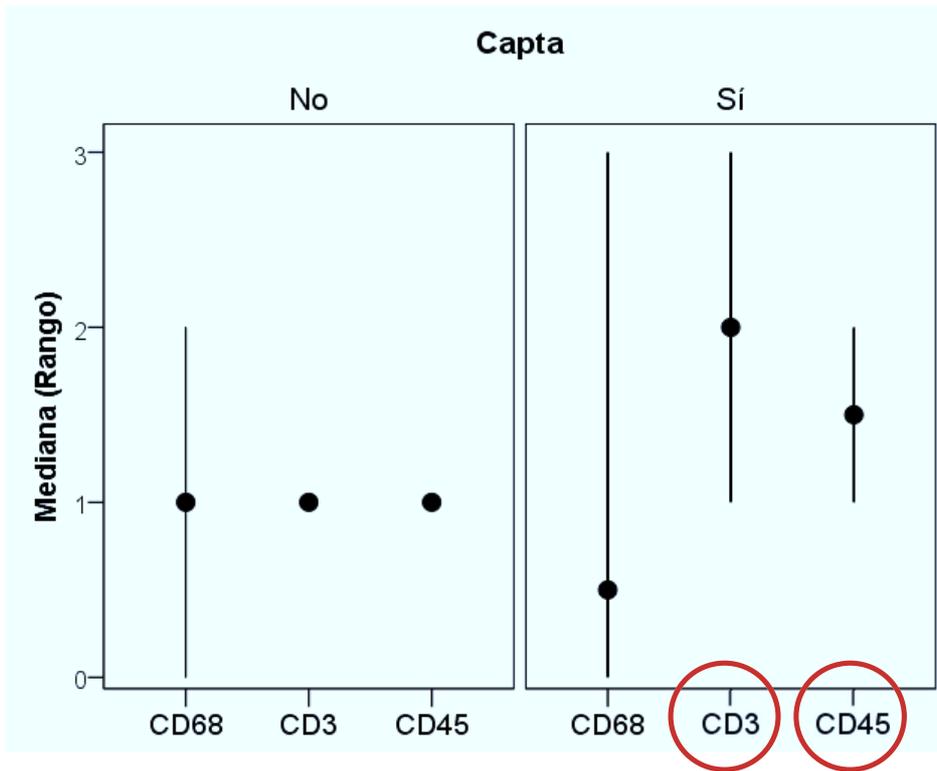


Fig.52: Error bars tra captazione e markers immunoistochimici

Confronto in pazienti captanti e non captanti sulla presenza di marcatori infiammatori, suddivisi anche in base alla localizzazione in parete o in endotelio. Tendenze, ancora non significative, sono state evidenziate per la presenza di CD45 (0,237), CD3 ( $p=0,061$ ), CD31, CD34 e cellule muscolari lisce.

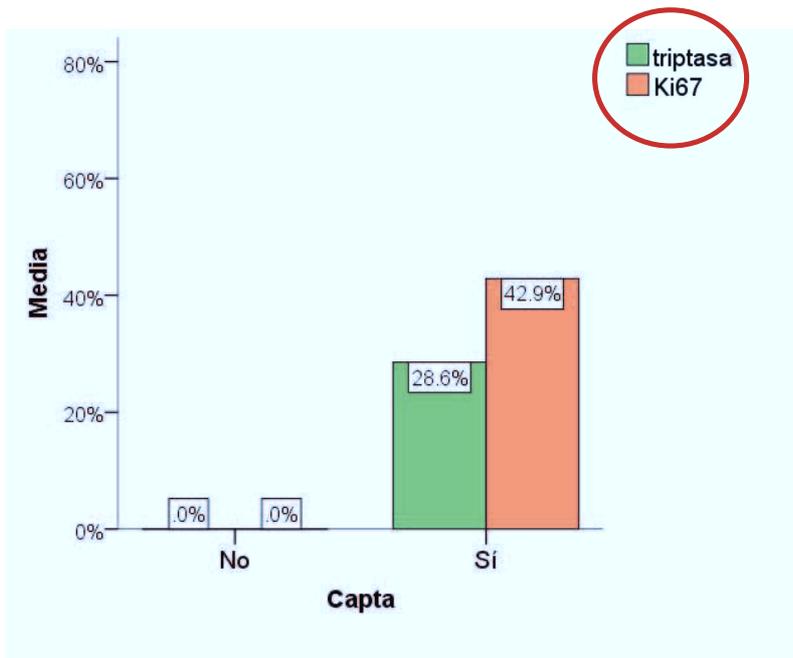


Fig.53: Bar-plot tra captazione e markers Ki67 e triptasi  
Alto valore predittivo positivo di triptasi e Ki 67 nei pazienti captanti

# Case Report

Si riportano, a continuazione, due casi esemplificativi di studi neuroradiologici ed istologici effettuati su pazienti con aneurismi rotti e non rotti.

Il primo caso riguarda una donna di 47 anni, senza dati anamnestici di rilievo, ricoverata in urgenza in Pronto Soccorso per la comparsa di temporanea perdita di coscienza ed emiparesi sinistra. All'ammissione in Ospedale l'esame neurologico della paziente era nella norma. Uno studio TC cerebrale senza mezzo di contrasto mostrava la presenza di un'emorragia subaracnoidea classificata di grado III secondo la scala di Fisher (emorragia subaracnoidea delle cisterne basali estesa ai solchi corticali dei lobi temporale e parietale ed alla scissura silviana con spessore superiore a 2 mm). Il successivo studio angiografico ha mostrato la presenza di aneurismi multipli localizzati alla biforcazione dell'arteria cerebrale media ed all'arteria comunicante anteriore. Si evidenziava un aneurisma sacculare al segmento M1 dell'arteria cerebrale media di destra con dubbia immagine alla biforcazione A1-A2 destra(Fig.54). I principali vasi del poligono di Willis e del sistema vertebro-basilare mantenevano una fisiologica permeabilità.

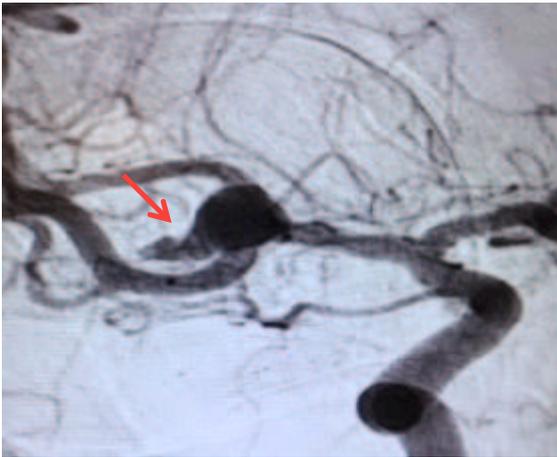


Fig.54 : Angiografia di aneurisma rotto della arteria cerebrale media con morfologia irregolare e presenza di bleb.

E' stato quindi eseguito uno studio RMN di parete vasale ad alta risoluzione che ha mostrato una captazione di mezzo di contrasto nella parete posterolaterale e nel bleb dell'aneurisma della biforcazione dell'arteria cerebrale media di destra, indice di modificazione di tipo infiammatorio. La parete dell'aneurisma sacculare dell'arteria comunicante anteriore non captava mezzo di contrasto(Fig.55,56).

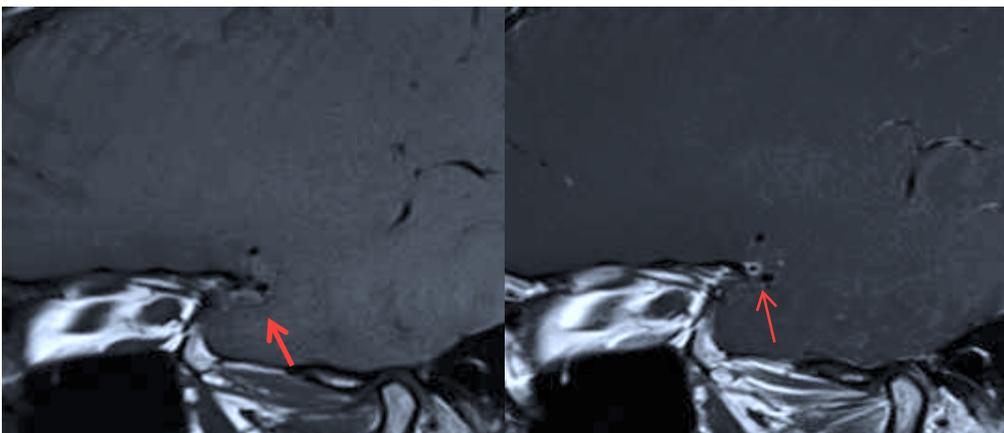


Fig55. RMN. Le frecce indicano la presa di contrasto nella parete dell'aneurisma della biforcazione dell'arteria cerebrale media di destra

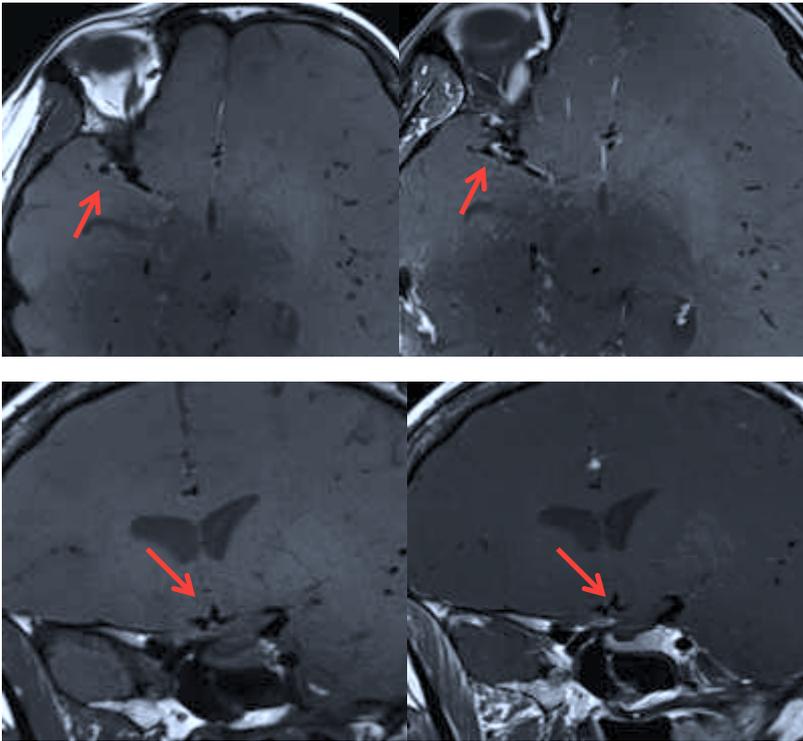


Fig56. Presa di contrasto nella parete dell'aneurisma della biforcazione dell'arteria cerebrale media di destra ed assenza di contrasto nella parete dell'aneurisma dell'arteria comunicante anteriore.

La paziente è stata successivamente sottoposta a trattamento chirurgico e, il campione di fondo dell'aneurisma ottenuto dopo clipping, è stato inviato per esame istologico (Fig.57).

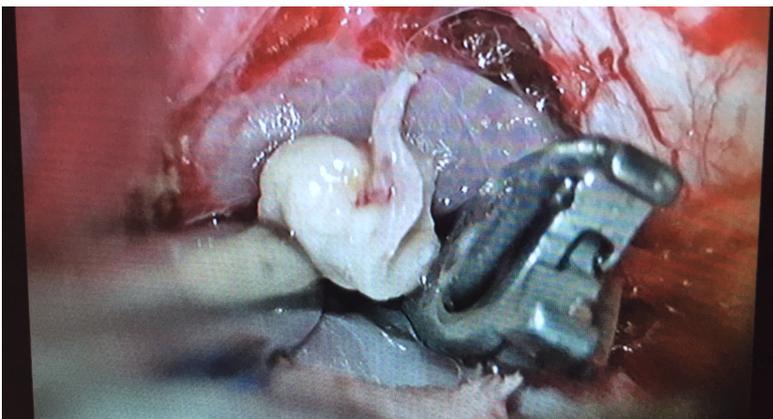


Fig.57: clipping dell'aneurisma dell'ACM

Lo studio istologico ha mostrato nella parete dell'aneurisma rotto una modificazione mixoide di tipo degenerativo, con infiltrazione di polimorfonucleati e mastociti (Fig.58,59,60).

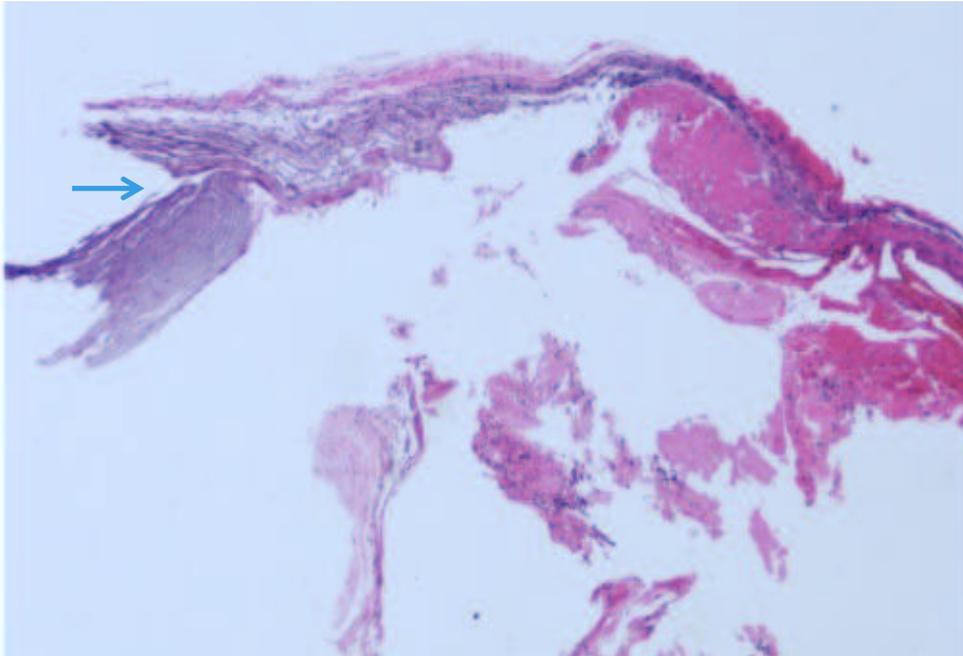


Fig.58: Studio istologico della parete dell'aneurisma. La freccia indica la degenerazione di tipo mixoide

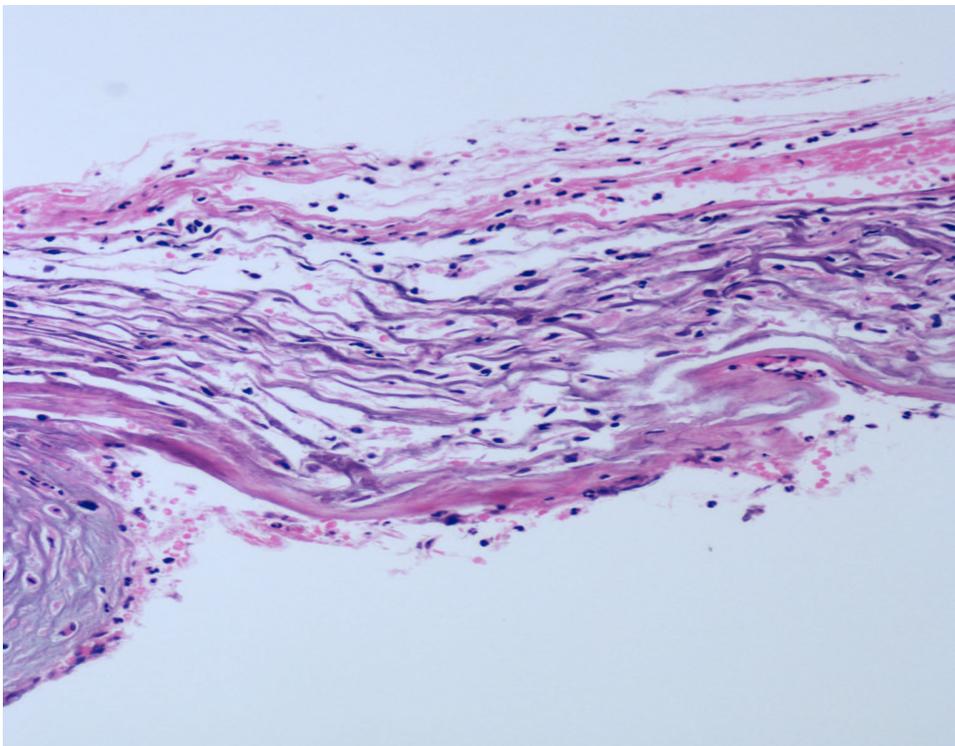


Fig.59: Studio istologico della parete dell'aneurisma con evidenza di infiltrato di cellule polimorfonucleate

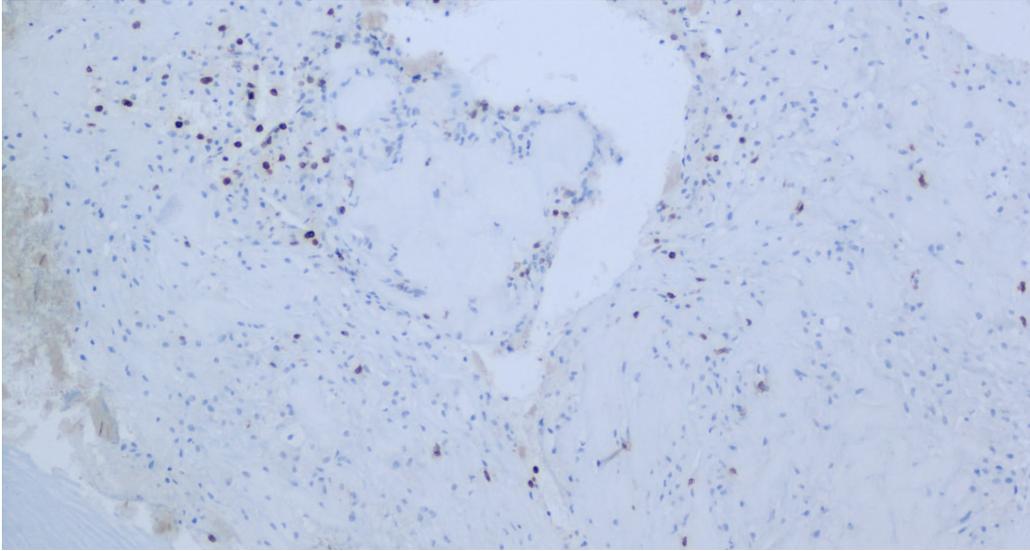


Fig.60 Studio istologico della parete dell'aneurisma che mostra l'infiltrazione di linfociti T

Successivamente, è stato preso in esame il caso di un paziente maschio di 77 anni, fumatore abituale, iperteso e con broncopneumopatia cronica ostruttiva. Il paziente era ricoverato per un'ischemia dell'arteria cerebrale media di sinistra con residua disfasia ed emiparesi destra. Durante una RMN encefalo eseguita per lo stroke, è stata evidenziata una dilatazione aneurismatica. Il paziente non riferiva sintomi acuti correlati all'aneurisma. Uno studio angiografico ha confermato la presenza di un aneurisma sacculare dell'arteria comunicante anteriore di 4 mm di diametro, bilobato. Erano infatti presenti due lobature di 2 mm nel fondo dell'aneurisma orientate anteriormente e superiormente. Lo studio di RMN di parete ad ampio campo ha mostrato un aneurisma della arteria comunicante anteriore parzialmente trombizzato nella parete destra e senza modificazioni di segnale di carattere infiammatorio(Fig.61).

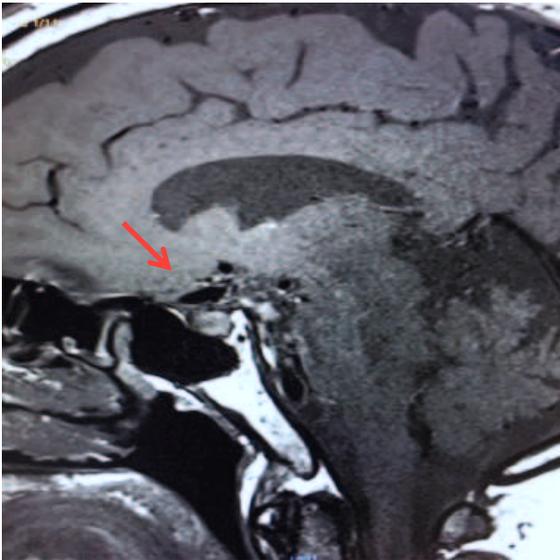


Fig 61: RMN di parete: nessuna presa di contrasto nella parete dell'aneurisma dell'arteria comunicante anteriore

Lo studio di parete in questo caso ha mostrato una diffusa infiltrazione di macrofagi con depositi di colesterolo lungo la parete e conseguente iperplasia della parete(Fig.62,63,64).

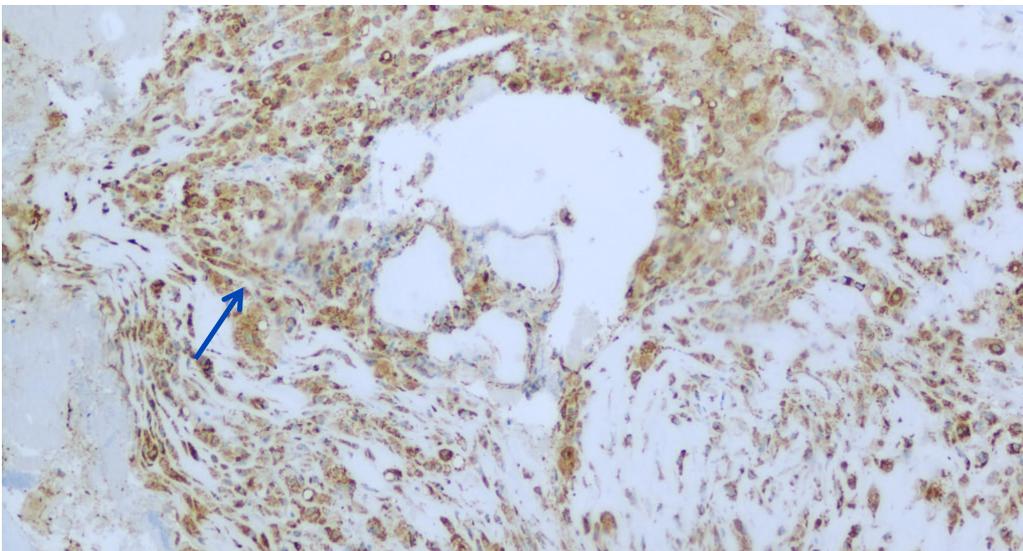


Fig.62: Studio istologico della parete di un aneurisma non rotto captante il mezzo di contrasto. Infiltrato di macrofagi

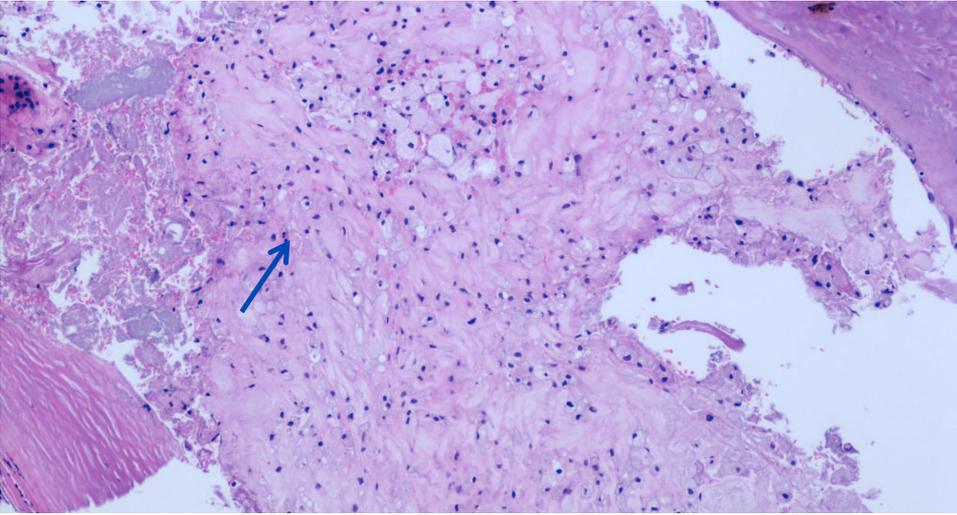


Fig.63 Studio istologico della parete di un aneurisma non rotto captante il mezzo di contrasto. Infiltrato di macrofagi

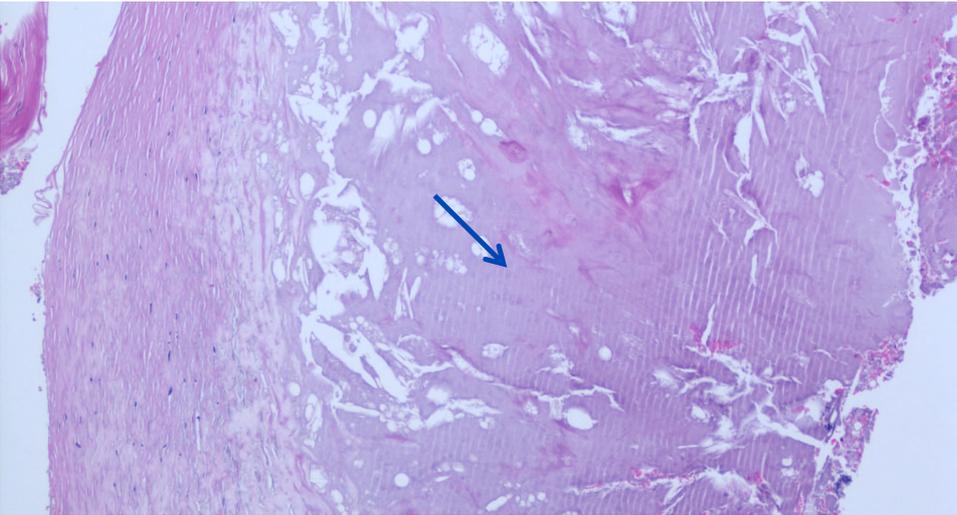


Fig.64 Studio istologico della parete di un aneurisma non rotto captante il mezzo di contrasto. Depositi di colesterolo nella parete dell'arteria

# Discussione

Con l'aumentare del numero dei riscontri occasionali di aneurisma intracranico non rotto nella popolazione generale, la necessità di disporre di una valutazione del rischio di rottura è cresciuta progressivamente: diversi parametri, soprattutto anatomico-radiologici, sono stati introdotti nella pratica clinica (ad esempio dimensione e morfologia dell'aneurisma).

Per la valutazione dei pazienti con aneurisma cerebrale esistono scale di punteggio che includono parametri sia clinici sia radiologici. Recentemente, sono stati proposti diversi modelli di predizione di rottura: tra questi lo score PHASES è sicuramente il più utilizzato nella pratica clinica e negli studi di letteratura<sup>(5)</sup>. In questo score, pubblicato sul Lancet Neurology nel 2014, viene assegnato un determinato punteggio in base ad alcuni fattori di rischio (razza, età, ipertensione arteriosa, pregressa emorragia, dimensione e sede dell'aneurisma) ed ogni punteggio è correlato ad una percentuale di rottura ottenuta incrociando i dati di 6 studi prospettici su coorti di larga scala. Questa scala sembra offrire una buona valutazione del rischio di rottura: il limite è che il rischio assegnato al paziente è basato esclusivamente su fattori di rischio generali e non attraverso l'utilizzo di parametri personalizzati su ogni paziente.

Allo stesso modo, valutazioni basate sull'imaging hanno identificato molte caratteristiche morfologiche e di flusso che possono associarsi ad alto rischio di rottura, ma nessuna, da sola, ha la capacità di predire in maniera affidabile un elevato rischio di rottura. Nella pratica clinica vengono utilizzate caratteristiche anatomiche, come le dimensioni o la presenza di un bleb, come possibili parametri per identificare il rischio di rottura. Infatti, studi più raffinati e recenti di imaging, che includono complesse misure geometriche o studi di flusso,

necessitano di software specializzati non sempre accessibili in tutti i centri.

L'enhancement di parete degli aneurismi intracranici alla RMN ad alta risoluzione è un segno di rottura?

Per rispondere a questa domanda è stata analizzata una casistica prospettica consecutiva di 57 pazienti (78 aneurismi), prendendo in considerazione la captazione di parete in base alle sue correlazioni cliniche, anatomiche, istopatologiche e di markers infiammatori ematici.

La casistica si è rivelata omogenea in quanto a dati di letteratura, con una maggiore prevalenza nel sesso femminile, un quarto di pazienti portatori di aneurismi multipli, la maggiore localizzazione degli aneurismi rotti nelle arterie comunicanti, la maggiore probabilità di rottura nei pazienti portatori di aneurismi multipli.

E' stato possibile dimostrare la significativa presenza di captazione di parete nella totalità degli aneurismi rotti, nella metà dei pazienti sintomatici e solo in un terzo dei pazienti asintomatici. Questo dato, di forte rilievo statistico nella nostra popolazione, era già emerso, anche se non in forma così evidente, nell'analisi recentemente pubblicata da Edjlali sulla captazione circonferenziale e permette non solo di confermare i dati della letteratura precedente ma di aggiungere, come nota di rilievo, che i pazienti sintomatici sarebbero pazienti più "a rischio", in quanto hanno probabilmente in corso cambiamenti infiammatori che potrebbero portare ad un "remodelling" di parete o, nel caso peggiore, alla rottura dell'aneurisma stesso.

Nell'analisi delle caratteristiche cliniche, inoltre, alcuni sintomi, come la paralisi dei nervi cranici, l'emiparesi, i disturbi visivi, le alterazioni dello stato di coscienza e la cefalea violenta, presentavano una correlazione significativa con il rischio di rottura. Nei pazienti con aneurisma non rotto, questa correlazione starebbe ad indicare una "instabilità" dell'aneurisma.

Pur non raggiungendo la significatività statistica, molti aneurismi rotti erano di piccole dimensioni e c'era una tendenza ad una maggiore presenza di ipertensione e di morfologia irregolare nei pazienti a rischio di rottura.

Il riscontro che tutti i pazienti con aneurisma rotto non fossero in terapia antiaggregante, conferma, anche nella presente casistica, l'ipotesi di letteratura di un'azione protettiva esercitata da tale terapia nella rottura di un aneurisma.

Nell'analisi effettuata in relazione alla captazione di contrasto nella parete, una correlazione significativa si è evidenziata con la presenza di emorragia subaracnoidea, con le dimensioni dell'aneurisma, con la presenza di varianti anatomiche del poligono di Willis, la morfologia irregolare e l'alterazione del livello di coscienza, confermando alcuni dati già, in parte, noti in studi precedenti, altri meno studiati abitualmente, come la presenza delle varianti anatomiche.

L'abuso di droghe, alcool e la presenza di bleb mostravano una tendenza ad un aumento della captazione. Il tabagismo, invece, non compariva come fattore di influenza sull'enhancement, probabilmente perché maggiormente implicato nei fenomeni di formazione che di infiammazione/rottura dell'aneurisma. Tale dato, infatti, non risulta significativo neanche nelle più ampie casistiche finora pubblicate in letteratura.

La maggiore frequenza di captazione nel sesso maschile potrebbe essere dovuta a un'instabilità dell'aneurisma, forse legata a maggiori fattori di rischio solitamente rilevati nella popolazione maschile oppure a qualche fattore protettivo espresso dalla popolazione di sesso femminile.

Nel presente studio, i predittori indipendenti di captazione sono la morfologia e le dimensioni dell'aneurisma, il tipo di paziente e la presenza di varianti anatomiche del poligono di Willis.

La morfologia e le dimensioni sono già noti fattori predittivi di rottura e comunemente utilizzati nella pratica clinica per orientare la decisione sull'indicazione al trattamento. Lo studio ISUIA-T (International Study of Unruptured Intracranial Aneurysms Trial), infatti, riportava una soglia di 7 mm di diametro massimo oltre il quale un trattamento dovrebbe essere considerato. Tuttavia, altri studi hanno mostrato che più del 37% dei pazienti con emorragia subaracnoidea hanno aneurismi di diametro inferiore a 5mm<sup>(61,62)</sup>. Nello studio di Ishibashi, dei 19 pazienti con aneurisma rotto durante il follow-up, 8 avevano aneurismi di dimensioni minori di 5mm e 6 avevano un diametro massimo di 3 mm<sup>(7)</sup>. Nel 2011 lo studio SUAVE Japan confermava che aneurismi di diametro >4mm andavano considerati da trattare in pazienti <50 anni con ipertensione ed aneurismi multipli<sup>(58)</sup>. Anche nel nostro studio circa metà dei pazienti con aneurismi rotti sono di diametro < 7 mm. Si conferma, quindi, come le piccole dimensioni a volte possono essere un'indicazione fuorviante al follow-up, come invece consigliato dallo studio PHASES. Questa discrepanza dovrà essere superata da studi mirati ma, nel frattempo, è necessario individuare dei marcatori pratici e riproducibili per l'identificazione degli aneurismi a rischio di rottura, indipendentemente dalle dimensioni.

Le anomalie del poligono di Willis potrebbero rappresentare un indice di suscettibilità della parete come possibile concausa di alterazioni del flusso ematico predisponenti alla formazione dell'aneurisma attraverso l'incremento dello stress meccanico (wall shear stress). Le alterazioni emodinamiche, in pazienti con predisposizione genetica e anatomica, potrebbero essere un fattore implicato nella formazione e rottura anche in pazienti portatori di aneurismi multipli. Nel presente studio, infatti, si conferma che i pazienti con aneurismi rotti erano, in forma significativa, più frequentemente portatori di

aneurismi multipli. In quasi tutti i casi, un unico aneurisma era captante e, di conseguenza, è facile immaginare come l'utilizzo della RM ad alta risoluzione potrà permettere di risolvere il "dilemma" pratico di quale aneurisma trattare in acuto, nel caso degli aneurismi rotti e di quale aneurisma programmare "in elezione" per il trattamento, nel caso dei pazienti con aneurismi multipli asintomatici.

La forte relazione indipendente con la tipologia di paziente (sintomatico con aneurisma rotto, sintomatico non rotto o asintomatico) indica che la captazione di contrasto della parete aneurismatica non è un marker "speculativo" ma legato al reale rischio di rottura dell'aneurisma.

La correlazione della captazione con lo score PHASES, che pure rientrerebbe tra i predittori indipendenti a scapito delle dimensioni, può portare all'estrapolazione indiretta del reale rischio percentuale di rottura. Se, infatti, la scala PHASES offre una previsione del rischio di rottura in base a caratteristiche specifiche del paziente, la captazione sembra rivelarsi un fattore integrativo alla scala e, forse superiore, alle dimensioni stesse. E' stata individuata una linea di taglio di 4 punti della scala PHASES al di sopra della quale inizia la significativa captazione di contrasto. Questo dato, integrato con i dati clinici, dovrebbe permettere una buona predizione del rischio di rottura. Se, infatti, si osserva con attenzione il rischio di rottura a 5 anni della scala PHASES, è possibile notare come il rischio progressivo aumenti proprio a partire dai 4 punti. Questo dato, inoltre, conferma i risultati del cross-sectional study di Bijlenga in cui si evidenzia che pazienti con punteggio PHASES di > 3 avevano maggiori probabilità di essere trattati<sup>(4)</sup>. Gli autori concludono che esiste una progressione del punteggio PHASES tra aneurismi stabili, aneurismi in progressione, ed aneurismi rotti e suggerisce che potrebbe esistere una correlazione diretta anche con la captazione. In ogni caso, il punteggio

PHASES di  $\leq 3$  è associato a una bassa ma non trascurabile probabilità di rottura dell'aneurisma ed in questo sottogruppo di pazienti, specialmente se piccoli ma captanti, dovrebbe essere rivolta speciale attenzione in studi dedicati.

La captazione di parete aneurismatica mediante risonanza magnetica ad alto campo (3T) è attualmente un "hot topic" di ricerca per valutare il rischio di rottura. Il primo studio che ha esaminato la captazione di parete su aneurismi rotti è stato pubblicato da Matouk nel 2013 mostrando una correlazione, poi confermata da altri studi, tra il sito di captazione di contrasto ed il punto di rottura<sup>(25,26)</sup>. Nel loro "proof-of-principle study", hanno mostrato captazione di contrasto della parete dell'aneurisma in cinque pazienti con aneurisma rotto. In tre di questi pazienti erano presenti aneurismi multipli mentre l'enhancement non era presente in nessuno degli aneurismi non rotti.

Gli studi di Edjlali e Nagahata hanno mostrato captazione di mezzo di contrasto nella parete degli aneurismi con progressive modificazioni morfologiche o con comparsa di sintomi, considerati instabili<sup>(26,46)</sup>.

Ad oggi, i suddetti studi rimangono quelli con maggiore casistica disponibili in letteratura. Nella casistica di Nagahata, la presenza di enhancement di parete offriva una sensibilità del 98,4% e specificità di 81,9% per l'individuazione della rottura aneurismatica. Edjlali, su ampia casistica, ha dimostrato che, in aneurismi non rotti (n = 307), l'enhancement circonferenziale > 1mm ha mostrato la massima specificità (84,4%) e valore predittivo negativo (94,3%) nel differenziare tra aneurismi stabili ed instabili.

Nella nostra casistica esiste un'altissima sensibilità (100%) e valore predittivo negativo (100%). Le percentuali più basse di specificità 64% e valore predittivo positivo 28% sono attribuibili alla scarsa numerosità degli aneurismi rotti e dovrebbero aumentare progressivamente con l'aumentare della casistica.

I nostri dati sono sovrapponibili allo studio di Edjlali su oltre trecento pazienti, in quanto a valori di VVP e VVN: questo dato conferma l'omogeneità e la riproducibilità dei dati della casistica raccolta.

La captazione di parete, nell'analisi di regressione logistica, si è rivelata un predittore indipendente di rottura, insieme alla presenza di aneurismi multipli.

Le dimensioni e la morfologia dell'aneurisma sono fattori noti associati alla rottura, comunemente utilizzati nella pratica clinica nell'iter decisionale terapeutico, ancor più che lo score PHASES, e nel presente studio si sono rivelati come predittori di captazione. La captazione, d'altro canto, è risultata essere un predittore indipendente di rottura per cui è possibile suggerire che la captazione potrebbe rivelarsi, in casistiche più ampie, un biomarker chiaramente superiore ai predittori classici e permette, inoltre, di dare una risposta soddisfacente all'ipotesi del presente studio.

Questa considerazione è avvalorata dal dato che, nella presente casistica, la maggioranza degli aneurismi rotti era inferiore ai sette mm ma tutti mostravano captazione di parete alla RM.

Al fine di supportare il proof of concept che l'infiammazione e la progressiva degenerazione di parete siano alla base della captazione di parete e permettano quindi di utilizzare l'enhancement come marcatore surrogato di rottura, abbiamo, quindi, svolto un'analisi di correlazione tra dati radiologici ed istopatologici, con supporto immunohistochimico. Studi istopatologici previ hanno evidenziato che l'infiammazione gioca un ruolo importante nella formazione, crescita e rottura di un aneurisma. Frösen ha dimostrato, su ampia casistica, che infiltrati di cellule infiammatorie sono comunemente osservati negli aneurismi rotti e molte citochine infiammatorie sono coinvolte in questi processi<sup>(56)</sup>.

Uno studio effettuato su 24 aneurismi non rotti e 42 rotti, ha evidenziato la presenza di apoptosi, de-endotelializzazione, trombosi luminale, proliferazione di cellule muscolari lisce e infiltrazione di cellule T e macrofagi associati a rottura. L'infiltrazione dei leucociti (CD45, CD3, CD11b, CD68, e CD163) era presente sia in endotelio che in parete. Secondo l'autore, prima della rottura, l'aneurisma subisce cambiamenti morfologici associati con rimodellamento di parete. Alcuni di questi cambiamenti, come la proliferazione delle cellule muscolari lisce e l'infiltrazione dei macrofagi, probabilmente riflettono tentativi di riparazione in corso che potrebbero essere migliorati con terapia farmacologica.

L'invasione leucocitaria è comunemente osservata nella rottura aneurismatica e numerosi mediatori dell'infiammazione sono coinvolti. Tuttavia, è difficile da determinare se questa cascata infiammatoria fosse attiva prima della rottura o causata dalla rottura stessa.

Pochi e contrastanti dati sono comparsi nella recente letteratura nel tentativo di ottenere una correlazione tra captazione ed istologia, tutti su aneurismi non rotti.

Recentemente, Larsen e Shimonaga hanno dimostrato, in casistiche ristrette, che la presa di contrasto della parete è correlata con modificazioni infiammatorie della parete aneurismatica e non è presente in assenza di segni d'infiammazione<sup>(30,63)</sup>.

I dati riportati sono, però, disomogenei ed utilizzano diversi tipi di marcatori.

Larsen, su 13 aneurismi, ha dimostrato la presenza di correlazione tra captazione e presenza di mieloperossidasi, come un biomarker per l'instabilità in 4/5 pazienti.

Shimonaga, su 9 aneurismi non rotti e RM non ad alto campo (1,5T), ha dimostrato, contrariamente alle osservazioni di Frösen sulla de-endotelizzazione ed assottigliamento di parete, la presenza di ispessimento di parete accompagnato da aterosclerosi, neovascolarizzazione, e abbondante infiltrazione di cellule infiammatorie negli aneurismi captanti<sup>(63)</sup>.

Nella casistica istologica sono stati studiati 7 aneurismi non rotti ed 1 rotto. Si è confermato il dato di Frösen sulla presenza di infiltrazione dei leucociti (CD45, CD3, CD68 CD31) e di fattori implicati nel processo di rimodellamento di parete (*vasa vasorum*, fattore di adesione endoteliale), maggiormente presenti negli aneurismi rotti. La presenza di cellule infiammatorie, nella nostra casistica, sembra avere più valore quando presente nell'endotelio rispetto alla parete dell'aneurisma, avvalorando il concetto di de-endotelizzazione ed "endothelium leak".

E' stata evidenziata, inoltre, la presenza di un "rischio" cumulativo di captazione di parete, in relazione all'entità dell'infiltrato infiammatorio ed alterazione di parete. Pazienti con un indice di marcatori al di sotto di sette non mostravano captazione mentre tutti i pazienti con un indice superiore mostravano captazione alla RM. In sintesi, un punteggio superiore a sette, offre un 100% di sensibilità, specificità, VPP e VPN in relazione alla presenza di captazione aneurismatica. Questo dato supporterebbe il concetto che, nel processo di alterazione di parete precedente alla rottura, si sovrapporrebbero processi infiammatori a tentativi di riparazione, portando quindi ad una positività di diversi marcatori di mediatori di infiammazione/riparazione e, conseguentemente, alla captazione di contrasto nelle neuroimmagini.

Nella nostra casistica erano presenti anche un paziente con aneurisma rotto ed un non rotto ma sintomatico che mostravano un infiltrato infiammatorio simile a quello di aneurismi non rotti ma che presentavano captazione di parete alla RM, confermando l'ipotesi che i cambiamenti infiammatori rilevati, sia istologicamente che radiologicamente, sarebbero attribuibili a processi infiammatori, di degenerazione e destabilizzazione della parete dell'aneurisma precedenti la rottura e non peri-rottura. La maggiore presenza di markers (CD34 e CD31) nel rivestimento endoteliale rispetto a quelli di parete, potrebbe indicare una

correlazione tra la captazione ed un danno endoteliale ("endothelium leak"), eventualmente indice di infiammazione acuta su un processo cronico già presente. Come già mostrato in uno studio finlandese, infatti, la presenza di cellule infiammatorie nella parete dell'aneurisma è associata a modificazioni istopatologiche (neoangiogenesi e microemorragie) che la rendono più suscettibile alla rottura<sup>(18)</sup>.

L'assenza di correlazione tra la captazione ed i markers CD68 potrebbe essere dovuta al fatto che i macrofagi, come già descritto da Frösen, entrano nel processo di rimodellamento cronico della parete e non giocherebbero un ruolo attivo nel fenomeno dell'enhancement. <sup>(31)</sup>I nostri dati confermano, inoltre, che i linfociti T ed i leucociti (CD3/CD45) sono implicati nel processo di infiammazione attiva di parete. La tendenza al valore predittivo positivo del Ki67 e della triptasi richiede conferma, una volta che il campione in studio sarà ampliato.

In conclusione, la presenza di leucociti e linfociti T, associata alla presenza di infiammazione endoteliale ed alla presenza dei *vasa vasorum* nel rivestimento, potrebbero essere indici di uno stato di "instabilità" dell'aneurisma correlato alla captazione e, di conseguenza, di probabile rottura.

La maggiore captazione in pazienti con elevato riscontro quantitativo dei marcatori esaminati, potrebbe confermare l'ipotesi che s'instauri un danno acuto in un processo di rimodellamento cronico o che si generi uno squilibrio nei continui processi di danno/riparazione che portano alla crescita-stabilizzazione versus crescita/rottura dell'aneurisma stesso.

Nella nostra casistica, in pazienti con aneurismi multipli, la captazione è stata evidenziata sempre e solo in uno degli aneurismi presenti, confermando come lo studio della captazione sia una tecnica affidabile per riconoscere quale aneurisma abbia sanguinato o debba essere trattato con priorità.

L'associazione di forti evidenze istopatologiche con l'imaging potrebbe aiutare il clinico nella valutazione individuale del rischio di rottura di un dato aneurisma, soprattutto durante la valutazione di pazienti solitamente considerati "a basso rischio", ad esempio portatori di aneurismi di piccole dimensioni e con riscontro incidentale e/o in pazienti giovani. Esiste, quindi, la necessità di marcatori oggettivi e robusti per identificare gli aneurismi a rischio di rottura o che potrebbero diventare sintomatici.

# Conclusioni

I nostri risultati preliminari di uno studio su una coorte di pazienti più ampia, confermano che la presa di contrasto della parete ed i markers infiammatori aumentati siano in grado di rilevare, negli aneurismi non rotti, una tendenza alla rottura. Questi dati sono stati, inoltre, confermati dagli studi neuroradiologici ed anatomopatologici su aneurismi rotti con evidenza, dapprima, della captazione di contrasto da parte della parete, successivamente di alterazioni di struttura allo studio istologico del campione operatorio<sup>(30)</sup>.

Sebbene lo studio della risonanza magnetica della parete degli aneurismi, con i suoi correlati istologici, sia ancora in una fase precoce, questi risultati aprono spiragli sulla possibilità che gli aneurismi possano essere valutati più approfonditamente, in un futuro recente, da un punto di vista "fisiopatologico" e non solo a livello 'anatomico', come avviene attualmente.

La stratificazione del rischio, soprattutto in casi di aneurismi accidentali, è fondamentale, ma come raggiungere una gestione ottimale del paziente rimane un argomento controverso.

Il presente studio conferma l'importanza di eseguire accertamenti accurati durante la valutazione di aneurismi non rotti al fine di poter stratificare l'individuale rischio di rottura, basato sulle caratteristiche stesse dell'aneurisma e non su fattori ambientali o di rischio calcolati sulla popolazione generale. Tutto ciò al fine di poter offrire al paziente un eventuale trattamento personalizzato sulle proprie caratteristiche individuali e non su un rischio di rottura genericamente calcolato.

In conclusione, appare necessario confermare questi dati su ampie casistiche e

meta-analisi al fine di inserire la presenza di captazione alla RM in linee guida e scale di valutazione di rischio, congiuntamente al suo utilizzo come strumento diagnostico nella pratica clinica quotidiana.

# BIBLIOGRAFIA

1. Etminan N, Rinkel G.J.: Unruptured intracranial aneurysm: development, rupture and preventive management. **Nat Rev Neurol** 2017, Feb 1;13(2):126
2. Vanrossomme A.E., Eker O.F., Thiran J-P., Courbebaisse G.P., Zouaoui Boudjeltia K.: Intracranial Wall motion Analysis for Prediction of Rupture, **AJNR Am J Neuroradiol** 36:1796-802, Oct 2015
3. Krings T., Geibprasert S & TerBrugge K.G.: Pathomechanisms and treatment of paediatric aneurysms. **Childs Nerv Syst** 26, 1309-18 (2010)
4. Bijlenga P, Gondar R, Schilling S, Morel S, Hirsch S, Cuony J, Corniola MV, Perren F, Rüfenacht D, Schaller K: PHASES Score for the Management of Intracranial Aneurysm: A Cross-Sectional population-based Retrospective Study. **Stroke** 2017 Aug; 48(8):2015-2112
5. Greving JP: Development of the PHASES score for prediction of risk of rupture of intracranial aneurysms: a pooled analysis of six prospective cohorts studies. **Lancet Neurol.** 2014 Jan; 138(1):59-66
6. Backes D et al: PHASES score for prediction of intracranial aneurysm growth. **Stroke.** 2015 May; 46(5):1221-6
7. Ishibashi T, Murayama Y, Urashima M. et al: Unruptured intracranial aneurysms: incidence of rupture and risk factors. **Stroke** 2009; 40:313-16
8. Kassam A, Horowitz M., Chang Y.F. & Peters, D: Altered arterial homeostasis and cerebral aneurysms: a review of the literature and justification for a search of molecular biomarkers. **Neurosurgery** 54. 1199-1211 (2004)
9. Frösen J et al. Lipid accumulation, lipid oxidation, and low plasma levels of acquired antibodies against oxidised lipids associate with degeneration and rupture of the intracranial aneurysm wall. **Acta Neuropathol. Commun.** 1, 71 (2013)
10. Ronkainen A et al.: Familial intracranial aneurysms. **Lancet** 349, 380-384 (1997)
11. Brown R. D. Jr et al: Screening for brain aneurysm in the Familial Intracranial Aneurysm study: frequency and predictors of lesion detection. **J. Neurosurgery** 108 (6) 1132 (2008)
12. Vlak M.H., Rinkel G.J.E, Greebe P & Algra A.: Independent risk factors for intracranial aneurysms and their joint-effect: a case-control study. **Stroke** 44, 984-987 (2013)
13. Bor A.S, Rinkel G.J., van Norden J.& Wermer M.J.: Long-term, serial screening for intracranial aneurysms in individuals with a family history of aneurysmal subarachnoid haemorrhage: a cohort study. **Lancet Neurol.** 13, 385-392(2014)
14. Mangiafico S: Interventistica neurovascolare
15. Greving JP, Wermer MJ, Brown RD Jr, Morita A, Juvela S, Yonekura M et al: Development of the PHASES score for prediction of risk of rupture of intracranial aneurysms: a pooled analysis of six

prospective cohort studies. **Lancet Neurology 2014;13:59-66**

16. Hackenberg K.A.M., Hänggi D., Etminan N.: Unruptured Intracranial Aneurysms. Contemporary data and management. **Stroke 2018;49:00-00**
17. Broderick JP., Brown RD Jr., Sauerbeck L., Hornung R, Huston J III, Woo D et al.: FIA Study Investigators. Greater rupture risk for familial as compared to sporadic unruptured intracranial aneurysms. **Stroke 2009;40:1952-1957**
18. Ollikainen E., Tulamo R., Frösen J., Lehti S., Honkanen P., Hernesniemi J., Niemela M., Kovanen P.T.: mast cells, neovascularization, and microhemorrhages are associated with saccular intracranial artery aneurysm wall remodeling. **J Neuropathol Exp Neurol;2014;73(9):855-864**
19. Hashimoto N, Kim C, Kikuchi H, Kojima M, Kang Y, Hazama F: experimental induction of cerebral aneurysms in monkeys. **J. Neurosurg 1987; 67:903-5**
20. Kim C, Kikuchi H, Hashimoto H, Kojima M, Kang Y, Hazama F: Involvement of internal elastic lamina in development of saccular aneurysms in rats. **Stroke. 1988;19:507-11**
21. J. Frösen: Smooth Muscle Cells and the formation, degeneration and rupture of saccular intracranial aneurysm wall- a Review of current pathophysiological Knowledge. **Transl.Stroke Res. (2014) 5: 347-356**
22. Mandell D.M., Mossa-Basha M., Qiao Y., Hess C.P., Hui F., Matouk C et al: Intracranial Vessel wall MRI: Principles and Expert Consensus Recommendations of the American Society of Neuroradiology. **Am j Neuroradiol 2017 Feb;38(2):218-229**
23. Lehman V.T., Brinjikji W, Mossa-Basta M., Lanzino G, Rabinstein A.A., Kallmes D.F., Huston III J.: Conventional and high-resolution vessel wall MRI of intracranial aneurysms: current concepts and new horizons. **J. Neurosurg June 2017**
24. Wiebers DO, Whisnant JP, Huston J III, Meissner I, Brown RD Jr, Piepgras DG et al. International Study of Unruptured Intracranial Aneurysms Investigators. Unruptured Intracranial Aneurysms: natural history, clinical outcome and risks of surgical and endovascular treatment. **Lancet 2003;362:103-110**
25. Matouk CC, Mandell DM, Günel M, Bulsara KR, Malhotra A, Hebert R et al: Vessel wall magnetic resonance imaging identifies the site of rupture in patients with multiple intracranial aneurysms. proof of principle. **Stroke, 2013; 72:492-96, discussion 496**
26. Nagahata S., Nagahata M., Obara M, Kondo R., Minagawa N., Sato S, Mouri W, Saito S, Kayama T: Wall enhancement of the intracranial aneurysms revealed by Magnetic Resonance Vessel Wall Imaging Using three-dimensional Turbo Spin Echo Sequence with Motion-Sensitized Driven-Equilibrium: A sign of ruptured aneurysm?. **Clin Neuroradiol 2016; 26:277-83**
27. Liu P., Qi H., Liu A., Lv X., Jiang Y., Zhao X., Li R., Lu B., Lv M., Chen H., Li Y.: Relationship between aneurysm wall enhancement and conventional risk factors in patients with unruptured intracranial aneurysms: a black-blood MRI study. *Interv. Neuroradiol.* 2016;22:501-5
28. Edjlali M., Guédon A., ben Hassen W., Boulouis G., Benzakoun J., Rodriguez-Régent C., Trystram D.,

- Nataf F., Meder JF., Turski P., Oppenheim C., Naggara O.: Circumferential Thick Enhancement at vessel wall MRI has high specificity for intracranial aneurysm instability. **Radiology 2018; 00:1-6**
29. Lv N., Karmonik C., Chen S., Wang X., Fang Y., Huang Q., Liu J.: relationship between aneurysm wall enhancement in vessel wall magnetic resonance imaging and rupture risk of unruptured intracranial aneurysms. **Neurosurgery 2018; 0:1-7.**
  30. Larsen N., Von der Brelie C., Trick D., Riedel C.H., Lindner T., Madjidyar J., Jansen O., Synowitz M. & Flüh C.: Vessel Wall Enhancement in unruptured intracranial Aneurysms: an indicator for higher risk of rupture? high resolution MR Imaging and correlated histologic findings. **AJNR Am J Neuroradiol Spet 2018 39:1617-21**
  31. Frösen J, Piippo A, Paetau A, Kangasniemi M, Niemelä M, Hernesniemi J, Jääskeläinen J: Remodeling of saccular cerebral artery aneurysm wall is associated with rupture. Histological analysis of 24 unruptured and 42 ruptured cases. **Stroke 2004; 35:2287-2293**
  32. Chyatte D, Bruno G, Desai S, Todor R: Inflammation and intracranial aneurysms. **Neurosurgery 1999;45:1137-1147**
  33. Kosierwicz TA, Factor SM, Dickson DW: Immunocytochemical studies of atherosclerotic lesions of cerebral berry aneurysms. **J. Neuropathol Exp Neurol 53:399-406, 1994**
  34. Aydin F.: Do Human intracranial arteries lack vasa vasorum? A comparative immunoistochemical study of intracranial and systemic arteries. **Acta Neuropathol 1998; 96:22.28**
  35. Mandelbaum M, Kolega J, Dolan J.M, Siddiqui AH, Hui M: Critical Role of Proinflammatory Behavior of Smooth Muscle Cell in Hemodynamic Initiation of Intracranial Aneurysm. **PlosOne 2013, Vol 8. Issue 9**
  36. Chalohui N, Ali M.S., Jabbour PM, Tjoumakaris S.I., Gonzalez L.F., Rosenwasser RH, Koch WJ, Domunt AS: Biology of intracranial aneurysms: role of inflammation. **J Cereb Blood Flow Metab. 2012 Sep;32(9):1659-76.**
  37. Texacalidis P, Hilditch CA, Lehman V, Lanzino G, Pereira VM, Brinjikji W: Vessel wall imaging of intracranial aneurysms: systematic review and meta-analysis. **World Neurosurg 2018 Sep;117:453-458**
  38. Vlak MH, Algra A, Brandenburg R, Rinkel GJ: Prevalence of unruptured intracranial aneurysms with emphasis on sex, age, comorbidity, country and time period: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Neurol 2011; 10:626-636**
  39. Bor AS, Rinkel GJ, Norden J, Wermer MJ. Long-term, serial screening for intracranial aneurysms in individuals with a family history of aneurysma subarachnoid haemorrhage: a cohort study. **Lancet Neurol 2014;13:385-392.**
  40. Low SK, Takahashi A, Cha PC, Zembutsu H, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y. Genome-wide association study for intracranial aneurysm in the Japanese population identifies three candidate susceptible loci and a functional genetic variant at EDNRA. **Hum Mol genet.2012;21:2102-2110.**
  41. Korja M, Silventoinen K, McCarron P, Zdravkovic S, Skytthe A, Haapanen A, de Faire U, Pedersen NL et

- al. GenomEUtwin Project. Genetic epidemiology of spontaneous subarachnoid hemorrhage: Nordic Twin Study. **Stroke**. 2010;**41**:2458-2462
42. Caranci F, Briganti F, Cirillo L, Leonardi M, Muto M: Epidemiology and genetics of intracranial aneurysms. **Eur J Radiol**. 2013;**41**:1366-1383
43. Alg SV, Sofat R, Houlden H, Werring DJ. Genetic risk factors for intracranial aneurysms: a meta-analysis in more than 116.000 individuals. **Neurology** 2013;**80**:2154-2165.
44. Villablanca JP, Duckwiler GR, Jahan R, tateshima S, Martin NA, Frazee J et al. Natural history of asymptomatic unruptured cerebral aneurysms evaluated at CT angiography: growth and rupture incidence and correlation with epidemiologic risk factors. **Radiology**.2013: **269**:258-265.
45. Gounis MJ, Vedantham S, Weaver JP et al. Myeloperoxidase in human intracranial aneurysms: preliminary evidence. **Stroke** 2014;**45**:1474-77.
46. Edjlali M, Gentirc JC, Régent-Rodriguez C, Trystram D, Hassen WB, Lion S. et al: Does aneurysmal wall enhancement on vessel wall MRI help to distinguish stable from unstable intracranial aneurysms? **Stroke** **45**:3704-3706, 2017
47. Su IC, Willinsky RA, Fanning NF, Agid R. Aneurysmal wall enhancement and perianeurysmal edema after endovascular treatment of unruptured cerebral aneurysms. **Neuroradiology** **56**:487-495, 2014
48. UCAS Japan Investigator: Morita A, Kirino T, Hashi K, Aoki N, Fukuhara S et al. The Natural Course of unruptured cerebral aneurysms in a Japanese cohort. **N. Engl J Med**. 2012;**366**:2474-2482
49. Molineux AJ, Kerr RS, Yu LM, Clarke M, Sneade M, Yarold Ja, Sandercock P. International Subarachnoid Aneurysm Trial (ISAT) Collaborative Group. International Subarachnoid Aneurysm Trial (ISAT) of neurosurgical clipping versus endovascular coiling in 2143 patients with ruptured intracranial aneurysms: a randomized comparison of effect on survival, dependency, seizures, rebleeding, subgroups and aneurysm occlusion. **Lancet**. 2005;**366**:809-817
50. Higashida RT, Lahue BJ, Torbey MT, Hopkins LN, Leip E, Hanley DF. Treatment of unruptured intracranial aneurysms: a nationwide assessment of effectiveness. **AJNR Am J Neuroradiol**. 2007;**28**:146-151
51. Brinjikji W, Rabinstein AA, Nasr DM, Lanzino G, Kallmes DF, Cloft HJ. Better outcomes with treatment by coiling relative to clipping of unruptured intracranial aneurysms in the United States, 2001-2008. **AJNR Am J Neuroradiol** 2011;**32**:1071-1075
52. Tulamo R, Frösen J, Hernesniemi J, Niemela M. Inflammatory changes in the aneurysm wall: a review **J Neurointervent Surg** 2018;**10**:i58-i67.
53. Jamous MA, Nagahiro S, Kitazato KT et al. Endothelial injury and inflammatory response induced by hemodynamic changes preceding intracranial aneurysm formation: experimental study in rats. **J.Neurosurg** 2007;**107**:405-11
54. Aoki T, Kataoka H, Ishibashi R et al. Macrophage-derived matrix metalloproteinase-2 and -9 promote

the progression of cerebral aneurysm in rats. **Stroke** 2007;**38**:162-9

55. Juvela S. Natural history of unruptured intracranial aneurysms: risk for aneurysm formation, growth and rupture. **Acta Neurochir Suppl** 2002;**82**:27-30.
56. Frösen J, Piippo A, Paetau A et al. Growth factor receptor expression and remodeling of saccular cerebral artery aneurysm walls: implication for biological therapy preventing rupture. **Neurosurgery** 2006;**58**:534-41
57. Meng H, Tutino VM and Siddiqui A. High WSS or Low WSS? Complex interactions of hemodynamics with intracranial aneurysm initiation, growth and rupture: toward a unifying hypothesis. **AJNR AM J Neurorad** 2014;**35**:1254-62.
58. Sonobe M, Yamazaki T, Yonekura M, Kikuchi H. Small unruptured intracranial aneurysm verification study: SUAVE study, Japan. **Stroke** 2010;**41**:1969-1977
59. Juvela S, Korja M. Intracranial aneurysm parameters for predicting a future subarachnoid hemorrhage: a long-term follow-up study. **Neurosurgery**.2017;**81**:432-440
60. Ishibashi r, aoki T, Nishimura M, Hashimoto N, Miyamoto S. Contribution of mast cells to cerebral aneurysm formation. **Curr Neurovasc Research**, 2010;**7**:113-124
61. Unruptured Intracranial Aneurysms-risk of rupture and risks of surgical intervention. International Study of Unruptured Intracranial Aneurysms Investigators. **N Engl J Med** 1998;**339**:1725-33
62. Juvela S, Porras M, Poussa K. Natural history of unruptured intracranial aneurysms: probability and risk factors for aneurysm rupture. **J. Neurosurg** 2000;**93**:379-87
63. Shimonaga K, Matsushige T, Ishii D, Sakamoto S, Hosogai M, Kawasumi T et al. Clinicopathological insights from vessel wall imaging of unruptured intracranial aneurysms. **Stroke** 2018;**49**:2516-2519