

UNIVERSITA' DEGLI STUDI MILANO- BICOCCA

**SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE MEDICHE CLINICHE E
SPERIMENTALI**

NEUROSCIENZE

**RUOLO E POTENZIALE
DELLE CELLULE PROGENITRICI ENDOTELIALI
NEL VASOSPASMO CEREBRALE**

Tesi di Dottorato di Ricerca in Neuroscienze

Dott.ssa Susanna Bacigaluppi

Matricola N.: 716296

Relatore: Chiar.mo Prof. Giovanni Tredici

Anno Accademico 2010-2011

Indice

I. Introduzione	1
I.1 Gli aneurismi cerebrali.....	1
I.2 Il problema del vasospasmo nell'emorragia sub-aracnoidea.....	3
I.3 Fisiopatogenesi del vasospasmo	8
I.4 Trattamenti disponibili.....	15
Riduzione delle cause scatenanti.....	15
Miglioramento del flusso ematico cerebrale	15
Trattamenti farmacologici.....	16
Rilassanti del muscolo liscio.....	17
Antagonisti dell'endotelina	17
Trattamento endovascolare.....	18
Neuroprotettori ed anti-infiammatori	19
I.5 Le cellule staminali.....	23
I.6 Le cellule progenitrici neurali	24
I.7 Le cellule staminali mesenchimali	25
I.8 Le cellule progenitrici endoteliali	27
Le cellule staminali e la mobilizzazione.....	28
II. Il progetto	31
III. Disegno dello studio	33
Obiettivo dello studio:	33
IV. Materiali e Metodi.....	35
Modello di ischemia in vitro e metodi di trattamento	35
Colture primarie di neuroni corticali.....	35
Modello di ischemia in vitro	36
Terapia cellulare: Cellule staminali mesenchimali.....	37
Terapia cellulare: cellule progenitrici endoteliali umane.....	38
Esperimenti per la taratura dello stimolo da deprivazione di ossigeno e glucosio (DOG).....	40
Esperimenti in normossia e DOG 1h con trattamenti cellulari.....	43
Immunofluorescenza	46
Valutazione della sopravvivenza neuronale.....	47
Studio clinico	48
Raccolta, preparazione ed analisi di campioni biologici da pazienti affetti da emorragia subaracnoidea.....	48
Materiale clinico.....	48
Valutazione clinica	48
Protocollo di gestione clinica	49
Imaging cerebrale.....	49
Ischemia cerebrale ritardata	50
Ecocolordoppler transcranico	50
Vasospasmo	50
Analisi ematochimiche e raccolta dei leucociti per l'isolamento del RNA.....	51
Analisi citofluorimetrica (prove solo eseguite su campioni di volontari sani).....	51
Rt-PCR	53
Analisi statistica	56
V. Risultati.....	57

Modello di ischemia in vitro	57
Setup del modello di ischemia	57
Morfologia e quantificazione della sopravvivenza in longitudinale.....	58
Verifica della morte di elementi neuronali.....	63
Studio dell'efficacia del trattamento con cellule staminali mesenchimali e progenitori endoteliali per l'ischemia neuronale	66
Valutazione del rescue neuronale nel tempo	66
Valutazione del rescue neuronale mediante immunofluorescenza	69
Studio dei progenitori endoteliali nel vasospasmo	75
Caratteristiche cliniche	75
Analisi citofluorimetrica della presenza di progenitori endoteliali in pazienti con emorragia subaracnoidea: messa a punto di saggio citofluorimetrico per la quantificazione e l'isolamento delle EPCc.....	77
Analisi semi-quantitativa mediante Real Time PCR dell'espressione di marcatori delle EPCc su sangue di pazienti affetti da emorragia subaracnoidea.	81
VI. Discussione	85
VII. Conclusioni e Sviluppi Futuri	97
VIII. Bibliografia	99
IX. RINGRAZIAMENTI	129

I. Introduzione

I.1 Gli aneurismi cerebrali

Gli aneurismi cerebrali sono delle dilatazioni patologiche della parete delle arterie intracraniche su base multifattoriale e ad eziopatogenesi ancora poco definita (*Krings T-Nat Rev Neurol 2011*). La prevalenza degli aneurismi non rotti è del 2-3% nella popolazione con età media di 50 anni e costituita al 50% da maschi (*Vlak MH-Lancet Neurol 2011*).

Sia per la genesi sia per la rottura degli aneurismi sono stati imputati fattori genetici, in particolare riguardanti geni della matrice strutturale della parete vascolare (*Ruigrok YM- Stroke 2008; Nahed B-Neurosurgery 2007*); fattori inerenti alla morfologia dell'arteria e particolari situazioni emodinamiche conseguenti (*von Gijn J-Lancet 2007; Piccinelli M-Neurosurgery 2011*); fattori di rischio acquisiti come il fumo di sigaretta, un elevato consumo di alcolici e l'ipertensione (sebbene quest'ultima sia determinata anche da fattori genetici) (*Clarke M-Neuroradiology 2008; Tonn J- Neuroradiology 1999; Krex D-Acta Neurochir 2001*).

Gli aneurismi intracranici hanno un rischio di rottura difficile da stimare - visto che non sono esattamente note nè la prevalenza nè l'incidenza degli aneurismi non rotti, ma la stima dell'incidenza di rottura per un aneurisma intracranico raggiunge 6-20/100.000 persone/anno (*De Rooj NK- JNNP 2007; van Gijn J-The Lancet 2007*). Infatti, una grande percentuale di queste lesioni vascolari rimane clinicamente silente e si manifesta solo nel caso di sanguinamento, o come riscontro accidentale, una minoranza invece è sintomatica per il loro effetto massa - associandosi per esempio a deficit a carico dei nervi cranici (*Schievink WI-NEJM 1997*).

La diagnosi di un aneurisma non rotto può essere sospettata, se l'aneurisma è voluminoso, già sulla base di una TAC encefalo, mentre in caso di rottura questa si manifesta in genere chiaramente sulla TAC o va sospettata in caso di cefalea acuta, trafittiva ed atipica (*Brisman JL-N Engl J Med 2006*). L'identificazione neuroradiologica degli aneurismi necessita comunque di tecniche d'*imaging* per le

strutture vascolari che comprendono metodiche poco invasive come l'angioRMN e l'angioTAC- sino a metodiche più invasive ma a maggior risoluzione, come l'angiografia digitale (*Schievink WI-NEJM 1997; Bacigaluppi S- Neurosurg Focus 2009*).

Gli aneurismi intracranici non rotti possono essere trattati o seguiti nel tempo e vi sono enormi sforzi volti ad indentificare quelli con maggior rischio di rottura. Obiettivo del trattamento di un aneurisma non rotto è quello di escluderlo dal circolo sanguigno per prevenirne la rottura, l'obiettivo del trattamento degli aneurismi rotti è quello di escluderli dal circolo per prevenirne un ri-sanguinamento, che è del 15% nelle prime ore e raggiunge il 40% cumulativo se l'aneurisma non viene trattato con un rischio di mortalità o morbilità dell'80%, oltre alla gestione di tutte le complicanze secondarie all'emorragia (*van Gijn J-The Lancet Neurology 2007; Ohkuma H-Stroke 2001; Brilstra EG-Journal of Neurosurg 2002; Brilstra EH- Neurology 2000; Roos YB- JNNP 2000*).

Le metodiche a disposizione per l'esclusione degli aneurismi dal circolo cerebrale sono sostanzialmente due e si suddividono in chirurgiche (prevedono quindi una craniotomia e l'intervento sotto guida microscopica) ed endovascolari (prevedono il raggiungimento dell'aneurisma previa navigazione intraarteriosa con cateterismo selettivo) ed infine vi sono le tecniche combinate. Per l'esclusione dell'aneurisma dal circolo quindi, la tecnica chirurgica più comunemente utilizzata è il clippaggio dell'aneurisma, che prevede l'apposizione di un mini-fermaglio a livello del colletto della sacca aneurismatica. Le tecniche endovascolari più comuni sono note come 'coiling'- l'introduzione nella sacca aneurismatica di minispirali di platino o di materiali simili che ne chiudono il lume formando una sorta di gomito e lo 'stenting'- cioè l'introduzione di una protesi endovascolare che ricostruisce il lume escludendo l'orifizio della sacca aneurismatica. Tuttavia gli aneurismi possono essere di varia complessità, sia per la sede, sia per la morfologia, sia per la struttura (la parete per esempio può essere quasi trasparente e quindi fragilissima o porcellanacea), sia per l'incorporazione nella sacca di collaterali o arterie perforanti e quindi il trattamento può richiedere l'utilizzo di strategie più complesse. Non sono inoltre da trascurare le peculiarità dei pazienti - in quelli giovani l'attesa di vita e quindi l'impatto di un deficit neurologico sulla qualità di vita, nei pazienti anziani è fondamentale considerare le comorbidità per fare alcuni

esempi (*Wiebers DO- Lancet 2003; Brisman JL-N Engl J Med 2006; Schievink WI-NEJM 1997*).

Il trattamento degli aneurismi non rotti è complesso e non privo di rischi: oltre ai rischi anestesiológicos ed infettivi i deficit possono essere significativi e riguardare per esempio la lesione di nervi cranici o danni ischemici iatrogeni, per cui comunque devono essere messe in atto le massime competenze e tutti gli ausili possibili per ridurre queste evenienze (*Bacigaluppi S- World Neurosurgery 2011*) ed è fondamentale un'adeguata stima tra i rischi e i benefici per ogni singolo caso (*Wiebers DO-Lancet 2003; Brisman JL-N Engl J Med 2006; Brown RD-Semin Neurol 2010*).

Tuttavia la rottura dell'aneurisma cerebrale, nota anche come emorragia subaracnoidea (ESA) è un evento molto grave che si associa ad una mortalità del 50% (*van Gijn J-The Lancet 2007*). L'emorragia sub aracnoidea consiste nello stravasamento di sangue nello spazio aracnoideo, perivascolare.

La mortalità e la morbilità associata può essere immediata, dovuta ad ipertensione endocranica ed arresto di circolo relativi alla gravità dell'emorragia, può essere dovuta al risanguinamento, anche precoce, dell'aneurisma o dovuta alle complicanze tardive inerenti all'ESA, tra cui il vasospasmo ed il danno ischemico tardivo (*Wartenberg KE-Neurosurg Clin N Am 2010; Ferro JM-J Neurol 2008*).

In un precedente progetto proposto dalla sottoscritta, Aneurisk, tuttora in sviluppo, abbiamo indagato, insieme ad un gruppo di ingegneri e matematici, il ruolo potenziale di fattori inerenti alla geometria vascolare relativamente allo sviluppo ed al rischio di rottura degli aneurismi intracranici. A tale fine sono stati utilizzati e messi a punto strumenti computazionali di ricostruzione e di analisi geometrica ed emodinamica e strumenti di statistica avanzata volti ad indagare questi aspetti, analizzando le morfologie vascolari acquisite in 3D durante la fase diagnostica di questi pazienti (cfr. tesi di specializzazione in Neurochirurgia di SB, AA 2006; progetto 'Aneurisk'web; *Piccinelli M-Neurosurgery 2011; Passerini T-Cardiovasc Eng and Technol 2011*).

1.2 Il problema del vasospasmo nell'emorragia sub-aracnoidea

L'emorragia sub aracnoidea (ESA) ha eziologia 'post-traumatica', o 'spontanea' - ovvero associata alla rottura di una malformazione arteriovenosa cerebrale, alla

dissecazione di un'arteria, ad un sanguinamento venoso o più comunemente alla rottura di un aneurisma, dilatazione ed alterazione strutturale della parete di un vaso. Nello studio della fisiopatologia e nelle indicazioni terapeutiche dell'ESA ed ai problemi clinici ad essa correlata si fa in genere riferimento all'ESA da rottura di aneurisma, poichè nell'ESA posttraumatica rientra la variabilità legata alla situazione poli-lesionale, ed è univocamente di origine arteriosa. L'ESA da rottura di aneurismi intracranici rappresenta il 4-5% degli strokes (ictus) (*Lovelock CE- Neurology 2010, De Rooij NK-JNNP 2007*) ed ha un'incidenza di circa 9/100 000 anni-persona (*Rooij NK- JNNP 2007*). Alcuni autori tuttavia hanno calcolato che, poiché l'ESA aneurismatica colpisce persone piuttosto giovani, il totale anni/vita e di produttività persi dai pazienti colpiti sia addirittura uguale a quello perso dai pazienti colpiti dalla forma di ictus più comune - l'ischemia cerebrale (*Feigin VL- Lancet Neurol 2003; Johnston SC- Neurology 1998; De Rooij NK- JNNP 2007*).

La mortalità associata all'ESA è alta e variabile nei diversi studi epidemiologici. Negli anni '80 si parlava del 30-50% (*Nishioka H- Arch Neurol 1984; Ostergaard JR-Acta Neurol Scand 1989*), negli ultimi vent'anni sembra essersi pressochè dimezzata (*Lovelock CE- Neurology 2010*) ma resta considerevole la riduzione della qualità di vita: complicanze cognitive si riscontrano ad un anno dall'evento nel 35-93% dei pazienti colpiti (*Scott RB-Trials 2008; Egge A- Acta Neurol Scand 2005*). Molti pazienti perdono l'autonomia o non sono più in grado di tornare ai livelli di performance precedenti l'emorragia; un terzo dei sopravvissuti non è in grado di tornare al lavoro svolto in precedenza (*Czedic C-Zentralbl Neurochir 2005*).

Il vasospasmo cerebrale è una grave complicanza dell'ESA, in particolare di quella di origine arteriosa.

Colpisce che l'incidenza del vasospasmo sintomatico non sia sostanzialmente cambiata in questi ultimi trent'anni: il 28% di 3521 pazienti trattati all'inizio degli anni '80 ha presentato lesioni ischemiche cerebrali (*Kassell NF-J Neurosurg 1990*), ed il 30% di un totale di oltre 3500 pazienti coinvolti in 4 studi sul tirilazad hanno sviluppato vasospasmo clinico, nonostante avessero tutti ricevuto una profilassi con nimodipina e nonostante il 62% avesse anche ricevuto una terapia emodinamica (*Haley EC-J Neurosurg 1995; Halley EC-JNeurosurg1997; Lanzino G-J Neurosurg 1999; Lanzino G-J Neurosurg 1999; Loch Macdonald R-Neurosurg Rev*

2006). La gravità dell'emorragia correla con lo sviluppo del vasospasmo (*Frontera JA-Neurosurgery 2006*).

Sembra esservi una correlazione tra minor incidenza dell'infarto cerebrale e miglior *outcome* funzionale nei pazienti colpiti da ESA (*Vergouwen MD-JCBFM 2011*).

Il vasospasmo si definisce come una riduzione di calibro di un'arteria, i deficit neurologici attribuibili al vasospasmo sono noti come danni ischemici tardivi. Il vasospasmo non riguarda solo le arterie intracerebrali maggiori, afferenti ed efferenti dal circolo del Willis incluse, ma sembra che vi sia un coinvolgimento del microcircolo dovuto probabilmente a vasodilatazione da mancata autoregolazione e/o a ridotto calibro di vasi intraparenchimali (*Ohkuma H Stroke 2000*).

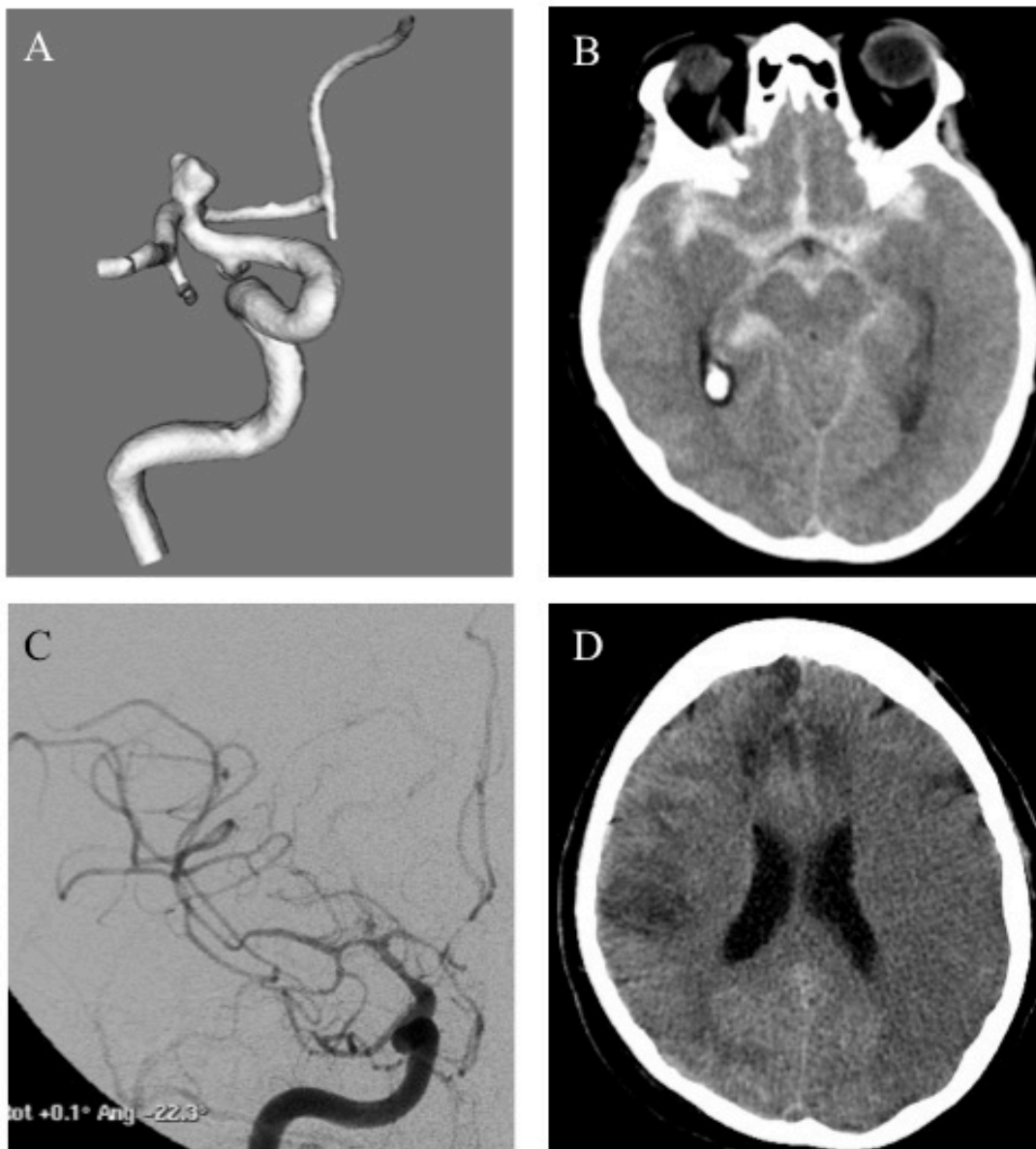


Figura: aneurisma della biforcazione della carotide interna-ricostruzione da angio 3D (*immagine dell'archivio della Neuroradiologia Interventistica di Niguarda- si*

ringrazia il Dr E. Boccardi, utilizzata per il progetto Aneurisk, ricostruzione a partire dalle sezioni in formato DICOM eseguita dall'Ing. M.Piccinelli) (A); sezione TAC encefalo di ESA con inondamento di tutte le cisterne della base e dei ventricoli (B); angiografia digitale di circolo anteriore, con iniezione della carotide interna dx: importante vasospasmo a carico della carotide interna dx distale, dell'arteria cerebrale anteriore e dell'arteria cerebrale media (C); sezione TAC mostrante danno ischemico tardivo relativo al vasospasmo a carico del circolo anteriore (D) (per le immagini B,C e D si ringrazia il Dr.G. Pero della Neuroradiologia Interventistica di Niguarda)

Nella pratica clinica vi sono molteplici criteri per sospettare e poter diagnosticare la presenza di vasospasmo. Il vasospasmo cerebrale può essere valutato da un punto di vista clinico in termini di alterato quadro neurologico relativo alla conseguente insufficienza perfusionale. Tuttavia il criterio della sola clinica è poco utilizzabile nei pazienti già comatosi, sedati o con già rilevanti deficit neurologici. Inoltre il riscontro di un deficit clinico implica che ci sia già stata una sofferenza del parenchima cerebrale.

Vi sono delle tecniche di monitoraggio non invasivo come il doppler transcranico (TCD), che se ripetute almeno quotidianamente, hanno una riconosciuta sensibilità nel rilevare lo spasmo. Per rilevare uno spasmo con il TCD vi sono diversi criteri: la velocità dell'arteria cerebrale media ($v_{MCA} \geq 120$ cm/s ed una hemispheric ratio o Lindegaard ratio HR ($v_{MCA}/v_{EC-ICA} > 3$) (*Asalid R-Neuroradiol 1989, Lindegaard KF-Acta Neurochir 1989*). La Lindegaard ratio aiuterebbe a distinguere il vasospasmo da uno stato iperdinamico dovuto o alla terapia emodinamica o all'iperemia (*Lindegaard KF-Acta Neurochir 1989*). Si è rilevato che la v_{MCA} media si aggira intorno a 60cm/s, e che v_{MCA} sotto i 100 cm/s raramente si associano a vasospasmo significativo, mentre invece una velocità che superi i 200 cm/s indica uno spasmo grave (*Asalid R-Neuroradiol 1989*). La sensibilità può essere notevolmente aumentata con lo studio della tendenza della velocità con misurazioni ripetute nel tempo. Aumenti velocimetrici sopra i 50 cm/s nell'arco di 24 ore dovrebbero far sospettare lo sviluppo di vasospasmo (*Loch Macdonald-Neurosurg Rev 2006*). Non tutti i pazienti però hanno delle finestre ossee adeguate per la valutazione TCD. L'Angio TAC è una metodica certamente non utilizzabile per uno screening quotidiano, ma recentemente accettata per lo studio di pazienti con sospetto vasospasmo, sulla base della clinica e/o del TCD o anche, nei pazienti non valutabili clinicamente come screening tra la 5. e la 7. giornata (*Shankar JJ-Neuroradiology 2011*). L'angiografia tuttavia rimane il golden standard, sia perché

le immagini sono un po' meno soggette ad artefatti da clips metalliche, nel caso di vasospasmo in pazienti con aneurismi trattati chirurgicamente, sia per la maggiore risoluzione e soprattutto per la possibilità di intervenire per via endovascolare (cfr. prossimo paragrafo) (*Willinsky RA-Radiology 2003; Loch L Macdonald-Neurosurg Rev 2006*). Nella pratica corrente non si misura il calibro delle arterie per stabilire la presenza di vasospasmo, anche se sono state descritte delle scale basate sulla percentuale della riduzione di calibro. La definizione è qualitativa e la descrizione deve includere i distretti interessati. Fondamentale è anche la visualizzazione di alterazioni dei tempi di circolo e la presenza di parenchima ipoperfuso nelle fasi arteriolo-capillari. Nei pazienti con ESA si rileva un'importante correlazione tra vasospasmo angiografico (o rilevato all'angioTAC) e presenza di lesioni ischemiche cerebrali (*Crawley RW-Stroke 2011; Weidauer S-Stroke 2007; Ohta H-Neurol Med Chir 1981; Dankbaar JW-Neuroradiology 2009*).

La risonanza magnetica e l'angio-risonanza sono meno utilizzate nella pratica clinica per il maggior tempo di acquisizione, la maggiore presenza di artefatti, i maggiori costi e la minore risoluzione per l'angioarchitettura (*Tamatani S-Neurosurgery 1997; Hattingen E-Neurosurg Rev 2010*). Rimane purtuttavia un utile strumento per lo studio della fisiopatologia del vasospasmo e del danno ischemico correlato.

La TAC perfusione, che in questi ultimi anni ha sostituito la metodica della TAC con Xenon, ed anche la RMN perfusionale sono sensibili strumenti per valutare le conseguenze emodinamiche sul parenchima del vasospasmo, nonché per rilevare precocemente la presenza di ipoperfusione (anche già in 3 giornate) e utili quindi come guide nel trattamento (*Hertel F-Neurosurgery 2005; Lanterna LA-J Neurosurgery 2011*).

Altre tecniche utilizzabili nei pazienti in coma includono la saturimetria a livello del bulbo giugulare-un aumento della saturazione dell'ossigeno nel sangue venoso anticiperebbe di un giorno la comparsa del vasospasmo (*Heran NS-Can J Neurol Sci 2004*), nonché sistemi che sfruttano la rilevazione dell'ossimetria per via transcranica come la Near Infrared Spectroscopy (*Mutoh T-Neurocrit Care 2003*). Vi sono anche altre metodiche poco utilizzate perchè da un lato invasive e nel contempo in grado di monitorare solo un territorio limitato di parenchima cerebrale: la microdialisi, in grado di rilevare alterazioni del metabolismo aerobico- in particolare l'aumento del rapporto tra lattato e glucosio e lattato piruvato (*Bederson*

JB-Neurosurgery 1998), la misurazione della saturazione di ossigeno, di anidride carbonica e del pH parenchimale (*Charbel FT-Surg Neurol 2000*) e la thermal diffusion flowmetry, per la misurazione del flusso regionale (*Vajkozy P-Journal of Neurosurgery 2003*).

1.3 Fisiopatogenesi del vasospasmo

La fisiopatologia del vasospasmo è suddivisibile in 5 fasi: evento scatenante (emorragia subaracnoidea) (giorno 0), fase preliminare (giorno 1-3), vasospasmo iniziale (giorno 3-4), vasospasmo massimo (6-8 giornata), risoluzione del vasospasmo (giorno 12-14) (*secondo Weir B-J Neurosurg 1978*). Dobbiamo inoltre considerare da un lato i fenomeni a livello delle arterie subaracnoidee maggiori, e in parallelo i fenomeni che interessano il microcircolo ed il parenchima cerebrale.

Quando si parla di vasospasmo associato ad ESA, si intende generalmente il vasospasmo tardivo, poiché il vasospasmo acuto è un fenomeno estremamente raro nell'uomo (*Cook DA-Pharmacol Ther 1995*), anche se vi è l'ipotesi che la presenza di un vasospasmo acuto possa precipitare o esacerbare quello tardivo (*Schubert GA-Front Biosci 2008*).

Recentemente si è aumentata l'attenzione sull'ipotesi che il danno cerebrale iniziale associato all'ESA possa svolgere un ruolo cruciale nello scatenare fenomeni infiammatori che portano al vasospasmo e al danno ischemico tardivo (DCI) (*Hansen-Schwarz J-Trends Pharmacol Sci 2007*). Nell'ESA due fattori concorrono a determinare il vasospasmo: un fattore meccanico costituito dall'aumento della pressione intracranica determina un iniziale arresto o riduzione del flusso ematico cerebrale, ed un fattore biochimico rappresentato dall'incremento dell'emoglobina ossidata che riduce la disponibilità del nitrossido (NO), un fondamentale vasodilatatore.

L'ischemia cerebrale acuta che consegue al vasospasmo è causa della morte neuronale (edema citotossico) e della distruzione della barriera emato-encefalica dovuta alla morte endoteliale (edema vasogenico). La morte cellulare dell'endotelio, in particolare, è causa della compromissione del microcircolo che determina l'attivazione di una risposta infiammatoria e la formazione di trombi con

ulteriore peggioramento del circolo ematico (*Ostrowski RP-Neurol Res 2006; Cahill J-JCBFM 2006; Hansen-Schwarz J-Trends Pharmacol Sci 2007*).

L'endotelio è considerato tra i principali attori coinvolti nella patogenesi del vasospasmo associato all'ESA (*Kolias AG J Neurosci Res 2009*).

A livello del sistema nervoso centrale, l'ossido nitrico (NO) è prodotto dall'enzima nitrossido sintetasi endoteliale (eNOS) a livello dell'intima vascolare e dalla nitrossido sintetasi neuronale a livello avventiziale.

Il NO ha un effetto rilassante sul muscolo liscio vascolare e i suoi livelli aumentano in risposta allo shear stress, ad aumentata richiesta metabolica e ad alterazioni della pCO₂. Il rilascio del muscolo liscio vascolare NO dipendente è mediato dall'attivazione della guanilcicliasi (cGMP) solubile dalla quale risulta la defosforilazione delle catene leggere della mioglobina, l'attivazione dei canali del potassio e la chiusura dei canali del calcio voltaggio-dipendenti. Questa guanylcicliasi viene poi metabolizzata da delle fosfodiesterasi (PDE).

Nell'ESA questa regolazione del flusso ematico cerebrale è interrotta: l'ossiemoglobina rilasciata gradualmente dal coagulo ematico a livello subaracnoideo, depleta il NO e danneggia i neuroni contenenti eNOS e la ridotta disponibilità di NO porta allo sviluppo del vasospasmo tardivo. Ne consegue un aumento di *shear-stress* che in condizioni normali stimola l'eNOS a produrre il NO per favorire la vasodilatazione. L'eNOS invece sembra aumentare ma essere disaccoppiato, producendo perossinitriti con il rischio di microemboli (*Sabri M-JCBFM 2011*). L'eNOS viene disattivata da aumentati livelli di un suo inibitore endogeno, la dimetilarginina asimmetrica (ADMA). L'ADMA libera si forma durante la proteolisi (*Teerlink T-Vasc Med 2005*). Aumentati livelli di ADMA derivano da una ridotta eliminazione dovuta a sua volta all'inibizione dell'enzima idrolizzante (DDAH2) da parte dei metaboliti dell'emoglobina, e di frammenti ossidati della bilirubina (BOXes). La disfunzione dell'eNOS quindi sostiene il vasospasmo sino a quando i livelli di ADMA non vengono ridotti e può aumentare la produzione di NO (*Pluta RM- Pharmacol Therapeut 2005; Pluta RM- Rev Recent Clin Trials 2007; Crowley RW-Drug Discov Today 2008*).

Il NO inoltre sembra controllare attraverso un feed-back negativo, i livelli di un potentissimo vasocostrittore, l'endotelina-1 (ET-1), per cui alla sua deplezione

conseguono che livelli aumentati o inappropriatamente normali possano potenziare il vasospasmo (*Pluta RM-Pharmacol Therapeut 2005; Thomas JE-Neurosurg 1997*). Nel vasospasmo cerebrale l'endotelina 1, un peptide a 21 aminoacidi, svolge un ruolo cruciale. L'endotelina è prodotta dalle cellule endoteliali, dalle cellule muscolari lisce, da neuroni, astrociti e monociti e origina nella sua forma attiva dal suo precursore previo clivaggio mediato dall'*endothelin converting enzyme* (ECE) (*Vatter H-Neurosurgery 2002*). L'endotelina 1 (ET-1) svolge la sua attività biologica mediante due sottotipi di recettore denominati ET(A) e ET(B). In condizioni fisiologiche prevale l'effetto vasocostrittore con un aumento della concentrazione del calcio intracellulare tramite l'attivazione della fosfolipasi C e la via della fosfochinasi C, mediato dai recettori ET(A) sulle cellule muscolari lisce. Questo effetto è attenuato dal rilascio mediato dal recettore ET(B) dell'ossido nitrico (NO) e della prostaciclina (*Vatter H-Acta Neurochir Suppl 2011; Chow M-Neurosurgery 2002*).

Nel vasospasmo si riscontrano aumentati livelli di endotelina liquorali e plasmatici (*Fassbender K- Stroke 2000; Juvela S- J Neurosurg 2000*). A livello sperimentale la somministrazione intracisternale di endotelina 1 è in grado di provocare un vasospasmo ben confrontabile con quello associato all'ESA, anche in termini istologici (*Zubkov AY- Stroke 2000*). Infine, sia la trombina sia l'ossiemoglobina, rilevabili in elevate concentrazioni nel liquor dopo ESA, sono in grado di aumentare il rilascio di endotelina 1 (*Kasuya H- J Neurosurg 1993; Vajkoczy P- J Neurosurg 2005*).

Nel vasospasmo, nonostante l'aumentata espressione del recettore ET(B), l'effetto vasodilatatore sembra venir meno, mentre sembra invece prevalere l'effetto mediato dal recettore ET(A) (*Vatter H-Acta Neurochir Suppl 2011; Xie A- J CBFM- 2007*).

L'infiammazione è un cardine sia nel vasospasmo sia nel DCI, tuttavia i meccanismi sono complessi ed è ancora difficile distinguere precisamente tra fenomeni causali e fenomeni conseguenti. Sembra che l'infiammazione possa elicitarne il vasospasmo cronico anche in maniera indipendente dall'ossiemoglobina (*Recinos PF-Surg Neurol 2006*). Per quanto riguarda l'emoglobina (Hb) extracorporea, questa è rilasciata a livello del torrente sanguigno e nell'interstizio in concomitanza con eventi rispettivamente emolitici ed emorragici,

ha un ruolo fortemente pro-infiammatorio, poiché recluta l'espressione di molecole endoteliali di adesione leucocitaria, reclutando quindi i leucociti nel luogo dell'infiammazione, riduce la vasodilatazione mediata dall'NO, stimola l'ossidazione dell'acido arachidonico e la componente ferrosa del complesso eme aumenta la produzione di radicali liberi e perossidi lipidici, dannosi per le membrane cellulari (*Chaichana KL-World Neurosurgery 2010*). Date le sue proprietà proinfiammatorie e vasocostrittrici e la concomitanza della sua concentrazione e lo sviluppo del vasospasmo, l'Hb è considerata un importante mediatore dello stesso (*Clark JF-JCBFM 2006*). L'aptoglobina è una sieroproteina in grado di chelare l'Hb libera e di favorirne l'eliminazione a livello delle cellule parenchimali epatiche o a livello del sistema macrofagico reticolo-endoteliale. A livello macrofagico quindi è degradata per mezzo di enzimi lisosomiali in bilirubina, e quest'ultima, meno tossica, rilasciata nel torrente ematico è poi coniugata all'albumina, trasportata nel fegato, coniugata ed escreta nella bile (*Moestrup SK-Ann Med 2004*). Nell'uomo vi sono due alleli per il gene dell'aptoglobina: Hp1 è quello condiviso con gli altri mammiferi, mentre Hp2 no. Hp-1-1 è un dimero, di volume inferiore, e garantisce una maggiore efficienza nella clearance dell'Hb- con quindi una maggiore efficacia in termini anti-infiammatori, immunomodulatori, antiossidanti e vasodilatatori. Hp-2-2 invece è una proteina ciclica, e questo genotipo è sovrarappresentato nelle malattie con componente infiammatoria come l'artrite reumatoide, il lupus, la malattia coronarica ed il diabete, ma sembra proteggere nei confronti delle infezioni da *Streptococcus pyogenes* e dal *plasmodium falciparum*, presentando così un vantaggio selettivo (*Chaichana KL-World Neurosurgery 2010; Pradilla G-Neurosurgery 2011*).

Anche la risposta infiammatoria si può dividere in una fase acuta - nella quale le cellule effettrici principali sono i neutrofilii polimorfonucleati, i macrofagi ed i monociti ed in una fase cronica con linfociti e plasmacellule come principali effettori (*Chaichana KL-World Neurosurgery 2010*). Nella fase acuta si ha a livello delle arteriole terminali un rilassamento che comporta iperemia e a livello del microcircolo una contrazione delle cellule endoteliali con conseguente aumento della permeabilità anche ai leucociti (neutrofilii, monociti e macrofagi) che possono migrare nello spazio extravascolare, fagocitare le sostanze infiammatorie ed eventualmente degranulare rilasciando altri enzimi e sostanze tossiche. Nell'infiammazione cronica invece, che rappresenta un'evoluzione del persistente

stimolo pro-infiammatorio, linfociti e monociti a lunga sopravvivenza rilasciano a loro volta enzimi idrolitici, citochine e speci reattive dell'ossigeno che mantengono la risposta infiammatoria (*Chaichana KL-World Neurosurgery 2010*).

Anche a livello sistemico si è osservata una forte correlazione tra la febbre e lo sviluppo di vasospasmo (*Walton JN-Can Med Assoc J 1955; Rousseaux P- Surg Neurol 1980*), nonché la leucocitosi (*McGirt MJ-J Neurosurg 2003; Neil-Dwyer G-Brain 1974*), la presenza di immunocomplessi (*Pellettieri L-Experientia 1981; Pellettieri L-Neurosurgery 1986*) l'aumento del complemento- in particolare C3a (*Mack WL-Neurosurgery 2007*) e di elevati livelli di proteina C-reattiva (*Rothoerl RD-J Neurosurg Anesthesiol 2006*)

Un ruolo cruciale sarebbe svolto sempre dai radicali liberi dell'ossigeno (idrossili e anioni superossido) liberati sia dai prodotti di degradazione dell'ossiemoglobina, sia originati per induzione di Cox-2 e della nitrossidosintetasi inducibile (iNOS) a livello del muscolo liscio vascolare e dell'endotelio, sia anche rilasciati da linfociti e macrofagi.

Sempre tra i substrati della COX abbiamo l'acido arachidonico (AAA), un acido grasso poliinsaturo ed un componente strutturale dei fosfolipidi di membrana. Una volta attivato dalla fosfolipasi A2, può essere metabolizzato attraverso tre enzimi, oltre alla ciclo-ossigenasi (COX), la lipoossigenasi ed il citocromo P450 (CYP) in prodotti biologicamente attivi. Tra i derivati dell'acido arachidonico, il citocromo P450 4A produce l'acido 20-idrossieicosatetrenoico (20-HETE) che sembra svolgere un ruolo rilevante nel vasospasmo associato ad ESA. La formazione di 20-HETE è stimolata dall'angiotensina II (ATII), dall'edotelina, dall'adenosina trifosfato (ATP) e dalla serotonina ed è inibito dall'NO, dalla CO e dai radicali superossido. Il 20-HETE, infatti, è un potente vasocostrittore: attiva la proteinkinasi C (PKC) e la rho chinasi, aumentando la sensibilità dell'apparato contrattile al Ca⁺⁺. Inoltre a sua volta il 20-HETE sembrerebbe modulare la risposta cerebrovascolare a vasodilatatori (es. NO e CO) e a vasocostrittori (AII, endotelina e serotonina) (*Roman RJ- Neurol Res 2006; Koliass AG-J Neurosci Res 2009*). Infine sembra che l'AAA stesso contribuisca al vasospasmo mediando in parte gli effetti citotossici dell'ossiemoglobina (*Takenaka K-Stroke 1993*) sulle cellule endoteliali ed è capace di attivare la PKC (*Khan WA-Cell Signal 1995*). Il complemento attivato svolge in questo senso un ruolo cruciale, accelerando la lisi eritrocitaria ed il rilascio quindi degli stessi di spasmogeni - mentre la sua

deplezione attenuerebbe il vasospasmo sperimentale (*Dumont AS-Neurosurgery 2003*).

Tra gli altri mediatori dell'infiammazione coinvolti si ricorda l'up-regolazione delle molecole di adesione ICAM-1 che favorisce l'interazione tra i leucociti e le selectine endoteliali attraverso carboidrati sialati, che a loro volta favoriscono l'aderenza e il rotolamento degli stessi sull'endotelio. I leucociti si fermano in seguito all'interazione di una loro integrina con l'ICAM-1 endoteliale e a questo punto possono attraversare la parete vascolare (*Frijns CJ-Neurosurgery 2002*). I leucociti attivati isolati dai pazienti con ESA inoltre sarebbero in grado di sintetizzare e di rilasciare ET-1 (*Fassbender K- Stroke 2000*). Vi è inoltre una correlazione tra un aumento di IL-6 liquorale, vasospasmo e DCI (*Muroi C-Acta Neurochir Suppl 2011*) ed un coinvolgimento di altri mediatori come IL-1a; IL -1b, TNF-a, IL 6 ed IL-8 (*Al-Tamini YZ-World Neurosurgery 2010*).

Vi sono infine ipotesi sul coinvolgimento di fattori neurogeni nello sviluppo del vasospasmo associato ad ESA, (*Kolias AG-J Neurosci Res 2009*) anche se vi sono autori che ridimensionano molto il ruolo di questi, poiché secondo loro anche alterazioni drastiche al sistema di innervazione cerebrovascolare non sarebbe in grado di costringere le arterie del circolo del Willis (*Weir B- Acta Neurochir Suppl 1999*). Il ruolo della denervazione è controverso: perché se il sangue danneggia l'innervazione vascolare disattivandola (*Sercombe R-Jpn J Pharmacol 2002*), la denervazione simpatica ridurrebbe il vasospasmo in modelli sperimentali (*Kolias AG-J Neurosci Res 2009; Bunc C-Autonom Neurosci 2001*) e la stimolazione del midollo spinale cervicale potrebbe, costituendo una simpaticetomia funzionale, migliorare il flusso ematico in modelli sperimentali di vasospasmo (*Visocchi M-Stereotact Funct Neurosurg 2011*). Tuttavia occorre anche considerare il sistema trigeminale, che fornisce un'innervazione sensitiva al circolo anteriore e alla maggior parte del circolo posteriore. Il sistema periferico trigeminale include un meccanismo riflesso di rilassamento vascolare mediato dalla sostanza P e dal calcitonine-gene related-peptide (CGRP). Con l'ESA la deplezione del CGRP favorirebbe la vaso-costrizione (*Edvinsson L-Acta Neurol Scand 1994*).

Un altro meccanismo che è stato ipotizzato essere coinvolto nello sviluppo della DCI è un fenomeno noto come cortical spreading depression (CSD). La CSD è

caratterizzata da un'onda autopropagante di depolarizzazione neuronale e gliale che viaggia ad una velocità caratteristica di 2-5mm/min, e che può essere innescata da stimoli diversi come l'ipossia, l'ipotensione, l'ischemia transitoria dovuta alla presenza di microemboli, bassi livelli di glucosio, elevate concentrazioni extracellulari di potassio, la deplezione di ossido nitrico e l'emoglobina libera. Ne consegue una reazione a catena per cui la depolarizzazione di massa libera ioni e neurotrasmettitori - tra i quali gli ioni potassio ed il glutammato - che a loro volta scatenerebbero altre depolarizzazioni portando all'inattivazione neuronale. L'attivazione delle pompe ioniche, volta a ripristinare i gradienti ionici e a ripolarizzare i neuroni, aumenta il fabbisogno di substrati. Nell'encefalo normale la CSD si associa all'aumento del flusso ematico cerebrale e dell'apporto di ossigeno, mentre dopo danno cerebrale l'iperemia associata al CSD si tramuta in una riduzione del flusso ematico cerebrale che viaggia con l'onda di depolarizzazione (spreading ischemia). Si ipotizza quindi che la deplezione energetica relativa alla CSD contribuisca in maniera significativa allo sviluppo della DCI (*Somjen GG-Physiol Rev 2001; Mies G- Exp Neurol 1984; Dhin HK-JCBFM 2006; Strong AJ-Brain 2007; Leng LZ-Arch Neurol 2011*).

L'ESA ed il vasospasmo interessano tutti gli strati della parete arteriosa, compresa l'avventizia, la tonaca media e l'intima (*Pluta RM- J Neurosurg 2005; Findlay JM-Neurosurgery 1989*). L'apoptosi dell'endotelio compromette il sistema di rilascio vascolare da esso mediato ed insieme alla distruzione della lamina basale, favorisce inoltre l'esposizione del muscolo liscio vascolare a sostanze come le piastrine, a spasmogeni ed a stimoli proliferativi (*Borel CO-Stroke 2003; Cahill J-Stroke 2006*). L'ispessimento della parete vascolare quindi non sarebbe solo dovuto ad una contrazione della tonaca media, ma anche ad alterazioni strutturali dovute alla sintesi di matrice extracellulare, alterazioni del fenotipo del muscolo liscio ed alla proliferazione di cellule- anche se l'ordine di grandezza di questi rimodellamenti rispetto alla contrazione del muscolo liscio dovranno ancora essere chiariti (*Zhang ZD-Neurol Res 2006*).

I.4 Trattamenti disponibili

Riduzione delle cause scatenanti

Alla rimozione del coagulo ematico dell'ESA sembra associarsi una riduzione del vasospasmo (*Alaraj A-Neurol Res 2009; Hosoda K-Surg Neurol 1999; Mizukami M-Neurosurgery 1982*), anche se tale asserzione rimane controversa, in particolare dal confronto di serie endovascolari con casistiche chirurgiche (*Ohkuma H-Neurol Res 2009*). Tuttavia l'asportazione chirurgica del coagulo è tecnicamente difficoltosa e spesso incompleta. Per questo motivo sono stati testati svariati protocolli di trombolisi intracisternale o addirittura intraventricolare, con l'utilizzo dell'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA) e dell'urochinasi con alcuni risultati incoraggianti, che tuttavia richiederanno altre conferme (*Ramakrishna R-Neurosurgery 2010; Kinouchi H-Neurol Med Chir Tokyo 2010; Hamada J- Stroke 2003*).

Un altro fronte valutato per ridurre lo sviluppo del vasospasmo riguarda sempre la dinamica liquorale ed ha l'obiettivo sia di diluire e di favorire il *washout* delle sostanze favorenti il vasospasmo a livello subaracnoideo, sia di prevenire lo sviluppo dell'idrocefalo. E' stato descritto il lavaggio cisternale attraverso un metodo di precessione a bassa frequenza e continua del capo e il lavaggio lomboventricolare (*Haenggi D-J Neurosurg 2008*) o attraverso metodiche più semplici, come il mantenimento di una derivazione spinale esterna dopo l'emorragia subaracnoidea per alcuni giorni, sino allo schiarimento del liquor ematico (*Klimo P-J Neurosurg 2004*). Una manovra intraoperatoria che può migliorare la dinamica liquorale è anche la fenestrazione della lamina terminale (*Andaluz N-Neurosurgery 2004*).

Miglioramento del flusso ematico cerebrale

Il vasospasmo è soprattutto un problema emodinamico e la ripercussione maggiore è sul microcircolo cerebrale, in cui si osserva una perdita della capacità di autoregolazione (*Soehle M-Anesth Analg 2004*). La presenza di spasmo periferico è stata rilevata addirittura in alcuni pazienti con ESA che non presentavano vasospasmo a livello del circolo basale (*Hattingen E-Neuroradiology 2008*).

La terapia ‘tripla H’ considerata per molti anni un *golden standard* è stata rivista più recentemente, sia alla luce di mancanti evidenze sulla sua efficacia, sia alla luce dell’esperienza di singoli centri, sia soprattutto preso atto di alcune considerazioni fisiopatologiche (*Treggiari MM-J Neurosurg 2003; Loch Macdonald R-Neurosurg Rev 2006*). La terapia ‘tripla H’ prevede ipervolemia, ipertensione ed emodiluzione. Le complicanze possono essere gravi, come l’edema polmonare, l’ischemia del miocardio, l’iposodiemia, l’edema cerebrale, il renal medullary washout, e l’emorragia cerebrale (*Lee KH- Neurocrit Care 2006*). Mentre non vi sono evidenze certe né per l’ipervolemia (*Loch Macdonald R- Neurosurg Rev 2006*), né per l’emodiluzione (*Asplund K-Cochrane Database of Systematic Reviews 2002*), vi sarebbe invece un razionale nel non correggere l’ipertensione nei pazienti con ESA dopo il trattamento dell’aneurisma e nell’aumentare la pressione arteriosa media di circa 20 mmHg sopra i livelli basali del paziente ad alto rischio di vasospasmo, con valori TCD in aumento o evidenza di vasospasmo (*Egge A-Neurosurg 2002*). Infatti, quando l’autoregolazione è compromessa, un aumento della pressione può aumentare il flusso ematico cerebrale nei territori interessati e clinicamente si può osservare un miglioramento (*Kosnik EJ-J Neurosurgery 1976*).

Trattamenti farmacologici

La nimodipina, un calcio antagonista diidropiridinico dei canali del calcio voltaggio dipendenti, inibisce l’entrata del calcio nelle cellule dotate di questi canali e quindi anche all’interno del muscolo liscio vascolare. L’efficacia è stata dimostrata da svariati studi caso-controllo (randomizzati) (*Allen GS-NEJM 1983, Feigin VL-Cochrane Database 2000 and 2002; Mee E-Neurosurgery 1988, Pickard JD-BMJ 1989*). Quello che si è osservato è un effetto sugli odds di un esito cattivo, mentre la mortalità non è ridotta in maniera significativa. La dose necessaria per ottenere un effetto farmacologico di rilievo per via sistemica sarebbe troppo alta ed il maggiore effetto collaterale di questi farmaci ad elevati dosaggi è l’ipotensione sistemica. Un’ottima efficacia è stata rilevata dall’iniezione selettiva intraarteriosa della nicardipina, un analogo della nimodipina, ad alti dosaggi (*Badjatia N-AJNR 2004*), e l’utilizzo locale di pellets con nicardipina a livello subaracnoideo (*Thomé C-Acta Neurochir Suppl 2011; Schneider UC-Acta Neurochir 2011*).

Sembra tuttavia che la nimodipina più che ridurre lo spasmo angiografico possa avere un effetto neuroprotettivo, migliorando il flusso collaterale e/o migliorando significativamente la reologia (*Loch Macdonald- Neurosurg rev 2007*).

Rilassanti del muscolo liscio

Il Milrinone è un analogo dell'amrinone, un inibitore della fosfodiesterasi III ed è un inotropo non-catecolamminico, non-glicosidico con effetto vasodilatatore diretto e scarso effetto sulla frequenza cardiaca o sulla pressione arteriosa (*Arakawa Y-Neurosurg 2001; Arakawa Y-Neurol Med Chir 2004; Birk S-Eur J Pharmacol 2004*). Nell'uomo, somministrato per via intraarteriosa, può contribuire a ridurre il vasospasmo, anche se gli studi per ora disponibili sono molto preliminari e riguardano casistiche limitate (*Shankar JJ-Neuroradiology 2011; Fraticelli AT-Stroke 2008*). Inoltre sono in corso valutazioni per altre modalità di somministrazione (endovenosa ed intratecale).

Il Fasudil è un inibitore che agisce principalmente sulla rho kinasi, favorendo il rilassamento del muscolo liscio (*Loch Macdonald R-Neurosurg Rev 2006*). La rho kinasi aumenta la sensibilità del sistema contrattile del muscolo liscio al calcio, incrementando quindi la risposta contrattile a un dato stimolo (*Sauzenau V-J Biol Chem 2000*). Da alcuni studi giapponesi la somministrazione endovenosa sembra ridurre il vasospasmo clinico, anche se i pazienti trattati rispetto a quelli con placebo non hanno avuto vantaggi in termini di *outcome* (*Shibuya M – J Neurosurg 1992*).

Antagonisti dell'endotelina

Il Clazosentan è un inibitore selettivo dei recettori ET(A) e sembra avere un notevole effetto sul vasospasmo cerebrale mediato dall'endotelina (*Vatter H-J Neurosurg 2007*). Uno studio di fase IIa aveva evidenziato, nei pazienti trattati con questo farmaco rispetto a quelli che avevano ricevuto il placebo, una riduzione notevole del vasospasmo angiografico (40% rispetto all' 88%), un alleviamento del vasospasmo ottenuto con questo farmaco nella metà dei pazienti inizialmente trattati con placebo e che avevano sviluppato vasospasmo, infine un vantaggio in termini dell'insorgenza di nuove lesioni ischemiche nei pazienti trattati con questo

farmaco rispetto a quelli che avevano ricevuto il placebo (15% rispetto a 45%) (*Vajkoczy P- J Neurosurg 2005*). Purtroppo però questi risultati non hanno trovato conferma in uno studio di fase III in termini di *outcome* e di sopravvivenza dei pazienti trattati, in cui tra l'altro si è rilevata la presenza di alcuni effetti collaterali. Gli autori, confermano l'ipotesi che vi possano essere vari fattori, oltre allo spasmo delle grandi arterie, che hanno un peso nello sviluppo del danno ischemico tardivo: l'embolia da microtobi, disfunzioni a carico del microcircolo, l'ischemia corticale *spreading* ed il danno neuronale tardivo - oltre a sicuramente i danni dovuti alla gravità dell'emorragia iniziale (*Macdonald RL- the Lancet Neurol 2011*).

Trattamento endovascolare

Il trattamento endovascolare è utilizzato quando il vasospasmo è già in corso e ha l'obiettivo di migliorare l'emodinamica per prevenire danni ischemici (*McGuinness B-Neurosurg Clin N Am 2010*). L'angioplastica con palloncino è utilizzata in genere nei casi nei quali in genere l'aneurisma è stato trattato ed il vasospasmo è sintomatico e non responsivo alle terapie mediche. La dilatazione dell'arteria così trattata sembra durevole, il miglioramento neurologico è del 31-80%, ma le complicanze riportate raggiungono il 5% ed includono la rottura dell'arteria, che può essere fatale o perlomeno provocare un'ischemia se l'arteria dev'essere chiusa (*Loch Macdonald- Neurosurg Rev 2006*). L'infusione di papaverina intra-arteriosa per cateterismo selettivo invece ha spesso un effetto più blando, meno duraturo e la procedura può richiedere di essere ripetuta - ma anche qui gli effetti collaterali non sono trascurabili ed includono un aumento della pressione intracranica e l'infarto cerebrale (*Smith WS-Stroke 2004*). Per questo la papaverina è riservata ai casi nei quali il tratto di arteria con vasospasmo non è trattabile con l'angioplastica. Per il loro profilo farmacologico più sicuro rispetto alla papaverina, recentemente si utilizzano gli antagonisti del canale del calcio, come la nimodipina e la nicardipina (*Biondi A-AJNR 2004; Badjatia N-AJNR 2004*). Si è osservata una frequenza di miglioramento clinico più elevata rispetto a quella del miglioramento del vasospasmo. L'unico effetto collaterale da tenere in considerazione è un aumento della pressione intracranica in una percentuale significativa di casi (30% circa). Altri agenti vasodilatatori sperimentati per via endovascolare includono il verapamil, il milrinone, il fasudil, il colforsin daropato (*Sayama CM-Neurosurg*

Focus 2006). Un punto cruciale per il trattamento endovascolare del vasospasmo cerebrale è il timing: più è precoce e maggiore la probabilità di ottenere una buona risposta clinica e di evitare deficit neurologici (*Bejjani GK-Neurosurgery 1998; Eskridge JM-Neurosurgery 1998*). Questo vale sia per i farmaci intra-arteriosi, sia per l'angioplastica - quest'ultima notoriamente utilizzata per lo spasmo resistente, ma con i fenomeni di rimodellamento dell'arteria aumentano anche i rischi di rottura della stessa durante la dilatazione.

Neuroprotettori ed anti-infiammatori

Il razionale dei neuro-protettori è basato sul fatto che la perossidazione lipidica è considerata un fattore rilevante sia del restringimento arterioso nel vasospasmo sia nella cascata finale di morte cellulare per ischemia (*Treggiari-Venzi MM-Neurosurg 2001*).

Il Tirilazad è uno steroide a 21-aminoacidi sviluppato per ottimizzare gli effetti benefici, come quello antiossidante degli steroidi e ridurre gli effetti collaterali dei glucocorticoidi: ha un'azione anti-perossidazione lipidica, che include sia un'azione scavenger dei radicali liberi, sia una stabilizzazione della membrana (*Hall D-Stroke 1988*).

In una revisione sistematica della letteratura con l'estrazione di dati da 5 studi in doppio cieco caso-controllo per un totale di quasi 4000 pazienti non si è potuto evincere che questo farmaco, aggiunto alla nimodipina, possa ridurre la mortalità o l'esito infausto nei pazienti con ESA, né che sia in grado di ridurre l'incidenza di infarto cerebrale dovuto al vasospasmo - mentre invece sembrerebbe ridurre la frequenza di vasospasmo sintomatico secondario nei pazienti con ESA (*Zhang S - Cochrane Database Syst Rev 2010*).

Per quanto riguarda gli antiinfiammatori si è osservato che i farmaci anti-infiammatori non steroidei, a livello sperimentale, riducono le alterazioni ultrastrutturali a livello delle pareti vascolari se somministrati entro 6 ore dall'emorragia (*Frazier JL-J Neurosurg 2004*). Il cortisone ad elevati dosaggi è stato associato in uno studio pilota, in doppio cieco, caso-controllo, randomizzato su pazienti, ad un apparente miglior outcome in termini di DCI, di miglior esito neurologico e di ridotta mortalità - pur non influenzando sull'incidenza del vasospasmo (*Gomis F-J Neurosurg 2010*).

Le statine

Le statine, note anche come inibitori dell'HMG-CoA riduttasi, un enzima chiave nella sintesi del colesterolo, diminuiscono i livelli di low density lipoproteins (LDL) nel sangue, ma svolgono anche effetti pleiotropi: a livello della funzione endoteliale aumentano la sintesi del nitrossido (NO) (noto per gli effetti vasodilatatori, antitrombotici, anti-infiammatori ed antimitogeni); riducono il rilascio dell'endotelina 1 (nota per i suoi effetti vasocostrittori, protrombotici e mitogeni), riducono gli effetti di Rha e di altre attività potenzialmente vasocostrittrici ed aumentano i livelli di cellule progenitrici endoteliali circolanti. Svolgono inoltre molteplici azioni anti-infiammatorie: riducono i livelli di proteina C-reattiva, di mieloperossidasi, di citochine infiammatorie comprese l'interleuchina (IL) 1,6,8, aumentano le citochine anti-infiammatorie come IL 10, diminuiscono l'adesione dei leucociti inibendo LFA-1, aumentano la sintesi del NO da eNOS e riducono quella derivante da iNOS. Svolgono effetti anti-ossidanti, riducendo la produzione di radicali liberi dell'ossigeno e la produzione di perossinitriti, riducono i recettori per l'angiotensina e riducono i livelli della NADPH-ossidasi. Hanno effetti anti-trombotici, riducendo l'aggregazione e l'adesione delle piastrine, la viscosità del sangue, aumentando i livelli dell'attivatore tissutale del plasminogeno e della trombomodulina, riducendo l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno-1 e il fattore von Wildebrandt (vWF) tissutale. Infine svolgono un'azione protettiva sia sui vasi, riducendo i livelli di metalloproteinasi della matrice (mMMPs) sia sui neuroni, aumentando la sinaptogenesi e la neurogenesi (*Macdonald RL-World Neurosurgery 2010*).

Da una revisione accurata della letteratura sull'utilizzo delle statine nell'emorragia subaracnoidea emerge che anche se con meccanismi non ancora ben esplicitati, le statine sembrerebbero ridurre il rischio di vasospasmo sintomatico nei pazienti con ESA, senza significativi effetti collaterali (*Macdonald RL-World Neurosurgery 2010*). Tuttavia questo punto merita nuovi approfondimenti con studi randomizzati controllati e ricerche in vivo e in vitro che ne chiariscano meglio i meccanismi d'azione. Gli autori rilevano la bassa numerosità dei pazienti studiati, e i possibili fattori confondenti negli studi retrospettivi per cui l'utilità sembrerebbe controversa.

Eritropoietina

L'eritropoietina (EPO) è una sialoglicoproteina a 165 aminoacidi, sintetizzata nel feto a livello epatico e nell'adulto a livello renale, identificata inizialmente come principale promotore dell'eritropoiesi (*Arcasoy ML-Br J Haematol 2008; Fisher JW-Exp Biol Med 2010*) per cui è stata inizialmente utilizzata per trattare l'anemia nei pazienti dializzati con grave insufficienza renale (*Strippoli GF- Cochran Database Syst Rev 2006*). Altre applicazioni, per esempio, volte a ridurre la necessità di trasfusione nei pazienti oncologici, ne hanno evidenziato soprattutto effetti negativi con l'aumentato rischio di eventi tromboembolici in questi pazienti ed il dubbio, non dimostrato però, che il trattamento interferisse con la risposta tumorale e la sopravvivenza *overall* (*Bohlius J-Cochrane Database Syst Rev 2006*). Recentemente l'EPO ed il suo recettore sono stati dimostrati in una varietà di cellule inclusi i neuroni, la glia, le cellule neuroprogenitrici e le cellule endoteliali a livello cerebrovascolare. Sembra inoltre che i livelli di espressione sia dell'eritropoietina, sia del suo recettore siano aumentati a livello del sistema nervoso centrale dopo trauma cranico, ictus ischemico ed emorragia subaracnoidea. Il meccanismo d'azione non è completamente chiarito, anche se la via di trasduzione del segnale include una via Janus- tirosin-2 chinasi con attivazione della fosfatidilinositolo 3-chinasi e di Akt ed eNOS- quindi aumentando anche la produzione di NO a livello endoteliale. L'effetto protettivo sembrerebbe includere la neuroprotezione, ed una protezione vascolare, l'inibizione dell'apoptosi, una riduzione dell'infiammazione sino all'aumentata neuro ed angiogenesi (*Jerndal M- J Cereb Blood Flow Metab 2010; Velly L-Pharmacol Ther 2010; Macdonald RL- World Neurosurg 2010; Santhanam AV- Stroke 2005*). Inoltre si stanno sviluppando molecole con gli epitopi dell'EPO che mediano la protezione tissutale, prive dell'effetto eritropoietico, teoricamente degli effetti collaterali correlati ma forse anche di alcuni effetti positivi come una riduzione della permeabilità della barriera ematoencefalica, gli effetti sull'endotelio e l'angiogenesi (*Velly L-Pharmacol Ther 2010*).

Uno studio randomizzato in doppio cieco e caso-controllo, nel quale il trattamento consisteva di una somministrazione di 90.000 U di eritropoietina (EPO) nell'arco di 48 ore, ha evidenziato una riduzione significativa del vasospasmo grave,

dell'incidenza del danno ischemico e dell'infarto cerebrale tardivo (DCI) (*Tseng MY-J Neurosurg 2009*). Sembra inoltre che questo effetto benefico possa essere ridotto dall'età avanzata e dallo stato settico, e invece potenziato dall'utilizzo di statine (*Tseng MY- J Neurosurg 2010*).

L'utilizzo dell'eritropoietina sembra comunque un approccio interessante e meritevole di approfondimenti.

Altri principi attivi studiati in maniera preliminare includono sostanze che agiscono sul sistema vasodilatatore mediato dall'NO, come il nitrito di sodio o altri donatori di NO che però non presentino i rischi di effetti collaterali come il nitroprussiato di sodio (*Pluta RM-Surg Neurol 2008*).

Infine il magnesio, noto come neuroprotettore, in quanto inibisce il rilascio di ammino-acidi eccitatori come il glutammato e blocca i canali del recettore del glutammato NMDA e i canali del calcio voltaggio-dipendenti (*Van der Bergh WM-Magn Res 2004; Zhao XD-J Clin Neurosci 2009*) è stato sperimentato per la prevenzione del vasospasmo con varie modalità di somministrazione: intra-venosa, intraarteriosa e intracisternale (*Muroi C- Surg Neurol 2008; Weant KA Pharmacotherapy 2010; Mori K-Neurol Med Chir Tokyo 2009*). Ad elevati dosaggi il magnesio intravenoso sembra avere un effetto positivo in termini di minore incidenza di vasospasmo ed in termini di outcome, anche se è assolutamente consigliabile conseguire la somministrazione sotto monitoraggio, in terapia intensiva e con frequente controllo degli elettroliti - poiché il magnesio in associazione alla nimodipina e ad altri farmaci potrebbe avere effetti collaterali come l'ipocalcemia, l'ipotensione, bradicardia e disturbi respiratori (*Muroi C-Surg Neurol 2008*). Sarebbero utili studi randomizzati, in doppio cieco e su casistiche più numerose per confermare tali risultati.

Nonostante tutti questi trattamenti in corso o in fase di studio, l'*outcome* dei pazienti con ESA è rimasto sostanzialmente invariato con i tassi di mortalità e morbilità citati sopra.

1.5 Le cellule staminali

Le cellule staminali hanno il potenziale di trasformarsi in diversi tipi cellulari durante le fasi precoci della vita e nell'adulto conservano il potenziale di fornire un sistema di riparazione al tessuto di origine. Quando queste cellule si dividono, ogni nuovo elemento ha il potenziale di rimanere una cellula staminale o di differenziarsi in una cellula con una funzione più specializzata. La divisione di una cellula staminale quindi tipicamente è asimmetrica in questo senso.

Le caratteristiche che contraddistinguono le cellule staminali sono quindi il fatto di potere dare origine a diverse tipologie cellulari (specializzate) e di essere in grado di autorinnovarsi.

Classicamente le cellule staminali si suddividono in embrionali ed in adulte. Inoltre dal 2006 sono state create le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC), delle cellule tissutali adulte somatiche (tipicamente fibroblasti) riprogrammate geneticamente per assumere lo stato di cellula staminale pluripotente. (<http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics7.asp>)

In questi ultimi anni lo studio delle cellule staminali ha vissuto un enorme sviluppo per il campo della medicina riparativa e rigenerativa. I processi rigenerativi possono essere distinti in fisiologici, volti a mantenere l'omeostasi, e riparativi, cioè volti a far fronte a processi patologici (*Martino G-Physiol Rev 2011*).

Le cellule staminali adulte sono note per risiedere nella 'nicchia staminale' di un organo ed per essere in grado di rigenerarne tutte o parte delle cellule che lo compongono: le caratteristiche intrinseche della 'nicchia' sono probabilmente la conseguenza dell'adattamento delle cellule staminali ai diversi tessuti in maturazione (*Ohlstein B-Curr Opin Cell Biol 2004*). Con la scoperta dell'epigenetica si è valorizzata l'espressione dei geni in relazione a stimoli ambientali, conquistando una chiave fondamentale per una nuova comprensione delle patologie e di nuovi approcci terapeutici (*Feinberg AF- Nature 2007*). I segnali per la differenziazione di una cellula staminale possono essere di vario tipo, umorale, cellulare etc, e stimolano l'espressione di caratteristiche epigenetiche del DNA che ne restringono l'espressione, rendendola anche trasmissibile alla progenie (<http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics7.asp>). I tessuti 'labili' come per esempio la pelle, la cornea ed il sangue contengono molte nicchie disperse al suo interno (le cripte intestinali o il bulbo nel follicolo pilifero). In altri tessuti - come il rene ed il

fegato – non sono state chiaramente identificate ancora queste nicchie, anche se per esempio nel fegato si suppone l'esistenza di cellule staminali-simili ed il grosso della rigenerazione avviene per proliferazione della popolazione cellulare matura che compone la parte integra dell'organo. In parallelo la rigenerazione nei tessuti labili sarebbe favorita dalla persistenza di nicchie di cellule staminali integre o di cosiddette nicchie facoltative (*Martino G-Physiol Rev 2011*).

Le terapie basate sulle cellule staminali classicamente ne prevedono il trapianto. Questo può avvenire attraverso varie vie: iniezione nel torrente sanguigno (arterioso o venoso), sistemica o con cateterismo selettivo, od iniezione locale (nel SNC per via stereotassica per esempio o intracavitaria) o per via liquorale.

Tuttavia il trapianto di cellule staminali a scopo terapeutico ha numerosi rischi: la differenziazione e la proliferazione inappropriata - per esempio le cellule progenitrici neurali potrebbero dare origine ad astrogliosi e aumentare quindi la cicatrice gliale e la tumorigenicità, il rischio del rigetto e la loro elevata mortalità come conseguenza della risposta ad un ambiente sfavorevole- quale può essere il SNC danneggiato e a questo si associano i rischi del trapianto stesso (*Blum V- Cell Cycle 2009; Master Z- J Med Ethics 2007*).

I meccanismi terapeutici delle staminali, per esempio all'interno del tessuto nervoso, si possono riassumere sostanzialmente in 4 punti: produzione di neurotrofine (es. NGF, BDNF, VEGF), ricostituzione cellulare (singola tipologia di cellule verso tipologie multiple di cellule - malattia di huntington verso stroke o trauma), immunomodulazione (es. citochine che favoriscono l'immunità neuroprotettrice o la prevalenza di popolazioni linfocitarie rispetto ad altre) e rescue - cioè reclutamento di cellule progenitrici endogene (*Martino G- Physiol Rev 2011*).

1.6 Le cellule progenitrici neurali

In questi anni recenti è stato rivisto il dogma secondo il quale il sistema nervoso centrale (SNC) adulto possa mantenere la sua plasticità a livello sinaptico. In realtà si può osservare la rigenerazione assonale e il potenziale per il rinnovo cellulare (*Davies SJ – Nature 1997; Gage FH-Science 2000; Schwarz SC-Transl Res 2010; Martino G- Physiol Rev 2011*). Sembrerebbe che all'interno del sistema nervoso le cellule progenitrici neurali (NPC) possano interagire con il sistema immunitario, modulandone la risposta attraverso svariate molecole (sostanze immunomodulatrici,

fattori di crescita neurotrofici e regolatori di cellule staminali) (*Li L- Annu Rev Cell Dev Biol 2005; Madouvan L- Stem Cells 2008*). Uno dei problemi fondamentali negli studi basati sulle cellule NPC riguarda la complessità del loro reperimento- e la complessità del loro potenziale comportamento nell'uomo rispetto anche agli studi in vitro ed un vivo (*Conti L- Nat Rev Neurosci 2005*). L'espressione costitutiva di queste molecole modulatrici e la loro natura intesa come pleiotropismo e rindondanza potrebbero anche spiegare come altri tipi di cellule staminali somatiche, come per esempio le cellule staminali mesenchimali (MSC), dotate di pressochè trascurabili capacità di transdifferenziamento, possano svolgere un ruolo cruciale nella riparazione del SNC (*Chen J- PNAS 2004; Zawadzka M- Cell Stem Cell 2010*) provando la loro capacità di adattarsi all'ambiente (plasticità). Da queste osservazioni è cresciuto l'interesse per il potenziale delle MSC per la modulazione del danno e la riparazione delle patologie che colpiscono il SNC (*Azari MF- Curr Neuropharmacol 2010*).

Nello stesso tempo sempre maggior interesse è rivolto al reclutamento endogeno delle cellule staminali sfruttando le crescenti conoscenze nell'ambito dell'epigenetica (*Qureshi IA-Arch Neurol 2011*)

1.7 Le cellule staminali mesenchimali

Il mesenchima è il tessuto connettivo lasso di un embrione sostanzialmente derivato dal foglietto mesodermico che poi nell'adulto darà origine a gran parte dei tessuti connettivi e la definizione è spesso estesa ad indicare le cellule del tessuto connettivo (miofibroblasti, osso, cartilagine, tessuto adiposo, tendini, muscoli e tessuto nervoso). Molti tessuti mesenchimali contengono cellule precursori *lineage directed* già *committed* (MPC) che partecipano alla rigenerazione locale - per esempio le cellule satelliti nel muscolo scheletrico o i progenitori adiposi nel tessuto adiposo. Inoltre ci sono anche dei precursori non ancora '*committed*' in grado di generare tessuti mesenchimali diversi da quelli in cui loro stessi stanno. In realtà le cellule mesenchimali rappresentano un sottogruppo di precursori che aderisce alla definizione di staminalità, intesa come capacità di autorinnovarsi, di differenziarsi in linee cellulari diverse e di ricostituire in vivo dei tessuti dai quali origina (*Verfaillie CM-J Cell Biol 2002*). In realtà i termini MSC e MPC vengono frequentemente interscambiati. Quindi, quelle che correntemente si denominano

‘MSC’ in realtà sarebbero delle MPC. Di seguito si utilizzerà come in uso corrente il termine MSC (intendendo però le MPC in senso più rigoroso). Tuttavia recentemente è stata trovata una definizione unificata secondo la quale la cellula MSC dovrebbe sia avere proprietà stromali sia ematopoietiche, sia capacità immunomodulanti (*Chabord P-Human Gene Therapy 2010*).

Oltre ad essere presenti nei tessuti di origine mesenchimali le MSC sono presenti nel midollo osseo, dove svolgono un ruolo di supporto alle cellule ematopoietiche (*Kok ON-J Clin Oncol 2002*). Inoltre si è osservato che cellule mononucleate originate da aspirato midollare dessero origine, in particolari consizioni di coltura, ad elementi di origine mesenchimale - come osteociti, adipociti etc. (*Minguell JJ-Exp Biol Med 2001*). Questi e simili risultati suggeriscono che a livello del midollo osseo vi sia in realtà una popolazione mista di elementi di cellule progenitrici ‘committed’ o non e capace del differenziamento su due o tre linee cellulari diverse. I marcatori per le MSC sono quindi piuttosto variabili e non vi è un consenso davvero univoco. Per esempio Stro-1 è un marcatore che caratterizza le cellule stromali del midollo (*Simmons PJ-Blood 1991*) - che tuttavia marca anche i periciti. Inoltre queste cellule devono essere negative per i seguenti antigeni: CD-45, CD-34 e CD-14 o per molecole co-stimolatorie come CD-80, CD-86 e CD-40. Possono invece esprimere livelli variabili di CD-105 (endoglina), CD-44, CD-71 (recettore per la transferrina), il ganglioside GD2 e CD-271 (recettore a bassa affinità per il NGF), CD-90 (THY1) e CD-73 (una ecto-5'-nucleotidasi) (*Uccelli A-Nat Rev Immunol 2008*).

Vi sono molteplici evidenze che le MSC infuse per via sistemica possano, oltre a rifornire il midollo osseo, supportare anche quelle a livello dei tessuti mesenchimali periferici (*Roufosse CA- IJBCB 2004*). Infine sembra che queste cellule possano essere mobilizzate nel comparto vascolare da citochine proinfiammatorie per favorirne l’homing a livello delle sedi di danno tissutale (*Hannoush EJ-J Trauma 2011*). Come per altri tipi cellulari il loro ruolo principale sarebbe soprattutto relativo alla produzione di fattori localmente bioattivi, con la funzione di modulare la risposta infiammatoria, inibire la fibrosi e l’apoptosi, stimolare l’angiogenesi e stimolare la mitosi e la differenziazione delle cellule riparatrici o staminali intrinseche del tessuto (*Caplan AI-J Cell Biochem 2006*).

Anche nella patologia ischemica cerebrale studi preclinici e clinici sembrano dimostrare l'efficacia di queste cellule nella modulazione del danno tissutale (*Chen J-Circ Res 2003; Chopp M-Lancet Neurol 2002*).

1.8 Le cellule progenitrici endoteliali

Le cellule progenitrici endoteliali (EPC) per l'angiogenesi sono state descritte in dettaglio da poco più di dieci anni come cellule CD-34 positive isolate dal sangue umano periferico in grado di crescere su un substrato di fibronectina, con caratteristiche endoteliali (*Asahara T-Science 1997*).

In seguito sono stati identificati tre antigeni che caratterizzano le EPC precoci (early) funzionali: il CD-133 che è un marcatore precoce delle cellule staminali ematopoietiche, il vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) detto anche chinase insert domain receptor (KDR) o Flk-1 ed infine il CD-34 (*Peichev M-Blood 2000*).

Alcuni autori specificano che queste cellule risiedono nella frazione non ematopoietica e che quindi debbano essere negative per il comune antigene leucocitario CD-45.

Un'altra caratteristica sarebbe che queste cellule debbano essere negative per un antigene non specifico, ma che caratterizza gli endoteli maturi, come la VE-Cadherina (VE-CAD)

Oltre a questi antigeni le EPC possono esprimere anche altri antigeni come il CD-31 o il vWF (*Hristov M-TCM 2003*).

Uno dei maggiori problemi che si affrontano nell'affacciarsi sulla letteratura che riguarda queste cellule è la molteplicità delle definizioni e dei criteri di inclusione antigenica, delle caratteristiche colturali e funzionali utilizzate (*Fadini FP-Atherosclerosis 2008*).

Inizialmente si riteneva che queste cellule derivassero esclusivamente dal midollo osseo, ma è stato dimostrato che vi sono fonti alternative, inclusi gli organi parenchimosi ed i vasi sanguinei (*Ergun S-Circ Res 2007; Aicher A-Circ Res 2007*). Il midollo osseo contiene due popolazioni di progenitori: quella mesenchimale e quella ematopoietica.

Nel sangue queste cellule rappresentano nell'adulto lo 0,01% delle cellule mononucleate in condizioni 'steady state' (*Gehling UM-Blood 2000*). La percentuale di cellule che esprimano contemporaneamente il CD-133 ed il VEGFR-2 corrisponderebbe circa allo 0.2-5% di tutte le cellule CD34+ il che significherebbe meno dello 0.0025% dei globuli bianchi (*Hunting BB-Vox Sang 2005*).

Nell'ambito della fisiologia normale queste cellule si riscontrano in numeri aumentati in caso di pazienti giovani e che esercitano attività fisica (*Thijssen DH-Front Biosci 2009*)

Tuttavia queste cellule sono mobilizzate nel sangue in caso soprattutto di patologia vascolare acuta o cronica, vascolare, infettiva ma anche neoplastica, sottolineando l'importanza del turnover endoteliale (*Chironi G-Atherosclerosis 2007; Hunting CB-Vox Sang 2005*).

Inoltre i livelli di queste cellule sembrano avere un ruolo prognostico per la patologia vascolare sia a livello cardiaco (*Werner N-NEJM 2005; Schmidt-Lucke C-Circulation 2005; Vasa M- Circ Res 2001*), sia a livello cerebrale (*Ghani U-Stroke 2005; Cesari F-JCBFM 2009*).

Per la loro affinità con l'endotelio e per la loro dinamicità fisiologica e patologica o potenzialmente iatrogena- nel senso di 'indotta da farmaci' queste cellule rivestono attualmente un enorme interesse sia in termini di marcatori, sia in termini prognostici, sia infine come terapia cellulare. Alcuni autori parlano di uno shift potenziale da concetti fisiopatogenetici a quelli terapeutici per cui sembra che i pazienti con eventi vascolari come l'aterosclerosi abbiano livelli più bassi di EPC e pazienti con eventi ischemici potrebbero trarre beneficio dalla terapia con le EPC (*Rhoul RP-Stroke 2008*).

Risultati in vivo hanno già evidenziato la loro efficacia nella patologia ischemica miocardica (*Schuh A-Basic Res Cardiol-2007*) e cerebrale (*Harrigan MR-Neurosurgery 2002*)

Le cellule staminali e la mobilizzazione

Il problema dell'utilizzo delle cellule staminali per le patologie acute potrebbe concernere la tempistica della loro efficacia rispetto all'evoluzione del danno. Tuttavia studi recenti nell'ambito dell'ictus ischemico hanno evidenziato che le

cellule staminali possono svolgere un'azione che va oltre la classica finestra farmacologica. Sembrerebbe che il loro effetto bystander ed immunomodulatore segua la cascata delle risposte che seguono al danno, modulandole e soprattutto modulando anche la riparazione e la rigenerazione nella fase tardiva (*Bacigaluppi M- Brain 2009; Wojanowski W-Leukemia 2010*).

Infine il trattamento con le MSC e ancora più chiaramente quello con le EPC potrebbe rivestire un grandissimo interesse considerando che queste cellule possono essere mobilizzate anche farmacologicamente dai reservoir autologhi e quindi evitando i rischi relativi al trapianto.

Farmaci e citochine come statine ed eritropoietina, il platelet derived growth factor (PDGF) ed il vascular endothelial growth factor (VEGF) (*Li X-JCI-2005; Wang Y-Brain 2005; Hannoush EJ-J Trauma 2011; Dimmeler S-JCI 2001; Levadot J-JCI 2001*) per esempio, hanno un effetto mobilizzatore sulle EPC aumentandone i livelli circolanti e potrebbero essere quindi utilizzati in maniera selettiva - valutando l'insieme degli effetti pleiotrofi e collaterali- per indurre una terapia autologa con cellule staminali.

II. Il progetto

Considerando l'emergente importanza delle cellule progenitrici endoteliali nella patologia cardiovascolare e recenti osservazioni nell'ambito dell'ischemia cerebrale, insieme con recenti evidenze dall'utilizzo delle statine e dell'eritropoietina sia per l'ischemia cerebrale sia per la modulazione dei danni associati all'ESA- ma anche gli scetticismi nei confronti di questi trattamenti, quali il vasospasmo ed il danno ischemico tardivo, si è voluto studiare ed analizzare il potenziale delle EPC per pazienti affetti da vasospasmo post-ESA.

Donnan nella Feinberg Lecture pubblicata su Stroke nel 2008, segna i criteri 'road map' per lo sviluppo di nuovi neuroprotettori per il danno ischemico cerebrale: secondo lui le strategie di ricerca traslazionale dovrebbero includere maggiori verifiche di efficacia in modelli animali, l'evidenza in vivo su colture cellulari umane o su brain slices ed infine la dimostrazione dell'efficacia su nuovi modelli di ischemia umana prima di intraprendere studi clinici su larga scala (*Donnan GA-Stroke 2008*).

Un po' con questo spirito è stato formulato il progetto per lo studio del potenziale ruolo delle cellule progenitrici endoteliali nel vasospasmo cerebrale che illustro di seguito e del quale questa tesi di dottorato rappresenta un inizio.

Il progetto prevede un approccio multiscala allo studio del potenziale delle staminali per il vasospasmo cerebrale che include una parte di studio osservazionale su pazienti affetti da ESA, una parte in vitro ed una parte in vivo.

III. Disegno dello studio

Obiettivo dello studio:

Obiettivo di questo studio è stato valutare il potenziale terapeutico delle cellule staminali/progenitrici circolanti quali le cellule progenitrici endoteliali (EPC) o potenzialmente circolanti quali le cellule staminali mesenchimali (MSC) nei pazienti con emorragia subaracnoidea (ESA) nella prevenzione o nell'attenuazione del vasospasmo e dei danni ischemici tardivi.

La conferma della nostra ipotesi giustificherebbe una terapia con cellule staminali endogene farmaco-mediata ed ulteriori studi su eventuali farmaci già approvati nell'uomo, noti per avere come effetto a latere la mobilizzazione di questi elementi nel sangue.

Le statine per esempio sono note per questa caratteristica, ma il loro utilizzo ad elevati dosaggi in questi pazienti non è ancora stato giustificato dagli studi clinici e preclinici disponibili. Un altro farmaco, più controverso per i suoi effetti collaterali, sarebbe l'eritropoietina.

Dato il ruolo emergente del danno ischemico tardivo come esito da stress da ipoperfusione multifattoriale (arresto del circolo cerebrale da ipertensione endocranica in acuto al momento del sanguinamento, inattivazione dei sistemi di autoregolazione del circolo ematico a livello cerebrale distale, vasospasmo, microembolia) in questi pazienti nell'outcome, abbiamo valutato l'efficacia delle cellule staminali di cui sopra nel rescue neuronale in un modello in vitro di danno ischemico ottenuto tramite deprivazione di ossigeno e glucosio (DOG).

Una prima parte degli esperimenti in vitro era quindi dedicata al *set-up* dello stimolo DOG sui neuroni, testando diversi tempi di esposizione allo stimolo e valutando anche separatamente l'impatto della deprivazione di ossigeno, quello della deprivazione di glucosio od entrambi insieme.

L'*outcome* è stato valutato in termini qualitativi sulla morfologia dei neuroni in coltura ed in termini quantitativi sulla sopravvivenza neuronale a 24 e a 96 ore e a 7 giorni dall'induzione del danno.

Una volta messo a punto quindi il sistema migliore per indurre un danno ischemico ai neuroni in coltura abbiamo testato l'efficacia del trattamento mediante cellule staminali mesenchimali o cellule progenitrici endoteliali (con medium condizionato o con inserto) nel ridurre la morte neuronale e le alterazioni morfologiche.

In pazienti affetti da ESA da rottura di aneurisma, con e senza vasospasmo, si è invece valutato il ruolo delle cellule EPC circolanti come fattore protettivo dalla comparsa di vasospasmo. Sono stati quindi eseguiti dei dosaggi seriati di queste cellule su campioni ematici raccolti in quattro momenti successivi alla comparsa dell'ESA, corrispondenti alle fasi del vasospasmo: al momento del ricovero (T0), in 4. giornata (fase di eventuale pre-vasospasmo o iniziale spasmo), in 7. giornata (fase del picco di vasospasmo) ed infine in 10-11. giornata (quando il vasospasmo potrebbe essere in riduzione). L'obiettivo era di valutare se i livelli di progenitori endoteliali fossero diversi tra i pazienti con e senza vasospasmo, indipendentemente da altre variabili.

Dopo alcune prove per valutare la possibilità di individuare tramite citofluoimetria la presenza di EPC nel sangue periferico abbiamo osservato, utilizzando diversi protocolli descritti in letteratura, che la metodica ha un range di sensibilità almeno 10 volte inferiore a quanto richiesto per la valutazione delle EPC, trattandosi di una popolazione estremamente rara. Per questo motivo abbiamo eseguito una valutazione con qRT-PCR dell'RNA relativo agli antigeni che caratterizzano queste cellule. Abbiamo quindi potuto osservare in un limitato campione di pazienti campionati che potrebbero esserci delle differenze significative, ma da confermare con numeri più elevati: i pazienti che non sviluppano vasospasmo hanno una maggiore espressione degli antigeni relativi a questa popolazione a partire dalla 4.giornata.

Studi futuri saranno quindi volti a valutare:

A livello clinico

- su un numero maggiore di pazienti la conferma della relazione tra EPC e vasospasmo.
- la correlazione tra statine, EPC e vasospasmo-danno ischemico tardivo.
- il timing della mobilizzazione delle EPC con le statine o con altri farmaci.

In modelli in vivo di vasospasmo (es. iniezione di sangue arterioso nella cisterna prechiasmatica nel ratto) - prendendo in considerazione sia lo sviluppo o meno del vasospasmo, sia il danno ischemico tardivo:

- l'efficacia ed i meccanismi delle EPC somministrate per via venosa.
- l'efficacia di farmaci che mobilizzino queste cellule.

IV. Materiali e Metodi

Modello d' ischemia in vitro e metodi di trattamento

Colture primarie di neuroni corticali

I neuroni corticali sono stati ottenuti come in precedenza descritto (*Meloni BP-Brain Res 2002*) e nel rispetto delle procedure europee (European Communities Council Directive 86/609/EEC), dal tessuto cerebrale di embrioni di ratto Sprague Dawley al giorno E18 di gestazione. Durante la fase di estrazione, tutte le parti utilizzate devono essere conservate in ghiaccio per ridurre al massimo l'eventuale sofferenza neuronale. La procedura viene eseguita al microscopio ottico sotto cappa sterile.

Una volta estratto, l'encefalo di embrioni di ratto, è raccolto in una dish da 60 mm in HBBS (*Hanks Blanced Salt Solution HBSS, GIBCO 14170*) freddo. Si separano gli emisferi, si rimuove l'aracnoide e si pongono gli emisferi in una nuova dish da 60 mm con 5ml di HBSS freddo. Le cortecce devono essere sminuzzate meccanicamente e raccolte in una Falcon da 15 ml contenete 10ml di HBSS (sempre mantenuta anch'essa in ghiaccio). Si centrifuga quindi il tessuto per 1 minuto a 200xg a 4°C. Sotto cappa viene poi rimosso l'HBSS ed aggiunto 5ml di tripsina in quantità 0,25% e 25iL di 1% DNAasi (400-800 KunizU/mg) ed incubato a 37°C per 20 minuti.

Si rimuovono quindi la tripsina e la DNAasi aggiungendo 5mL di FBS (non scomplementato) per 2 minuti e centrifugando per un minuto a 200g. A questo punto si rimuove il FBS e si aggiungono 5ml di terreno NBM-A completo (*GIBCO 1088*), preparato utilizzando 2mM L-Glut (200mM), 2% B27, 1% pen/strep. Si pipetta per 15 volte con una pipetta da 5ml e per 10 volte con una Pasteur di vetro leggermente rastremata a fiamma. Infine si fa passare la soluzione cellulare in un cell strainer da 70um (BD) che si recupera in una Falcon (BD) da 15 ml. Si centrifuga quindi per 5 minuti a 400xg, si elimina il NBM-A che si sostituisce con 20 ml di nuovo terreno. Si prelevano a questo punto 20uL di sospensione diluendola in 180uL di NBM-A. Da questa si prelevano 10uL e si pongono nella camera di Burker per la conta cellulare.

Si piastrano 700.000 neuroni per pozzetto in una multiwell da 12 e 1.500.000 neuroni/ dish nelle dish da 35mm. Per favorire l'adesione cellulare è importante

‘poli-lisinare’ le piastre, preparandole come segue: incubazione over night (O.N.) a 37°C con 1,8ml di soluzione per ogni pozzetto di una multiwell da 12 (0,1mg/ml Poli D Lisina Hydrobromide- *Sigma P0899 pm 700000-150.000* - in buffer borato pH 8,4) o 2,5ml di soluzione per ogni dish da 35mm. 1-2h prima dell’espianto rimuovere il substrato e lavare 4 volte con acqua bidistillata sterile. Il terreno viene cambiato alle colture neuronali ogni 3-4 giorni.

Modello di ischemia in vitro

Per indurre l’ischemia neuronale in vitro, i neuroni sono stati sottoposti ad ipossia (di durata variabile) o a deprivazione di glucosio (di durata variabile) o ad entrambe le condizioni (deprivazione di ossigeno e glucosio, DOG).

L’ipossia è stata indotta secondo la seguente metodica:

Le piastre/well contenenti i neuroni sono state trasferite nella cameretta ipossica (*Hypoxia Incubator Chamber, StemCell Technologies 27311*) assicurandosi che questa fosse ben sigillata dall’anello che unisce la base al coperchio e chiusa da entrambe le clamp che chiudono le porte d’ingresso/uscita. Per mantenere un’adeguata umidificazione (specie se lo stimolo ipossico supera l’ora) si è posta una petri aperta contenente acqua distillata all’interno della cameretta d’ipossia.

A questo punto sotto la cappa ad aspirazione è stata indotta l’ipossia. Si è connesso un rubinetto con manometro alla bombola, ed interposto tra il manometro ed il segmento di tubo che è stato connesso alla cameretta ipossica, il flussimetro (manometro e flussimetro, *Flow Meter StemCell Technologies 27311*). Lo stimolo ipossico è stato somministrato secondo le istruzioni del produttore della cameretta ipossica con un flusso di 20L/min per 4 min di Miscela di Gas 95% N₂, 5% CO₂ (*Sapio*). Questo permette di sostituire completamente l’ambiente di normossia presente all’interno della cameretta con un ambiente di assoluta deprivazione di ossigeno. La disconnessione della cameretta dalla bombola è stata quindi eseguita evitando l’entrata di aria per cui si è chiusa prima la bombola, poi la porta di uscita della cameretta ipossica, quindi la porta d’ingresso connessa al tubo e solo a questo punto si è disconnessa dalla bombola. La cameretta ipossica è stata poi posta nell’incubatore ed aperta alla fine del periodo di ipossia desiderato che variava da un minimo di 30 minuti ad un massimo di 120 minuti.

Per ottenere la deprivazione di glucosio il mezzo di coltura è stato rimosso. Le petri

o wells sono state lavate ed incubate con neurobasal medium privo di glucosio. Dopo un periodo variabile da 30 a 120 minuti è stato nuovamente aggiunto il mezzo di coltura contenente glucosio (cfr. sotto).

Per ottenere il danno neuronale tramite ipossia e deprivazione di glucosio le colture neuronali sono state incubate in mezzo di coltura privo di glucosio e contemporaneamente sottoposte ad ipossia (come descritto sopra) per un tempo variabile da 30 a 120 minuti.

Terapia cellulare: Cellule staminali mesenchimali

Le cellule staminali mesenchimali (MSC) sono state ottenute dal midollo osseo di ratti Sprague Dawley di circa 10 settimane secondo un protocollo già descritto dal nostro gruppo (*Donzelli E-Arch Oral Biol 2007*). La procedura è stata eseguita secondo le direttive europee (European Communities Council Directive 86/609/EEC). Dopo anestesia e successivo sacrificio del ratto, si estraggono femore e tibia per disarticolazione e si asportano i tessuti molli circostanti ponendoli poi in una Falcon da 50ml in soluzione fisiologica. I tessuti sono quindi trasferiti sotto cappa sterile. Utilizzando garze sterili si asportano le cartilagini articolari delle estremità ossee, riponendole in una dish da 100 mm. A questo punto, con un tronchese sterile si asportano le metafisi e, inserendo una siringa da insulina (ago 22G) nel canale midollare, si raccolgono le cellule per 'flushing' (si tratta di un lavaggio, sotto moderata pressione del canale midollare) con 1mL di terreno α -MEM (*EuroClone-EX M0849L* a cui sono stati aggiunti: 2mM di L-Glutamina, Penicillina 100U/ml, Streptomina 100ug/ml e 250ug/ml di Fungizone) senza FBS in una dish sterile da 35mm. Si ripete il 'flushing' con un ulteriore mL di terreno. Il canale midollare viene quindi nuovamente lavato con il terreno riaspirato sino al completo schiarimento dello stesso ed eventualmente inserendo l'ago da insulina anche attraverso l'estremità ossea opposta. L'estratto raccolto viene e riposto in una Falcon da 15ml (BD) a bassa aderenza per le cellule.

A questo punto le cellule sono centrifugate a 300xg rpm per 10 min a 4°C. Si asporta il sovrnatante per aspirazione e rimane il pellet (che dovrebbe presentarsi rosa-bianco con un anello rosso vivo, rappresentato questo dagli eritrociti). Per ottenere la lisi dei globuli rossi si risospende il pellet in 2ml di cloruro d'ammonio (NH₄Cl) 0.84% e lo si incuba per 5 min in moderata agitazione. Si aggiungono

quindi 5ml di terreno completo (α -MEM con FBS 20%) per inattivare il lisante e si agita, poi si centrifuga a 1200 rpm per 10min a 4°C e si dovrebbe osservare una netta riduzione dell'anello rosso, rappresentato dagli eritrociti - se ciò non si verificasse occorre ripetere la procedura con il cloruro di ammonio. Il pellet viene quindi risospeso in 5ml di terreno completo e posto in una flask T75 (*Polystyrene, 75cm² tissue culture flask*) portando a volume con terreno completo, spipettando per ridurre gli aggregati cellulari e quindi incubato in atmosfera umidificata al 5% di CO₂. Le cellule sono state quindi passate ogni 3-4 giorni ed utilizzate per tutti gli esperimenti al passaggio P2- P6.

Terapia cellulare: cellule progenitrici endoteliali umane

Sono state ottenute cellule progenitrici endoteliali umane (*ABCCell-Bio, Lot Number 188*) partendo da 500.000 cellule/cryotube. Come specificato dal produttore queste cellule, ottenute da sangue di cordone ombelicale umano, sono caratterizzate (in citofluorimetria) dai seguenti marcatori endoteliali: CD-31, CD-144, VEGFR-2. Risultano inoltre positive al von Willebrand Factor (verificato per immunostochimica).

Queste cellule sono inoltre positive per le seguenti funzioni endoteliali: incorporazione di LDL acetilate, formazione di tubuli su Matrigel ed attivazione mediata da TNF- α .

Infine queste cellule sono negative, all'immunocitochimica, per marcatori di cellule muscolari lisce/fibroblasti (e.g. α -Smooth Muscle Actin (α -SMA)). Da un punto di vista microbiologico e virologico le cellule sono state dichiarate negative per batteri, funghi e micoplasma, e negative per HIV 1 e 2 ed epatite B e C.

Le cellule sono state scongelate come indicato dal produttore. In breve il cryotube congelato è estratto dalla confezione, immerso rapidamente in un bagnetto di acqua a T 37°C. La sospensione cellulare dev'essere trasferita rapidamente in un tubo da 15ml contenete 10ml di terreno Endothelial Cell Growth Medium-2 (EBM-2).

Il terreno EBM-2 (*Clonetics EGM--2 CTM-3241, CC-3156*) è supplementato con SingleQuots (Lonza CC-4176) e con una concentrazione finale di FBS del 2%.

Le SingleQuots sono fattori di crescita ed integratori ed in particolare si tratta di Acido ascorbico 0.5mL (*Lonza cc-4116A*); recombinant human Fibroblast Growth Factor-B (rhFGF-B) 2mL (*Lonza CC-4114A*); recombinant long R Insulin-like

Growth Factor-1 (R3-IGF-1) 0.5mL (*Lonza CC-4115A*); Hydrocortisone 0.2mL (*Lonza CC-4112A*); Gentamicina sulfato-Amfotericina-B (GA-1000) 0.5ml (*Lonza CC-4381A*); recombinant human Epidermal Growth Factor (rhEGF) 0.5mL (*Lonza CC-4317A*); Heparin 0.5mL (*Lonza CC-4396A*); human recombinant Vascular Endothelial Growth F (*CC-4114A*).

Dopo una centrifugazione a 300xg di 5min a 4°C e rimozione del surnatante il pellet viene risospeso in 1ml di terreno EBM-2. Si porta poi a volume per ottenere la densità cellulare desiderata. La densità indicata per questo passaggio è di 2000 cellule/ cm². La coltura quindi è posta nell'incubatore a 37°C con 5% di CO₂. Durante passaggi successivi abbiamo utilizzato la densità indicata dal produttore di 10.000 cellule/cm². Le cellule sono state espanse sino a P8 e testate per l'espressione antigenica sino a P7 dal produttore.

Inoltre abbiamo testato queste cellule a P8 per l'espressione degli antigeni CD-31, VEGFR-2 e per l'uptake delle LDL acetilate.

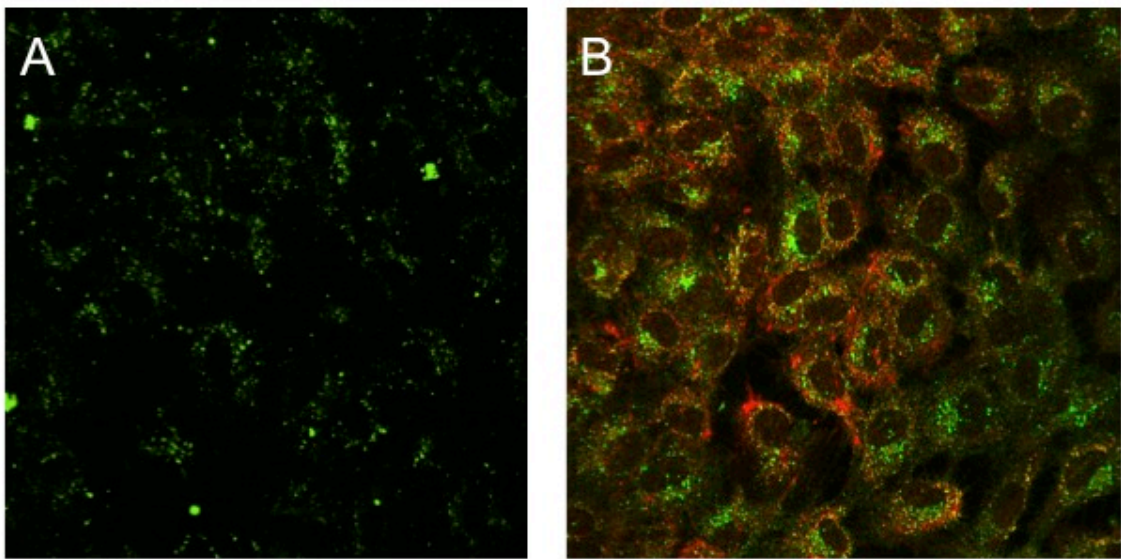


Figura: Caratterizzazione delle cellule endoteliali progenitrici umane a P8 in immunofluorescenza. Le cellule, anche a P8, conservano le loro caratteristiche funzionali, captazione delle acLDL in verde (A), e antigeniche, espressione del VEGFR-2 (rosso) e del CD -31 (verde) (B). Ingrandimento 60x, Scala, 10 µm.

Esperimenti per la taratura dello stimolo da deprivazione di ossigeno e glucosio (DOG)

I neuroni corticali piastrati e trattati con ARA-C per la deplezione gliale sono stati utilizzati al sesto giorno per gli esperimenti in seguito descritti- e da qui in poi T0 equivale a questo timepoint.

Per la taratura dello stimolo di deprivazione di ossigeno e glucosio (DOG) i pozzetti e rispettivamente le dish grigliate sono stati trattati come segue:

-Normossia di controllo, con neurobasal medium (NB) o con deprivazione di glucosio con DMEM senza glucosio (G-) per 30, 60 e 120 minuti rispettivamente.

-Ipossia della durata di 30, 60 e 120 minuti con neurobasal medium o DMEM senza glucosio (G-).

Per evitare residui di terreno con glucosio, i pozzetti destinati a deprivazione di glucosio sono stati sottoposti a doppio lavaggio con G- prima dell'induzione. Il terreno è stato infine sostituito con NB alla fine dell'induzione in tutti i pozzetti (compresi i controlli).

Quantità di neuroni piastrati nei pozzetti delle multiwell da 12: 700.000; terreno aggiunto: 0,5ml per l'induzione e 0,8ml alla fine dell'induzione.

Quantità di neuroni utilizzati nelle dish grigliate da Ø 35mm: 1.500.000; terreno aggiunto: 1ml per l'induzione e 1,5ml alla fine dell'induzione.

Da T0 ai 7gg poi il terreno non è stato più cambiato.

Oltre alle multiwell da 12 con vetrino per l'immunofluorescenza erano anche state allestite delle multiwell in parallelo per analizzare gli estratti cellulari (sia in questo esperimento sia in quelli descritti di seguito), tuttavia questa parte non verrà ulteriormente trattata nella presente tesi perché la quantità proteica ottenuta non era adeguata alle analisi western blot.

Inoltre tutti i terreni sono stati conservati a -80°C per eventuali quantificazioni proteiche (non obiettivo però del presente lavoro).

Modello di ischemia in vitro- deprivazione di ossigeno e glucosio

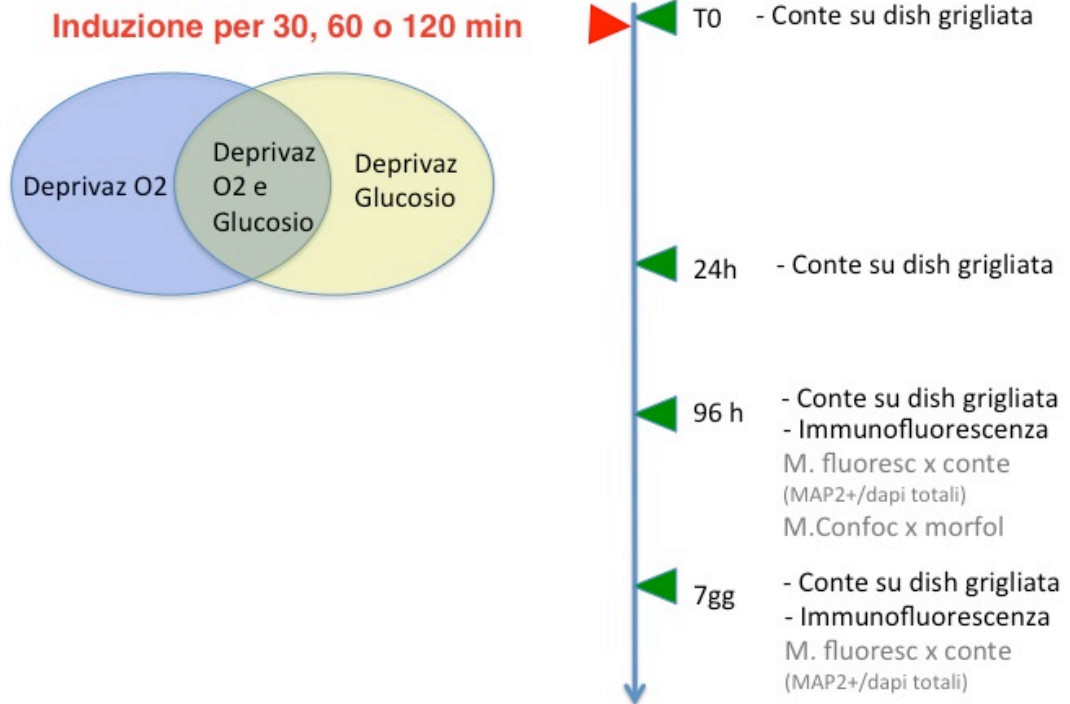


Figura: Set-up degli esperimenti in vitro

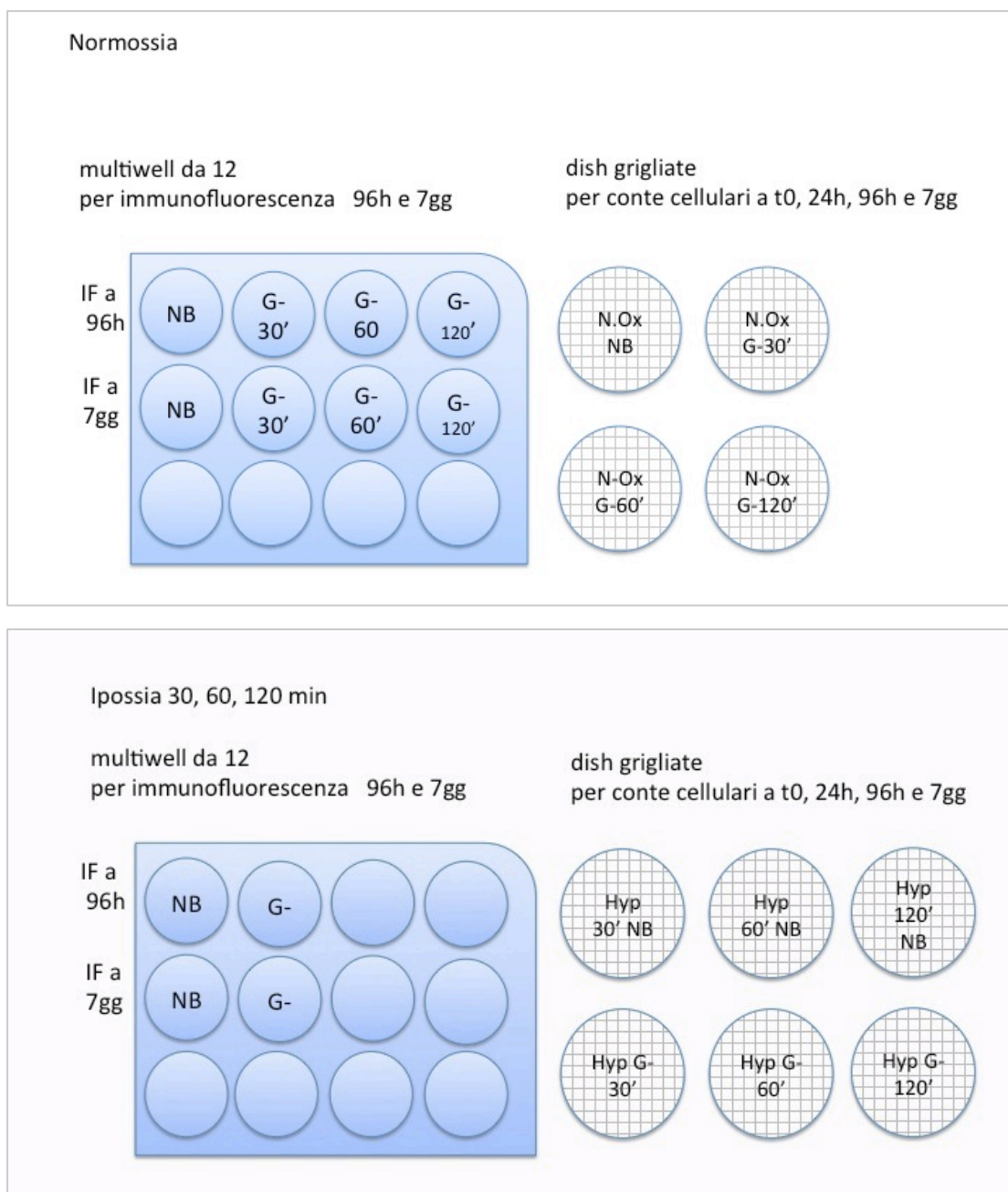


Figura: Esperimenti per la taratura dello stimolo da privazione di ossigeno e glucosio (DOG) - rappresentazione grafica delle multiwell da 12 e delle dish grigliate utilizzate per gli esperimenti. Abbreviazioni: neurobasal medium (NB); DMEM senza glucosio (G-); normossia (N-Ox); ipossia (Hyp); immunofluorescenza (IF).

Esperimenti in normossia e DOG 1ora con trattamenti cellulari

Per questi esperimenti come in quelli precedenti il T0 corrisponde al 6. giorno dopo piastramento dei neuroni.

Per i trattamenti con cellule staminali (cellule progenitrici mesenchimali e cellule progenitrici endoteliali) sono state piastrate in delle multiwell da 12 pozzetti, 30.000 cellule staminali sul fondo e 20.000 sull'inserto due giorni prima. 24 ore prima dell'induzione il terreno veniva sostituito con neurobasal medium (1.5ml nel pozzetto e 0.5 nell'inserto) per creare il medium condizionato e permettere anche un pre-adattamento alle cellule piastrate nell'inserto.

Per i trattamenti previsti a 24 ore dallo stimolo DOG si effettuava un analogo cambio terreno per le staminali su multiwell con inserto ad essi dedicati.

Al T0 lo stimolo DOG è stato indotto dopo doppio lavaggio con terreno G-, per incubazione di un'ora in ipossia con terreno privo di glucosio. Questi pozzetti sono poi stati trattati come segue: con neurobasal medium (per avere il controllo, non trattato), con medium condizionato al 50% dalle cellule staminali per 24 ore; con l'inserto su cui erano state piastrate le cellule staminali- entrambe le modalità di trattamento sono state testate come somministrazione o subito dopo la rimozione dello stimolo DOG o a 24ore da esso. I pozzetti con i neuroni di controllo, rimasti in normossia e non esposti a deprivazione di glucosio, salvo il controllo in cui è stato solo eseguito un cambio di terreno, sono stati sottoposti anch'essi sia a trattamento con medium condizionato sia a trattamento con staminali su inserto.

Reclutamento di Neuroni ischemici con cellule staminali-modello in vitro

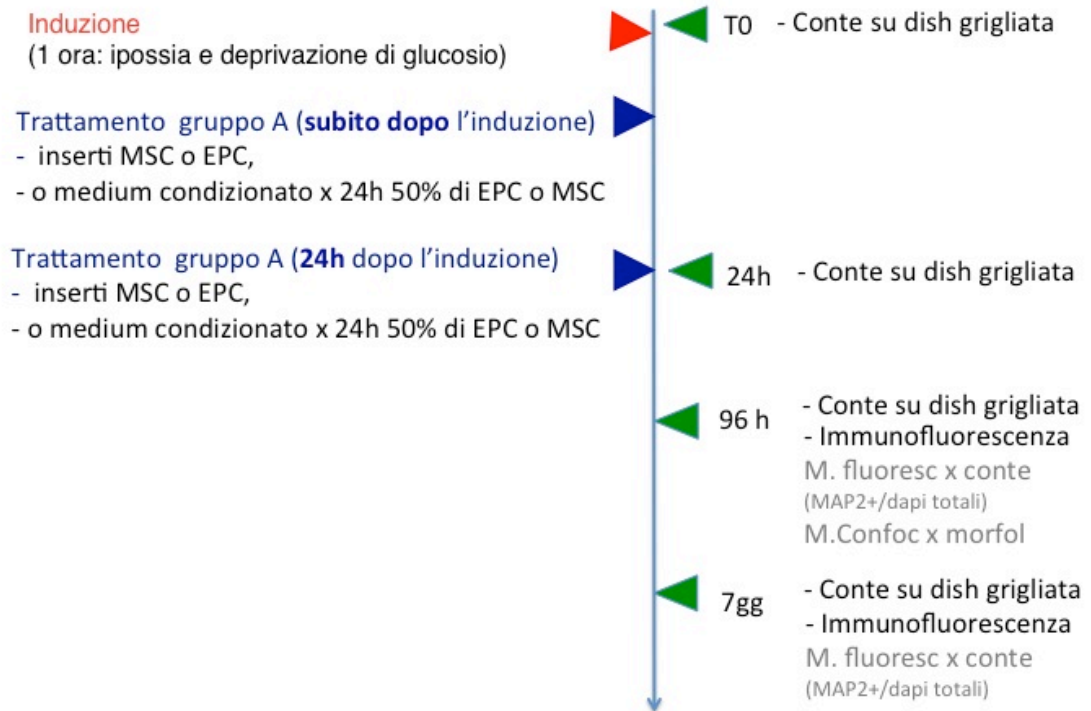


Figura: Schema degli esperimenti in normossia e DOG 1h con trattamenti cellulari.

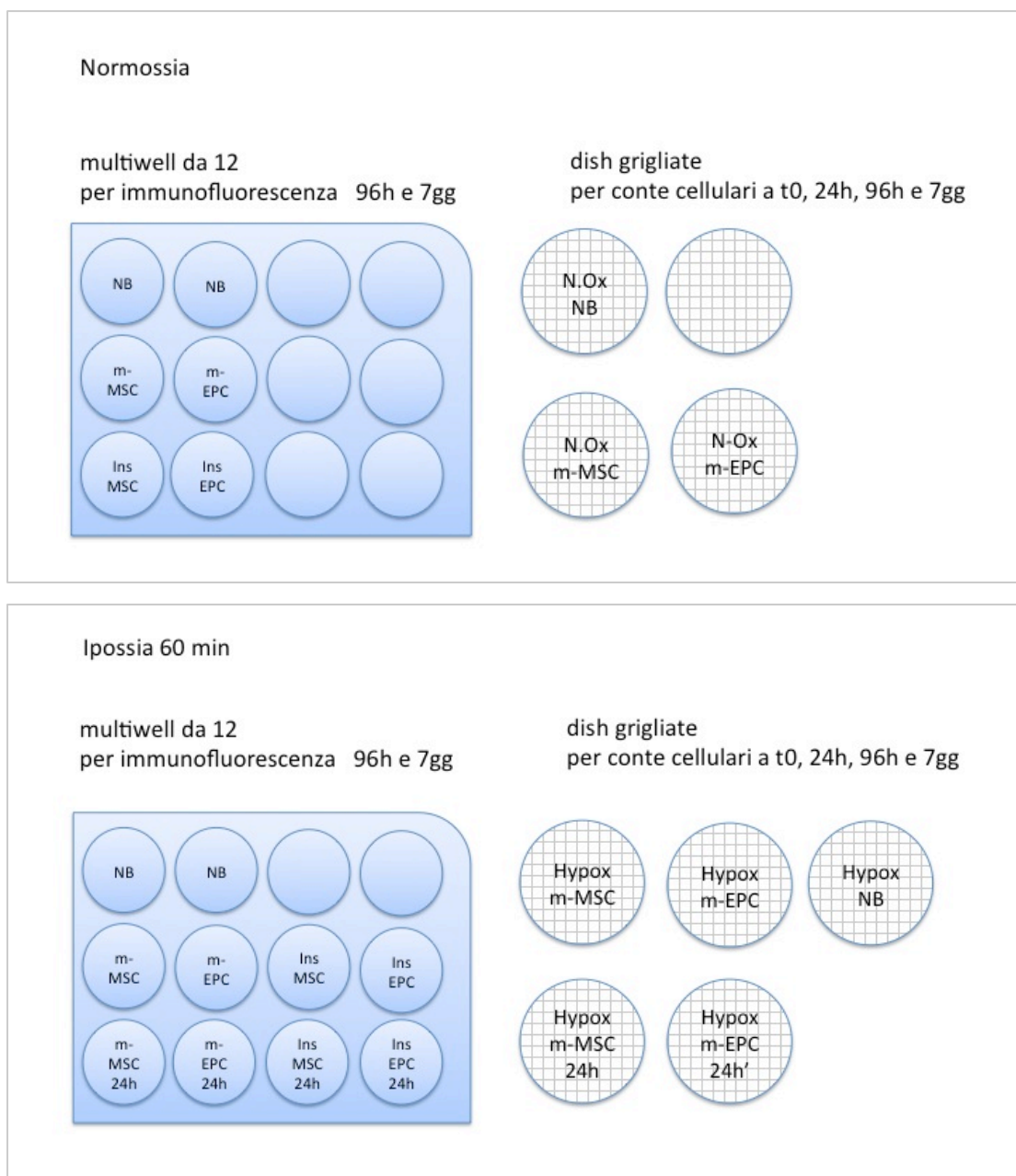


Figura: Esperimenti in normossia e DOG 1h con trattamenti cellulari, dimostrazione delle well da 12 e delle dish grigliate utilizzate. Abbreviazioni: Neurobasal medium (NB); neurobasal medium condizionato dalle cellule progenitrici mesenchimali per 24h al 50% (mMSC); neurobasal medium condizionato dalle cellule progenitrici endoteliali per 24h al 50% (mEPC); inserto con le cellule progenitrici mesenchimali (ins MSC); inserto con le cellule progenitrici endoteliali (ins EPC); normossia (N-Ox); ipossia (Hyp); trattamenti effettuati a 24h dallo stimolo DOG (24h).

Immunofluorescenza

Al termine del periodo di osservazione i vetrini con i neuroni nelle varie condizioni di trattamento sono stati lavati rapidamente con PBS 1x per tre volte e fissati per 10 minuti con paraformaldeide 4% in PBS 1x. I vetrini sono stati quindi lavati con PBS 1x (3 lavaggi da 5 minuti) ed incubati per 10 minuti in glicina 0,1M (*Glicina G126 Sigma*) in PBS 1x e successivamente per 30 minuti con blocking buffer (10% di BSA (*Sigma A9647*) e Triton X-100 0.01% (*Sigma-Aldrich 069K0049*) in PBS 1x.

In seguito la soluzione di blocking è stata sostituita con la soluzione con i due anticorpi primari (sempre in blocking buffer) appropriamente diluiti.

Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari:

-mouse anti microtubule associated protein 2 (MAP-2) 1: 200, (*Millipore MAB 3418*).

-rabbit anti glial fibrillar acidic protein (GFAP)1: 200, (*DakoCytomation code Z0334*).

Per ciascun vetrino nella multiwell da 12 sono stati aggiunti 50uL di soluzione con gli anticorpi e ciascun vetrino è stato attentamente ricoperto con un disco di parafilm, evitando bolle d'aria. Il tempo d'incubazione utilizzato per l'anticorpo primario è di 2 ore a temperatura ambiente o in alternativa di 16 ore over night a 4°C (procedure equivalenti come risultato). Durante l'incubazione per mantenere l'umidità è stata posta dell'acqua bidistillata negli interspazi tra i pozzetti.

Alla fine del periodo d'incubazione dell'anticorpo primario è stato rimosso il parafilm e si sono eseguiti 6 lavaggi da 5 minuti ciascuno in PBS 1x.

Terminati i lavaggi si sono aggiunti gli anticorpi secondari in blocking solution:

-goat anti mouse IgG 546, 1:200, (*Invitrogen Alexa Fluor-A11030*)

-goat anti rabbit IgG 488, 1:200, (*Invitrogen Alexa-Fluor-A11034*)

- Falloidina Blu, 647, 1:100 (*Invitrogen Alexa Fluor 647 phalloidin*) per marcare i filamenti di F-actina.

L'incubazione è stata eseguita come in precedenza sempre coprendo i singoli vetrini con parafilm (vedi sopra) ed incubando gli anticorpi secondari per un'ora a temperatura ambiente al buio. Terminato il periodo d'incubazione si procede con 3 lavaggi da 5 minuti l'uno. Per marcare i nuclei si è proceduto alla colorazione con 4',6-diamidino-2-fenilindolo, DAPI (Sigma) in PBS 1x (diluizione 1: 100'000) per 1

minuto. In seguito sono stati eseguiti altri tre lavaggi con PBS 1x da 5 minuti e i vetrini sono stati montati su vetrino portaoggetto. Per questo è stato utilizzato un montante acquoso (*Polyvinil alcohol mounting medium with DABCO, antifading, Fluka BioChemica 10981*). Sulla goccia di montante (37µl circa) si ribalta il vetrino e si comprime delicatamente con della carta assorbente per eliminare l'eccesso di montante. Infine il vetrino viene fissato con del comune smalto al vetrino portaoggetti e conservato al buio in contenitore asciutto a 4° sino alla lettura.

Valutazione della sopravvivenza neuronale

La valutazione morfologica di morte neuronale è stata fatta esaminando le colture cellulari (sottoposte a ischemia e/o trattate) sia al microscopio ottico osservando e fotografando le colture in longitudinale al giorno 0, 1, 4 e 7 dopo induzione dell'ischemia o in alternativa al giorno 4 e 7 dopo colorazione in immunofluorescenza per il nucleo (DAPI) ed i microtubuli (MAP-2) ed esaminando poi le cellule al microscopio a fluorescenza.

Le colture cellulari sono state fotografate in campo chiaro al 10x utilizzando 2 campi non adiacenti ai tempi 0, 24h, 96h e 7 gg.

Le fotografie al microscopio invertito, a fluorescenza (20x) sono state eseguite su 8 campi/vetrino a 3 lunghezze d'onda diversa (per DAPI- 405nm (blu), MAP-2 - 546nm (rosso) e GFAP – 488nm (verde) utilizzando un microscopio invertito e scegliendo 8 campi migliori, rappresentativi, non adiacenti tra loro. Infine, per il tempo 96 ore, sono state anche eseguite fotografie al microscopio confocale (60x) per il MAP-2 in rosso e GFAP in verde, mentre la scarsa luminosità della falloidina blu per marcare il citoscheletro di tutte le cellule non forniva informazioni aggiuntive).

Studio clinico

Raccolta, preparazione ed analisi di campioni biologici da pazienti affetti da emorragia subaracnoidea

Materiale clinico

Per il presente studio sono stati reclutati tra febbraio 2009 e luglio 2009, 10 pazienti ricoverati a causa di emorragia subaracnoidea presso l'Ospedale C.T.O. di Torino. Il protocollo clinico è stato approvato dal comitato etico locale. Lo studio è fondamentalmente a carattere osservazionale e non prevede deviazioni dalle procedure previste per il trattamento di questi pazienti. Salvo il Doppler TSA non sono stati aggiunti esami non necessari alla cura del paziente ma volti a documentarne l'evoluzione. Tutti i pazienti sono stati ricoverati entro 24 ore dall'emorragia subaracnoidea. Ci sono stati 3 uomini e 7 donne. L'età media era di 63.7 anni (deviazione standard 12.7 anni), con un range da 41 a 84 anni. Sono stati esclusi dallo studio a priori i pazienti con malattie infettive come HIV e HCV note. Il consenso informato al trattamento dei dati personali è stato ottenuto da tutti i pazienti o in alternativa dai parenti, il comitato etico non ha ritenuto necessario un consenso specifico per lo studio osservazionale in oggetto - considerando che la quantità di sangue prelevata per lo studio in aggiunta a quella prevista per gli esami di routine non fosse significativa.

Valutazione clinica

Lo stato neurologico è stato valutato ogni 6 ore ed il livello di coscienza è stato valutato secondo la classificazione di Hunt & Hess (*Hunt WE and Hess RM- J Neurosurg 1968*). Il deterioramento neurologico ritardato è stato definito come un peggioramento neurologico non attribuibile a risanguinamento, complicanze sistemiche o postoperatorie. L'esito finale neurologico è stato valutato mediante modified Ranking Scale per tutti i pazienti alle dimissioni.

Protocollo di gestione clinica

I pazienti vigili, collaboranti e neurologicamente stabili sono stati allettati. E' stata inoltre somministrata loro fleboclisi di salina 0,9% e in maniera continua per via endovenosa, nimodipina ad una velocità di 2 mg/h. Il bilancio dei fluidi è stato finalizzato al mantenimento della normovolemia e di pressione sanguigna normale. I pazienti in coma sono stati sedati e ventilati. Il deterioramento neurologico dovuto a vasospasmo è stato gestito inducendo una moderata ipertensione ipervolemica e farmacologica mediante moderata somministrazione di fluidi ed infusione di catecolamine. Il vasospasmo farmaco-resistente veniva trattato con angioplastica ed il trattamento veniva ripetuto al bisogno. L'idrocefalo veniva trattato con derivazione spinale esterna se il liquor non era emorragico e con derivazione ventricolare esterna altrimenti. Nei casi di ipertensione endocranica i pazienti sono stati trattati con craniectomia decompressiva e duroplastica. Il trattamento chirurgico degli aneurismi è stato effettuato da alcuni colleghi neurochirurghi come primi operatori (GF, MN e CB) e dal team di neuroradiologia interventistica (FV e MB). Il clipping veniva privilegiato nei pazienti giovani, o con ematoma intraparenchimale o con aneurisma non trattabile per via endovascolare.

Imaging cerebrale

Gravità dell'emorragia subaracnoidea

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a TAC encefalo ed angio TAC al momento del ricovero e poi come clinicamente indicato. L'intensità dell'emorragia subaracnoidea (ESA) è stata determinata in base alle quantità ed alla posizione di sangue sulla TAC iniziale, con la classificazione proposta secondo *Fisher (Fisher CM-Neurosurgery. 1980)*: grado 1, TAC normale; grado 2, ESA diffuso o sottile strato verticale di 1 mm di spessore; grado 3, coaguli localizzati o strato verticale di sangue subaracnoideo maggiore di 1 millimetro di spessore; grado 4, emorragia intraventricolare o intracerebrale.

Ischemia cerebrale ritardata

L'ischemia cerebrale ritardata è stata definita come dalla presenza di nuove ipodensità alla TAC circoscritte ad un territorio di pertinenza arterioso e compatibili con infarto cerebrale.

Ecocolordoppler transcranico

Le velocità di flusso (VF) sono state valutate con un sistema xyz con una sonda a 2-MHz, secondo la tecnica descritta da Aaslid et al. (*Aaslid R-J Neurosurg. 1982*). La valutazione mediante Doppler transcranico (TCD) è stata effettuata nelle prime 48 ore dopo l'insorgenza dall'ESA e ripetuta ogni giorno fino alla stabilizzazione del paziente o la dimissione dal reparto. Sono state insonate le arterie cerebrali anteriori (ACA) e cerebrali medie (MCA) attraverso la finestra acustica temporale, mentre non sono state studiate di routine le arterie vertebrali e basilare (studiabili attraverso il forame magno). La misurazione della velocità di flusso delle carotidi interne è stata eseguita a livello extracranico sotto la mandibola.

Vasospasmo

Una velocità di flusso maggiore di 120 centimetri/s e tre volte maggiore rispetto alla velocità di flusso della carotide interna è stata utilizzata come criterio di vasospasmo secondo Aaslid o considerando aumenti velocimetrici sopra i 50 cm/s nell'arco di 24ore (*Aaslid R- J Neurosurg 1984; Loch Macdonald Neurosurg Rev 2006*). Nei pazienti privi di finestra di sonicazione la diagnosi era puramente clinica, se il paziente era sveglio o rivegliabile o altrimenti basata su TAC perfusionale seguita da angioTAC e/o angiografia. I pazienti con evidenza di vasospasmo all'esame doppler transcranico sono stati ulteriormente divisi in due sottogruppi clinici, i pazienti con sintomi e quelli con vasospasmo non sintomatico. Il vasospasmo non sintomatico è stato, infatti, definito come un innalzamento transitorio della velocità di flusso in assenza tuttavia del deterioramento neurologico. Un aumento intenso e prolungato della velocità di flusso associato a sintomi neurologici e/o deficit ischemico sono invece indicativi di vasospasmo sintomatico (*Sviri GE-Stroke 2000*).

Analisi ematochimiche e raccolta dei leucociti per l'isolamento del RNA

E' stato eseguito un campionamento di sangue 4 volte durante le prime 2 settimane di ricovero, che definisce 4 periodi all'interno del decorso clinico: periodo 1, tra i giorni 1 e 3 (1 ° giorno di essere considerato come il giorno di inizio ESA), periodo 2, tra i giorni 4 e 6; periodo di 3, tra i giorni 7 e 9, e il periodo di 4, tra i giorni 10 e 12.

I campioni di sangue sono stati raccolti in provette di polipropilene contenente EDTA e subito refrigerati a 4° C. Una parte del campione è stata utilizzata per eseguire le analisi ematochimiche, l'altra parte invece per l'estrazione delle cellule mononucleate e del mRNA oltre che per la conservazione del plasma per eventuali dosaggi proteici (ove presente un drenaggio esterno si conservavano anche campioni di liquor). Appena possibile e sempre entro 2 ore dal prelievo i campioni sono stati processati per l'isolamento dei leucociti

Analisi citofluorimetrica (prove solo eseguite su campioni di volontari sani)

Preparazione dei campioni

a.) Sangue intero con anticoagulante (CTDA)

b.) Cellule mononucleate del sangue periferico isolate per centrifugazione su gradiente

Il sangue raccolto in provetta con anticoagulante (CTAD) è stato utilizzato al più presto - al massimo entro 8 ore. 20 mL di sangue diluito con 2-4 volumi di PBS/ETDA (PBS pH 7.2+ETDA 2mM) sono stati stratificati su 15 ml di Ficoll-Paque Plus (*GE-Healthcare*) o Lympholyte-H (*Cedarlane CL5015*), che hanno una densità di 1.077g/cm³ a 20°C. in un tubo da 50 mL e centrifugati a 400 g per 30-40 minuti senza freno a 20°C. Con grande delicatezza, utilizzando una Pasteur di plastica, è stato raccolto l'anello di cellule (linfociti, monociti, trombociti) all'interfase ed è stato trasferito in un tubo da 50mL. Le cellule isolate sono state risospese in 50 mL di PBS/ETDA e quindi centrifugate a 300xg per 10min a 20°C. Per rimuovere le piastrine, il pellet è stato risospeso in 50mL di PBS/EDTA e centrifugato a 200xg per 10 min a 20°C. Il surnatante, contenete le piastrine dev'essere quindi eliminato (questo step è stato ripetuto più volte). Il pellet viene quindi risospeso in 300uL di PBS/EDTA.

c.) Cellule CD34+ isolate da cellule mononucleate di sangue periferico mediante magnetic labelling

Le cellule mononucleate CD34+ sono state isolate da sangue periferico mediante l'utilizzo di CD 34 MicrobeadKit (*Mylteni Biotec 130046702*), secondo le istruzioni del produttore.

In particolare, le cellule sono state tenute in ghiaccio e sono state utilizzate soluzioni pre-refrigerate. Le cellule (fino ad un massimo di 10^8) sono state incubate con FcR Blocking Reagent 100 uL, e Microbeads CD-34 100 uL per 30 minuti a 4-8°C. Quindi è stato eseguito lavaggio con PBS/EDTA 5-10 ml e centrifuga a 300xg per 10 minuti. E' stato rimosso il surnatante e risospeso in 500 uL di PBS/EDTA.

La sospensione cellulare è stata passata attraverso un filtro di nylon da 30um per rimuovere eventuali aggregati. Quindi la MACS MS columns è stata posizionata sul mangnete su misura a stativo di ferro e preparata con 500 uL di PBS/EDTA con 5% di BSA. Il filtro da 30 um è stato lavato con 500 uL di PBS/EDTA e successivamente montato sulla colonna. La sospensione cellulare è stata applicata sulla colonna, attraverso il filtro. E' stata quindi raccolta la frazione non marcata che è passata attraverso la colonna e sono poi stati eseguiti ulteriori 3 lavaggi con 500uL di PBS/EDTA. La colonnina è stata poi rimossa dal separatore e posta su un tubo per la raccolta delle cellule positive. La colonnina è stata infine eluita con 1mL di PBS/EDTA ed utilizzando il pistoncino sono state raccolte le cellule marcate.

Staining, acquisizione, analisi

Per l'analisi citofluorimetrica sono stati utilizzati i seguenti anticorpi anti-umano: CD2-FITC 1:20 (*Beckman Coulter 6603863*); CD13-FITC 1:20 (*Beckman Coulter IM0778*); CD22-FITC 1:20 (*Beckman Coulter IM0779*); CD133-APC 1 : 10 (*Miltenyi Biotec 130090826*), VEGFR2-PE 1: 10 (*R&D Systems FAB357P*).

I campioni cellulari da analizzare (preparati in doppio) sono stati incubati per 10 minuti a 4°C in 100 uL di soluzione di blocco contenente IgG umane (*Sigma 15381-IMG*) per minimizzare il legame aspecifico di immunoglobuline via recttore del Fc delle immunoglobuline.

Quindi, senza centrifugare, sono stati aggiunti gli anticorpi ed i campioni sono stati incubati al buio per 15 minuti a 4°C.

La lisi degli eritrociti è stata ottenuta, aggiungendo 2 mL di soluzione lisante (*Pharm Lyse 100ml BD 555899*), 1x in H₂O pH 7.1-7.4, in accordo con le istruzioni del produttore) per campione ed incubando al buio a temperatura ambiente per 15 minuti. I campioni sono stati quindi centrifugati a 500 g per 5 minuti; sottoposti a due ulteriori lavaggi (il primo in soluzione lisante e il secondo in PBS) e quindi centrifugati a 500g per 5 minuti. Infine il pellet cellulare è stato risospeso in 500 uL di PBS e sono state aggiunte 20 uL di Sphero Accucount beads (*Saxon Europe ACFD-100-3*) prima della acquisizione per ottenere una quantificazione assoluta delle cellule di interesse.

Le cellule morte sono state escluse dall'analisi mediante colorazione con 7-Amino-Actinomycin D (7AAD) (*Beckman Coulter A07704*), un tracciante che si inserisce tra i capi di basi citosiniche (C) e guaniniche (G) del DNA a doppio filamento, quando l'interno della cellula e della cromatina nucleare sono resi accessibili.

I campioni sono stati acquisiti su FACS Canto BD con un flusso medio o basso per evitare di perdere degli elementi cellulari ed acquisendo almeno 10,000 beads. Per l'analisi dei dati è stato utilizzato il software FCS express version 3.0.

Rt-PCR

Per lo studio di espressione genica è stato raccolto il sangue arterioso e/o venoso in 2 provette da 6 ml (*tubi viola BD da 6 ml tappo viola K2E 10.8mg, ref 367864*). Nell'analisi sono stati inclusi i pazienti con vasospasmo (n=4) ed o pazienti senza vasospasmo (n=6) e controlli sani (n=6). Il sangue è stato quindi diluito con PBS nel rapporto 1:1 (6mL con 6mL) e stratificato in due provette su 3ml di Ficoll (2:1). Le provette sono state centrifugate a 650xg per 20 minuti (senza freno) a 20°C. Terminata la centrifugazione sono stati raccolti i due anelli di cellule mononucleati in un'altra Falcon da 12mL. Il campione è stato quindi diluito con minimo 5-6 ml di PBS1x e centrifugato a 500xg per 10min a 20°C. Il surnatante è stato quindi scartato ed il pellet è stato risospeso in 100uL di PBS. Infine è stato aggiunto ancora 1ml di RNA later (RNA stabilization solution (*Applied Biosystems AM7020*)) e conservato in una vial da 1.5 mL mettendo a 4°C O.N. e successivamente trasferendolo a -20°C per conservazione.

Per l'estrazione dell'RNA è stato utilizzato il kit Sigma Gene Elute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (*Sigma RTN70-1KT*) e sostanzialmente sono state seguite

le indicazioni del produttore. Le fiale contenenti i PBMC uniti all'RNA later sono state scongelate e centrifugate a 500xg a per 5 minuti a temperatura ambiente. E' stato quindi eliminato il surnante ed al pellet sono stati aggiunti 250uL di Lysis Solution/ β -mercaptoetanol. Il lisato è stato quindi trasferito su una GenElute Filtration Column e centrifugato a temperatura ambiente a 10.000x g speed per 2 minuti. Al lisato sono stati aggiunti 250 μ L di ETOH 70% ed il campione è stato vortexato. Il lisato con l'ETOH è stato poi caricato su una GenElute Binding Column e centrifugati a velocità massima per 15 sec. Si è quindi eliminato il liquido conservando la colonnina che è stata trasferita in un nuovo tubo da 2ml. La colonnina è stata lavata con 500uL di Wash solution2 con ETOH e centrifugata a temperatura ambiente a velocità massima (18.000g) per 15 sec. Si elimina il liquido conservando la colonnina che andrà riposte nel tubo da 2ml e si aggiungono nuovamente nella colonnina 500uL di Wash solution 2 con ETOH, centrifugando sempre a temperatura ambiente per 2 minuti al fine di asciugare la colonnina. La colonnina è stata infine trasferita in un tubo nuovo, da 2ml, e dopo aggiunta al centro della colonnina di 50uL di Elution Solution, si centrifuga a velocità massima per 1min. La colonnina viene poi scartata e si conserva l'eluato, in cui è presente RNA purificato.

Per la retrotrascrizione gli eluati contenuti RNA sono stati quantizzati al nonodrop (NanoDrop-ND1000) tramite spettrofotometria A 260. Il cDNA è stato sintetizzato da 1 μ g di RNA totale usando il High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit® (*Invitrogen 4368814*) – contenete Buffer, dNTP MIX, RT random primers, Reverse Transcriptase- ed il termociclatore (*Bioer Thermal Cycler TC-24/H(b)*) secondo le istruzioni del produttore (volume di reazione di 20 μ l). Per ogni reazione RT-PCR sono stati utilizzati 1 μ l di prodotto di retrotrascrizione (cDNA) utilizzando i saggi di espressione genica pre-progettati Taqman ® (*Applied Biosystems*).

Le RT-PCR sono state eseguite utilizzando un sistema ABI Prism 7700 Sequence Detection™ (*Applied Biosystems*) secondo il protocollo del produttore utilizzando i seguenti primers:

-CD-34: TacMan Gene Expression Assays, Inventoried 250ul (*Invitrogen Hs00156373_m1*)

-VEGFR-2 o KDR: TacMan Gene Expression Assays, Inventoried 250ul (*Invitrogen Hs00911700_m1*)

-CD-133: TacMan Gene Expression Assays, Inventoried 250ul (*Invitrogen Hs01009257_m1*)

-VE-Cadherin: TacMan Gene Expression Assays, Inventoried 250ul (*Invitrogen Hs00174344_m1*)

-Beta-Actina: Human ACTB Endogenous Control (FAMTM/mgb Probe, Non primer limited) (*Invitrogen 4333762T*)

I dati sono stati raccolti con le compensazioni dello strumento spettrale dall'Applied Biosystems SDS 1.9.1 del software ed analizzati utilizzando il metodo di quantificazione relativa con il ciclo soglia (CT). In breve, il metodo CT utilizza la formula $2^{-\Delta\Delta CT}$ per calcolare l'espressione dei geni bersaglio normalizzato ad un calibratore. Il ciclo soglia (CT) indica il numero di ciclo in cui la quantità di bersaglio amplificato raggiunge una soglia fissa. I valori del CT vanno da 0 a 40 (questi ultimi rappresentano il limite massimo predefinito numero di cicli di PCR che definisce mancato riconoscimento di un segnale). I valori di CT sono stati normalizzati per il riferimento endogeno [$\Delta CT = CT (\text{target gene}) - CT (\text{Beta Actina})$] e confrontati con un calibratore, con la formula $\Delta\Delta CT$ [$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{campione}) - \Delta CT (\text{calibratore})$] (*bollettino n. 2, Applied Biosystems*).

In questo studio, la Beta Actina è stata utilizzata esclusivamente come gene housekeeping. Come campione calibratore è stato utilizzato il cDNA retrotrascritto ottenuto da un pool di 8 pazienti donatori sani, (di età media, 4 uomini e 4 donne, senza terapie mediche in corso). I dati sono stati raccolti da $n \geq 2-3$ pazienti per ogni punto di tempo e per ogni gruppo e sono stati espressi come quantità reale (RQ, calcolato come $2^{-\Delta\Delta CT}$) ed espressi anche come volte di induzione (FI) dei livelli di mRNA rilevati nei pazienti rispetto ai controlli. L'induzione dei livelli di mRNA per i pazienti rispetto ai controlli è stato anche calcolato come rapporto tra i livelli di mRNA corrispondente. I dati sono stati analizzati in scala logaritmica utilizzando log con base 2. $\log_2 = 1$ corrisponde quindi a l'espressione 2 volte maggiore, mentre 2 corrisponde ad un'espressione 4 volte maggiore, e così via. Le analisi sono state eseguite in cieco.

Analisi statistica

Per le analisi statistiche è stato utilizzato un pacchetto software standard (Versione Prism GraphPad 4.00). L'effetto sulla sopravvivenza neuronale dopo danno e del trattamento con cellule staminali sulla sopravvivenza neuronale è stata valutata mediante analisi della varianza (ANOVA). Se l'analisi di varianza era significativa ($p < 0.05$) è stata poi eseguita un'analisi post-hoc con il test di Bonferroni paragonando ogni diverso trattamento al relativo gruppo di controllo.

Per paragonare le caratteristiche dei due gruppi di pazienti con vasospasmo e senza è stato utilizzato il test nonparametrico di Mann Whitney a due code con un intervallo di confidenza del 95% (Pressione arteriosa, esami ematochimici, CGS, WFNS, HH, FISHER, mRS, età). Per analizzare la differenza di sesso tra i due gruppi è stata utilizzata l'analisi per chi-quadrato.

L'analisi di espressione genica è stata eseguita con analisi di varianza due-way ANOVA (per tempo e trattamento) seguito dal test di Bonferroni.

V. Risultati

Modello di ischemia in vitro

Il cervello richiede un apporto continuo di ossigeno e glucosio per mantenere la normale funzionalità e vitalità. La perdita del flusso ematico, come per esempio durante il vasospasmo, complicanza dell'emorragia subaracnoidea, può innescare una cascata di eventi che portano inevitabilmente alla morte neuronale. Proprio per studiare l'efficacia del trattamento tramite cellule staminali sull'ischemia cerebrale correlata, abbiamo sviluppato un modello in vitro di ischemia neuronale. Il modello consiste nel sottoporre neuroni corticali a deprivazione di ossigeno e/o di glucosio per un tempo variabile. Questo insulto approssima le condizioni associate all'ischemia cerebrale in vivo e permette di manipolare facilmente eventuali trattamenti da applicare. Inizialmente quindi sono state messe a punto le condizioni per creare in modo riproducibile una consistente sofferenza neuronale. Solo in seguito si è poi studiata l'efficacia dei vari trattamenti per ridurre la sofferenza neuronale.

Setup del modello di ischemia

Colture di neuroni corticali sono state esposte a deprivazione di glucosio, deprivazione di ossigeno o ad entrambe le condizioni (induzione del danno) per una durata variabile di 30, 60 o 120 minuti. Le colture esposte a questo danno hanno mostrato, a seconda della durata dello stimolo, un cambiamento della morfologia neuronale e della morte cellulare. Queste modificazioni si sono sviluppate progressivamente nel tempo, anche se le colture sono state restituite, appena terminata l'induzione del danno, alla normalità di ossigeno e glucosio. La loro morfologia si è progressivamente deteriorata nelle seguenti 24-48 ore con progressivo rigonfiamento dei neuroni, perdita di elementi cellulari ed aumento dei detriti. Il neurite ha inoltre progressivamente sviluppato un aspetto vacuolare.

Proprio per seguire l'evoluzione del danno indotto nel tempo si sono scelte due strategie di osservazione e di quantificazione: a.) osservazione e quantificazione longitudinale tramite microfotografie in campo chiaro con griglia eseguite sui neuroni vivi tramite microscopio ottico ai tempi 0, 24 ore, 96 ore dopo induzione

del danno. b.) Colorazione in immunofluorescenza per verificare l'effettiva morte neuronale e la presenza di cellule gliali.

Morfologia e quantificazione della sopravvivenza in longitudinale.

Nelle colture non fissate analizzate sotto il microscopio ottico in contrasto di fase si è potuto osservare come 24 ore dopo l'induzione della deprivazione di glucosio ci fosse una sofferenza neuronale. Questa sofferenza era particolarmente marcata per il tempo di deprivazione di 120 minuti mentre era solo moderata per tempi inferiori di deprivazione (30 e 60 minuti)- **vedi figura sotto.**

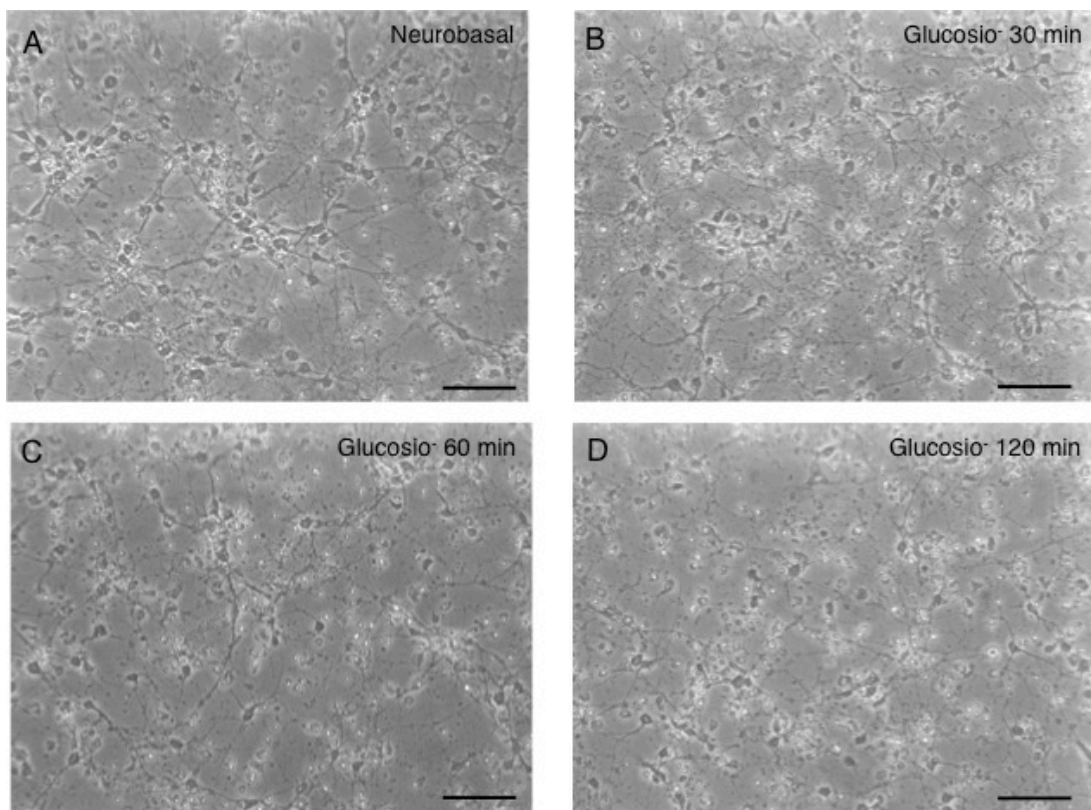


Figura: Setup del modello di ipossia e/o deprivazione di glucosio in vitro. Colture neuronali sottoposte a transitoria deprivazione di glucosio ed osservate a 24 ore. Alterazioni della morfologia neuronale indotta da transitoria deprivazione di glucosio (glucosio -). Microfotografie in campo chiaro di colture neuronali eseguite 24 ore dopo l'esposizione a terreno di controllo (A), a 30 minuti (B), a 60 minuti (C) e a 120 minuti (D) di deprivazione di glucosio. Si può notare come con il progressivo aumento del tempo di deprivazione di glucosio aumenti il numero dei neuroni sofferenti (corpo cellulare rigonfio) e il numero di neuroni morti (corpo cellulare traslucente, chiaro con perdita delle arborizzazioni dendritiche e assoni) quando osservati a 24 ore dopo la deprivazione di glucosio. Si possono inoltre notare come con l'aumentare del tempo di deprivazione di glucosio aumentino, il giorno successivo, i detriti neuronali presenti sul fondo della piastra indicativi di pregressa sofferenza neuronale. (10x)Scala, 25 μ m.

Dopo avere quindi testato la condizione di sola deprivazione di glucosio si è proceduto a testare la condizione di ipossia. La deprivazione di solo ossigeno ai neuroni per un tempo di 30, 60 o 120 minuti non ha indotto, se osservati a 24 ore dal danno, una significativa morte neuronale all'osservazione a 24h- **vedi figura sotto pannello A- C.**

Tuttavia è noto che in vivo in caso di ischemia cerebrale il danno neuronale è dovuto alla carenza di tutti i substrati metabolici perché nel momento del vasospasmo manca l'apporto di ossigeno ma anche di glucosio. Si è quindi testato l'effetto della deprivazione sia di ossigeno sia di glucosio (DOG). In questa condizione, come atteso il danno neuronale già a 24 ore era piuttosto marcato per il tempo di danno di 60 e di 120 minuti- **vedi figura sotto pannello D-F.**

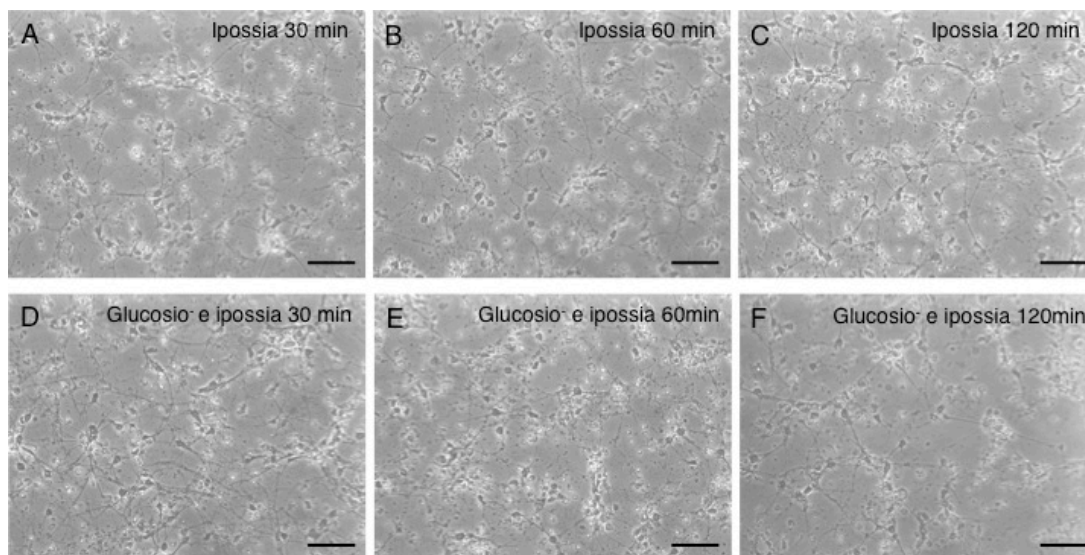


Figura: Setup del modello di ipossia e/o deprivazione di glucosio in vitro. Colture neuronali sottoposte a transitoria deprivazione di glucosio e/o di ossigeno osservate a 24 ore. Alterazioni della morfologia neuronale indotta da transitoria deprivazione di glucosio e/o di ossigeno. Microfotografie in campo chiaro di colture neuronali eseguite 24 ore dopo l'esposizione ad ipossia di 30 minuti (A), ipossia di 60 minuti (B) o ipossia di 120 minuti (C) o a deprivazione di ossigeno e glucosio (DOG) della durata di 30 minuti (D), 60 minuti (E) o 120 minuti (F). Il progressivo aumento del tempo di deprivazione di ossigeno non aumenta molto il numero di neuroni sofferenti ed il numero di neuroni morti. Al contrario la doppia deprivazione di ossigeno e di glucosio è maggiormente dannosa ai neuroni ed il danno aumenta progressivamente con il tempo. (10x) Scala, 25 μ m.

Osservando in longitudinale le colture neuronali si è osservato che il danno indotto sia dalla deprivazione di ossigeno, sia dalla deprivazione di glucosio, sia da entrambe induce una progressiva perdita di neuroni nel tempo. Considerando che le

colture neuronali sono particolarmente sensibili a tutti gli spostamenti e alla permanenza al di fuori dell'incubatore si sono fotografate le cellule nuovamente a 96 ore dopo l'induzione del danno. A 96 ore dopo l'induzione della sola privazione di glucosio si può subito notare come ci sia una riduzione fisiologica di neuroni vivi anche nelle colture non trattate (che sono però state sottoposte tutte alla stessa movimentazione degli altri gruppi). Tuttavia la privazione di glucosio per 120 minuti peggiora molto questa sopravvivenza neuronale – **vedi figura sotto**.

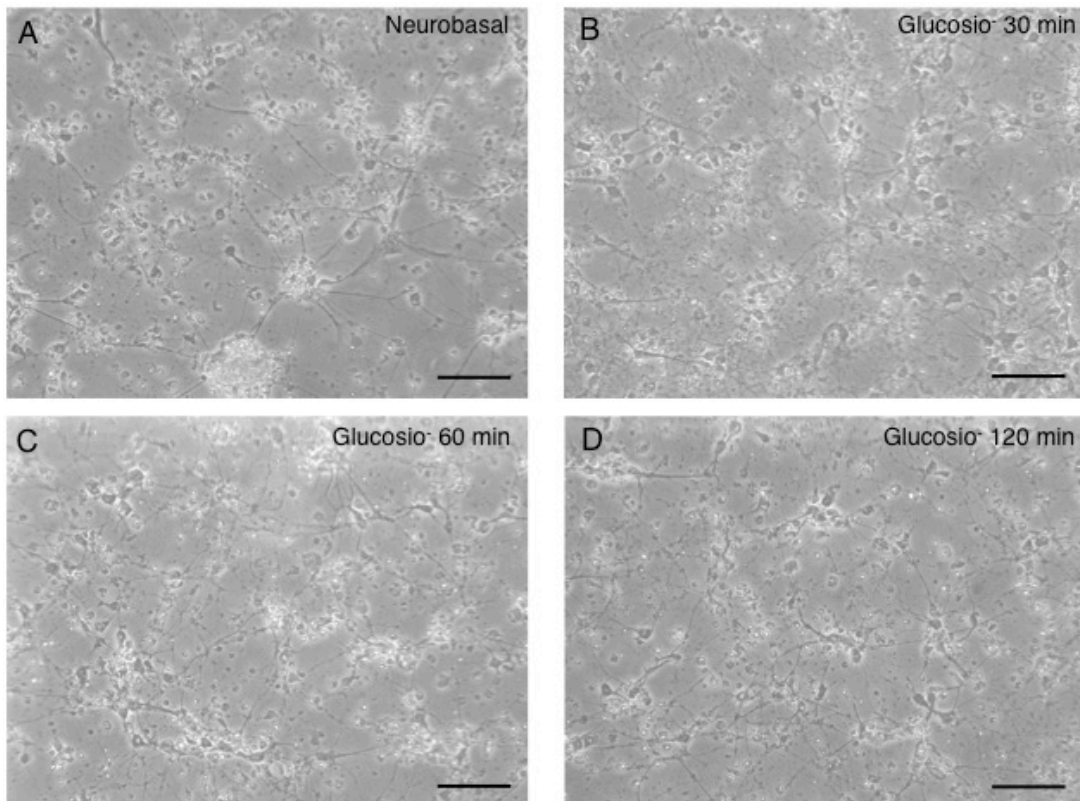


Figura: Setup del modello di ipossia e/o privazione di glucosio in vitro. Colture neuronali sottoposte a transitoria privazione di glucosio ed osservate a 96 ore. Alterazioni della morfologia neuronale indotta da transitoria privazione di glucosio. Microfotografie in campo chiaro di colture neuronali eseguite 96 ore dopo l'esposizione a terreno di controllo (A), a 30 minuti (B), a 60 minuti (C) e a 120 minuti (D) di privazione di glucosio. Si può notare come con il progressivo aumento del tempo di privazione di glucosio aumenti il numero di neuroni sofferenti ed il numero di neuroni morti quando osservati dopo 96 ore dopo la privazione di glucosio. La morte neuronale avviene progressivamente ed è marcata a 96 ore dopo la privazione. (10x) Scala, 25 μ m.

Anche per le altre condizioni si è osservata una riduzione di sopravvivenza neuronale. Interessante notare come anche la sola deprivazione di ossigeno per 120 minuti induca a distanza di giorni una marcata riduzione dei neuroni vivi (se paragonata alle altre condizioni)- **vedi figura sotto pannello A- C**. Come atteso, la deprivazione di ossigeno e di glucosio induce una marcata riduzione di neuroni vivi che è ancora più spiccata a 96 ore dopo l'induzione del danno- **vedi figura sotto pannello D- F**.

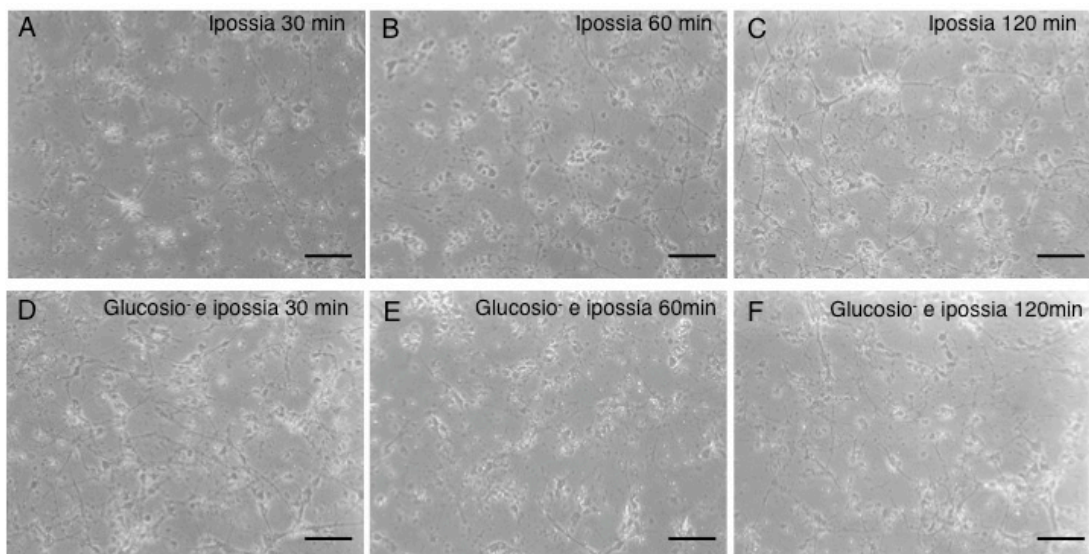


Figura: Setup del modello di ippossia e/o deprivazione di glucosio in vitro. Colture neuronali sottoposte a transitoria deprivazione di glucosio e/o di ossigeno osservate a 96 ore. Alterazioni della morfologia neuronale indotta da transitoria deprivazione di glucosio e/o di ossigeno. Microfotografie in campo chiaro di colture neuronali eseguite 96 ore dopo l'esposizione ad ippossia di 30 minuti (A), ippossia di 60 minuti (B) o ippossia di 120 minuti (C) o a deprivazione doppia di glucosio e ippossia della durata di 30 minuti (D), 60 minuti (E) o 120 minuti (F). La morte neuronale avviene progressivamente nei giorni successivi alla deprivazione ed è marcata a 96 ore. (10x) Scala, 25 μ m.

Avendo osservato queste differenze di sopravvivenza si è proceduto alla quantificazione del numero esatto di neuroni vivi in tutte le varie condizioni a 24 ore e a 96 ore dopo danno – **vedi figura sotto**.

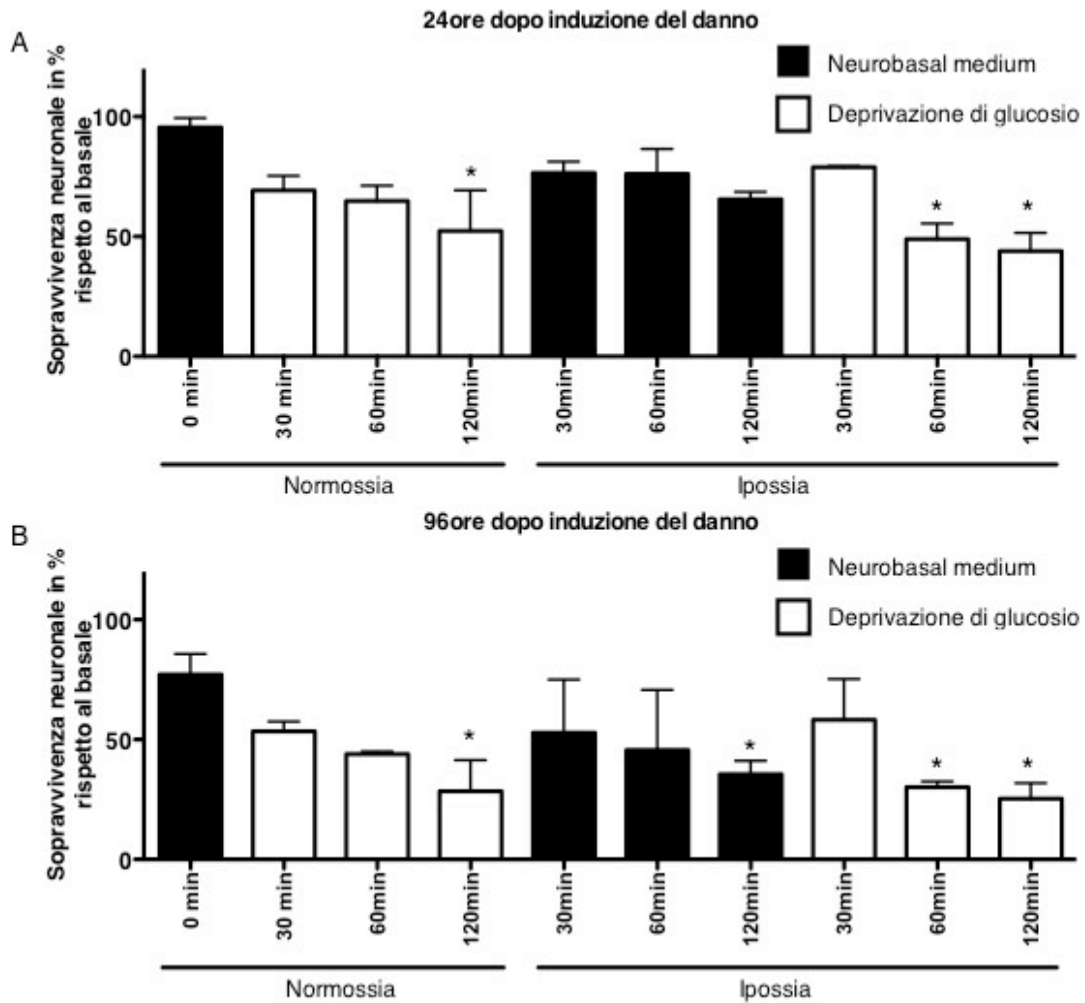


Figura: Effetto della durata dell'esposizione ad ipossia e/o deprivazione di glucosio sulla sopravvivenza neuronale valutata a 24 ore (A) o a 96 ore (B). Le colture neuronali sono state poste alternativamente in condizioni di deprivazione di glucosio (barre bianche), di deprivazione di ossigeno in terreno basale (barre nere) o ad entrambe le condizioni per un tempo variabile di 0, 30, 60 o 120 minuti. La morte neuronale per ogni condizione è stata valutata mediante conta del numero di neuroni vivi presenti (in immagini ottenute in campo chiaro) e calcolata in percentuale rispetto ai neuroni a 24 ore non sottoposti ad alcuna deprivazione di metaboliti (normossia, 0 minuti).

(A) Si può osservare come in condizioni di normossia il tempo progressivo di deprivazione di glucosio risulti in un graduale aumento della morte neuronale. La sopravvivenza neuronale è significativamente minore dopo deprivazione di glucosio per 120 minuti se paragonata al controllo ($p < 0.05$, one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test). L'ipossia di per sé non causa una significativa riduzione della sopravvivenza neuronale che tuttavia diventa significativamente minore in condizione di doppia deprivazione di ossigeno e glucosio per 60 o 120 minuti ($p < 0.05$, one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test).

(B) La sofferenza indotta dalla deprivazione dei metaboliti risulta ancora più evidente se si osserva la sopravvivenza dei neuroni a 96 ore. È nuovamente significativamente ridotta la sopravvivenza dei neuroni sottoposti a deprivazione di glucosio per 120 minuti rispetto al controllo non trattato (normossia, 0 minuti) ($p < 0.05$, one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test). A 96 ore risulta inoltre

significativamente ridotta la sopravvivenza dei neuroni sottoposti ad ipossia per 120 minuti ($p < 0.05$, one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test) così come continua ad essere significativamente ridotta la sopravvivenza dei neuroni sottoposti a doppia deprivazione di ossigeno e glucosio per 60 e 120 minuti ($p < 0.05$, one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test).

Verifica della morte di elementi neuronali

Nonostante in campo chiaro i neuroni siano ben distinguibili per le loro caratteristiche da altri elementi cellulari, quali le cellule gliali che spesso sono presenti nelle colture neuronali, si sono eseguite delle colorazioni immunocitochimiche per verificare che l'effettiva perdita neuronale e la presenza di elementi gliali. I vetrini sono stati quindi fissati e colorati a 96 ore per la microtubule associated protein 2 (MAP-2) che marca i neuroni e la glial fibrillary acidic protein (GFAP) che marca gli astrociti.

Le colorazioni in immunofluorescenza hanno confermato la bassa presenza di cellule gliali visibili solo sporadicamente- **vedi figura sotto pannello D**. Inoltre si è riscontrata una perdita neuronale proporzionale a quanto osservato in campo chiaro.

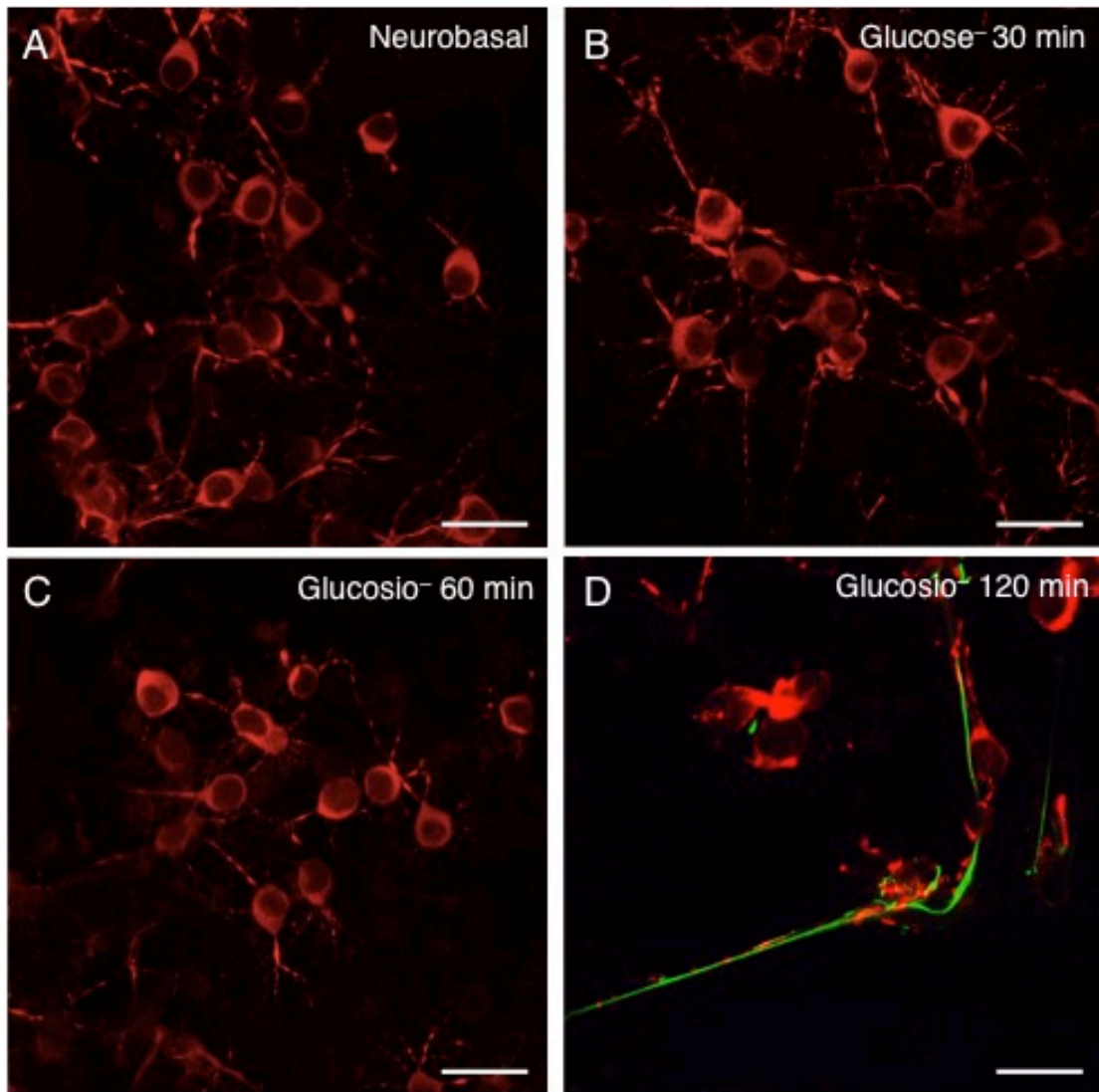


Figura: Riduzione del numero ed alterazione della morfologia neuronale dopo transitoria deprivazione di glucosio. Colorazione per MAP-2 di neuroni 96 ore dopo esposizione al terreno di controllo (A), dopo deprivazione di glucosio per 30 minuti (B), 60 minuti (C) o 120 minuti (D). Si può notare come il progressivo aumento di tempo di deprivazione di glucosio induca una riduzione del numero di neuroni che a 120 minuti appaiono marcatamente ridotti rispetto ai controlli. Si noti inoltre nella figura (D) un astrocita in verde colorato per GFAP. (60x) Scala 10 μ m.

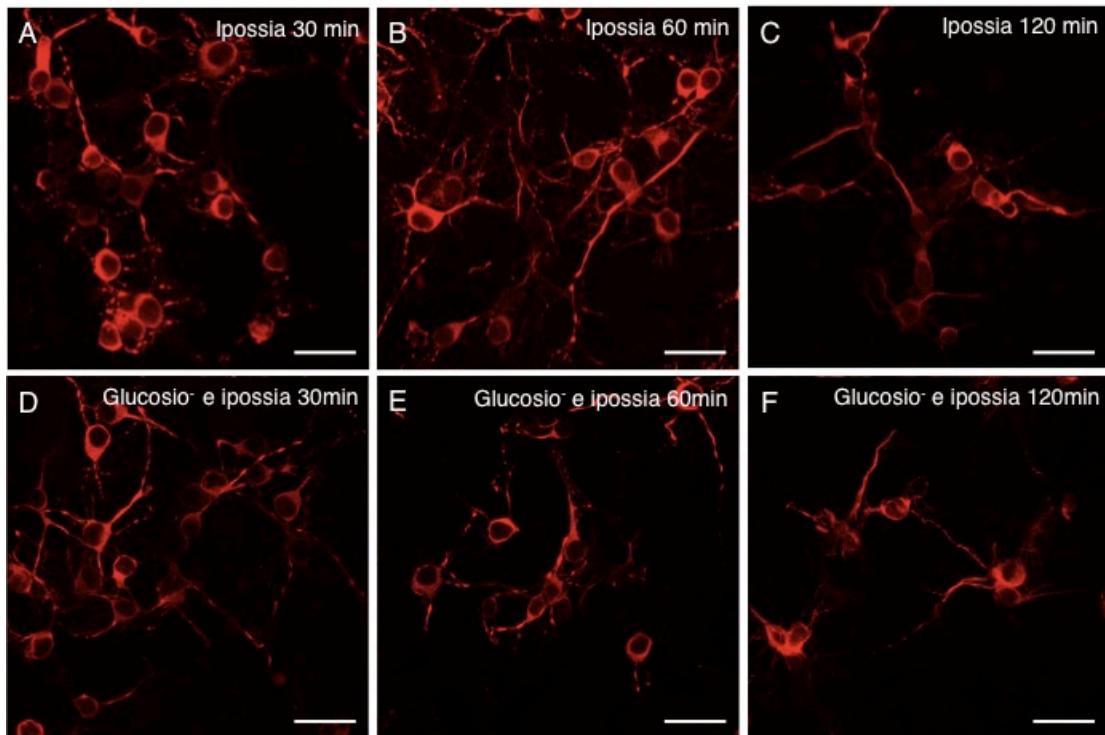


Figura: Riduzione del numero ed alterazione della morfologia neuronale dopo transitoria deprivazione di glucosio e/o di ossigeno. Immunofluorescenza per MAP-2 (in rosso) di colture neuronali 96 ore dopo esposizione ad ipossia di 30 (A), 60 (B) o 120 minuti (C) o deprivazione di glucosio ed ossigeno per 30 (D), 60 (E) o 120 minuti (F). Si può notare molto chiaramente come il progressivo aumento di tempo di deprivazione di glucosio dopo 96 ore abbia indotto una marcata riduzione del numero di neuroni che sono significativamente ridotti per la condizione di solo ipossia per 120 minuti o per deprivazione di 60 o 120 minuti di ossigeno e glucosio. (60x) Scala 10 μ m.

Considerando che la doppia deprivazione di ossigeno e glucosio induce già per un tempo di 60 minuti una consistente e significativa morte neuronale e che si avvicina maggiormente alle condizioni di ischemia *in vivo*, è stato scelto di utilizzare per tutti i successivi esperimenti la condizione di 60 minuti di DOG come modello di ischemia *in vitro*.

Studio dell'efficacia del trattamento con cellule staminali mesenchimali e progenitori endoteliali per l'ischemia neuronale

Le cellule staminali, ed in particolare le cellule staminali mesenchimali, hanno dimostrato una notevole efficacia terapeutica in varie condizioni di patologie del sistema nervoso centrale quali sclerosi multipla, ischemia cerebrale, emorragia cerebrale e parkinson. La loro efficacia si pensa risieda nella loro notevole plasticità terapeutica e nella loro capacità di adattare la loro funzione e il loro destino alle diverse condizioni patologiche (cfr. introduzione).

Abbiamo quindi voluto verificare, in considerazione del vasospasmo che spesso in seguito a emorragia subaracnoidea causa vaste ischemie cerebrali, se il trattamento dei neuroni sottoposti a ischemia in vitro con cellule staminali mesenchimali o con progenitori endoteliali potesse avere un'efficacia nel ridurre la morte e la sofferenza neuronale.

Valutazione del rescue neuronale nel tempo

Le colture neuronali sono state quindi sottoposte al giorno 0 a 60 minuti di deprivazione di ossigeno e di glucosio. I neuroni sono stati suddivisi in vari schemi di trattamento: i.) nessun trattamento, ii.) trattamento immediato con il medium di cellule staminali mesenchimali (mMSC), iii.) trattamento a 24 ore (in seguito al danno) con il medium di cellule staminali mesenchimali (mMSC 24h), iv.) trattamento immediato con il medium di progenitori endoteliali (mEPC), iii.) trattamento a 24 ore (in seguito al danno) con il medium di progenitori endoteliali (mEPC 24h). Come controllo sono state studiate colture neuronali non sottoposte a DOG (normossia) a cui è stato aggiunto il medium proveniente da cellule staminali mesenchimali o da progenitori endoteliali.

Come si può osservare dalla - **figura qui sotto** - in condizioni di normossia il trattamento con mMSC o con mEPC non induce un'aumentata sopravvivenza neuronale – pannello A. Interessante invece notare come 96h dopo il trattamento l'aggiunta di mMSC riesca a ridurre in maniera cospicua la fisiologica morte cellulare. Dopo induzione del DOG l'aggiunta del medium condizionato proveniente dalle cellule staminali (mMSC o mEPC) aggiunto immediatamente dopo il danno o a 24 ore dal danno (mMSC 24h o mEPC 24h) riesce a migliorare

parzialmente la sopravvivenza neuronale, soprattutto se si considerano le 96 ore dopo trattamento.

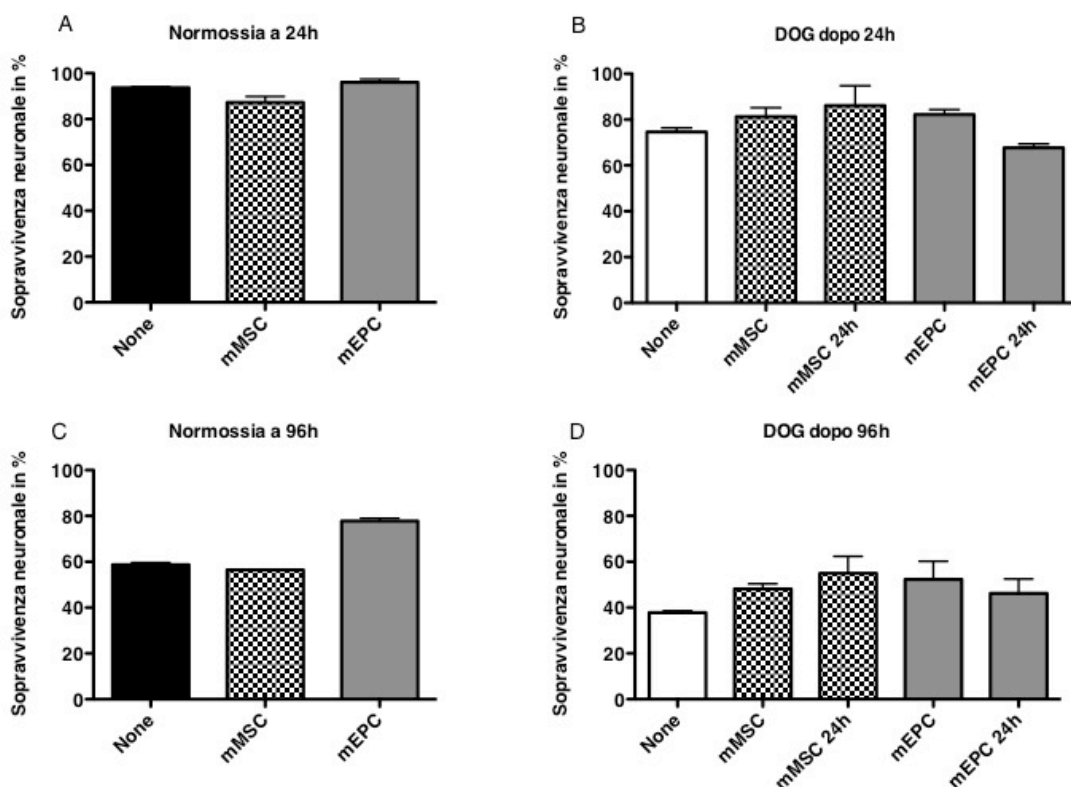


Figura: Quantificazione longitudinale della sopravvivenza di neuroni in coltura sottoposti a deprivazione di ossigeno e glucosio per un'ora (DOG); dopo trattamento con cellule staminali mesenchimali o con progenitori endoteliali.

(A) Sopravvivenza neuronale a 24 ore rispetto al basale di cellule neuronali non trattate (barra nera), trattate con medium di cellule mesenchimali (barra a quadretti) o con medium di cellule progenitrici endoteliali (barra grigia) a 24 ore dopo il trattamento (normossia).

(B) Sopravvivenza neuronale a 24 ore rispetto al basale di cellule neuronali sottoposte a deprivazione di ossigeno e glucosio per un'ora non trattate (barra bianca), trattate con medium di cellule mesenchimali (barra a quadretti) immediatamente (mMSC) o 24ore dopo il danno (mMSC 24h) o con medium di cellule progenitrici endoteliali (barra grigia) immediatamente (mEPC) o 24ore dopo il danno (mEPC 24h).

(C) Sopravvivenza neuronale a 96 ore rispetto al basale di cellule neuronali non trattate (barra nera), trattate con medium di cellule mesenchimali (barra a quadretti) o con medium di cellule progenitrici endoteliali (barra grigia) a 96 ore dopo il trattamento (normossia). Si noti come il medium dei progenitori endoteliali aumenti significativamente la sopravvivenza neuronale ($p < 0.01$, One-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test).

(D) Sopravvivenza neuronale a 96 ore rispetto al basale di cellule neuronali sottoposte a deprivazione di ossigeno e glucosio per un'ora non trattate (barra bianca), trattate con medium di cellule mesenchimali (barra a quadretti) immediatamente (mMSC) o 24ore dopo il danno (mMSC 24h) o con medium di cellule progenitrici endoteliali (barra grigia) immediatamente (mEPC) o 24ore dopo

il danno (mEPC 24h). Si noti come il medium sia dei progenitori endoteliali sia delle cellule staminali mesenchimali aggiunto sia a 0 sia a 24 ore dopo DOG aumenti la sopravvivenza neuronale.

Il numero di neuroni è calcolato come percentuale di sopravvivenza rispetto alla condizione di pre-trattamento (tempo 0 ore). None, neuroni non trattati; mMSC, neuroni trattati con medium di cellule staminali mesenchimali aggiunto dopo 0 ore; mEPC, neuroni trattati con medium di progenitori endoteliali aggiunto dopo 0 ore; mMSC 24h, neuroni trattati con medium di cellule staminali mesenchimali aggiunto dopo 24 ore; mEPC 24h, neuroni trattati con medium di progenitori endoteliali aggiunto dopo 24 ore.

Nelle microfotografie –**vedi figure qui sotto**- si può notare come il trattamento con medium condizionato di cellule staminali mesenchimali o di progenitori endoteliali abbia un ruolo nel ridurre la morte neuronale.

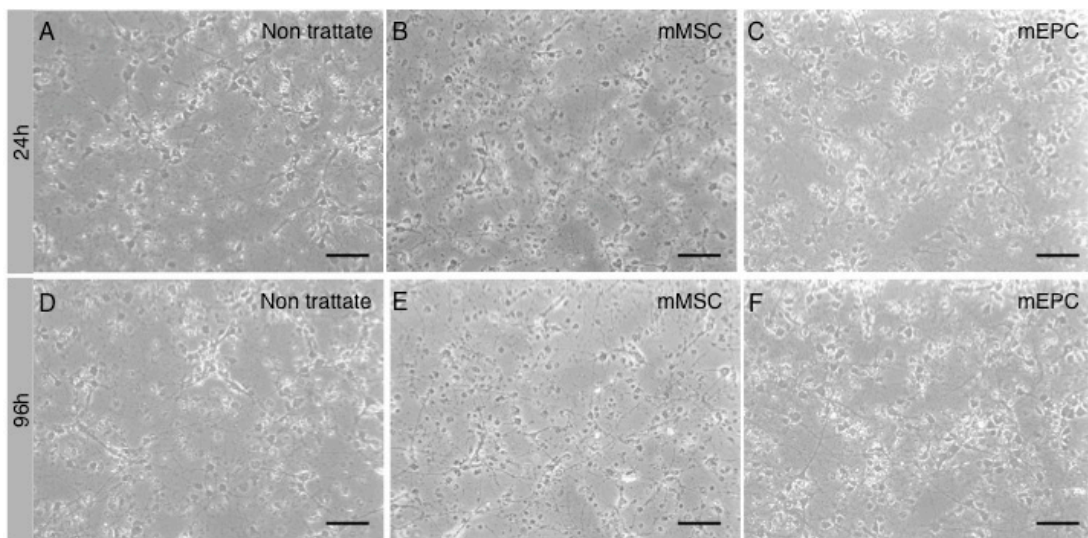


Figura: Microfotografie in campo chiaro rappresentative del trattamento con cellule staminali mesenchimali o con progenitori endoteliali di colture neuronali sottoposte a normossia. Colture neuronali non trattate, none (A), trattate con il medium di staminali mesenchimali, mMSC (B) o con medium di progenitori endoteliali, mEPC (C) dopo 24 ore. Non sono presenti particolari differenze in termine di numero di neuroni e alterazioni morfologiche. Dopo 96 ore di coltura le medesime colture non trattate, none (D), trattate con il medium di staminali mesenchimali, mMSC (E) o con medium di progenitori endoteliali, mEPC (F) dimostrano una moderata sofferenza neuronale che è tuttavia ridotta per le colture trattate con il medium dei progenitori endoteliali. (10x) Scala, 25 μ m.

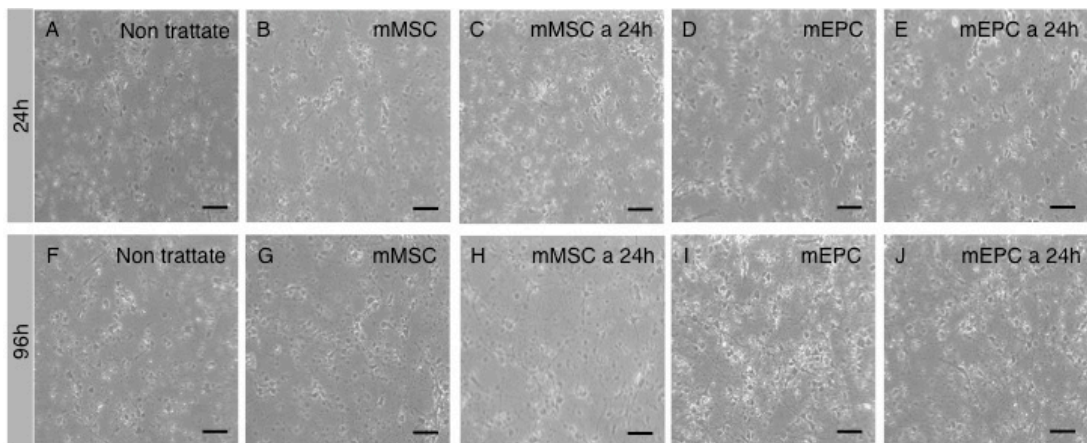


Figura: Microfotografie in campo chiaro rappresentative del trattamento con cellule staminali mesenchimali o con progenitori endoteliali di colture neuronali sottoposte a deprivazione di ossigeno e glucosio per 60 minuti.

(A- E) Colture neuronali non trattate, none (A), trattate con il medium di staminali mesenchimali, mMSC (B), trattate a 24 ore con il medium di staminali mesenchimali, mMSC 24h (C), trattate con il medium di progenitori endoteliali, mEPC (D), trattate a 24 ore con il medium di progenitori endoteliali, mEPC 24h (E) e osservate a 24 ore. Non sono presenti particolari differenze tra le varie condizioni di coltura.

(F-J) Dopo 96 ore di coltura le medesime colture non trattate, none (F), trattate con il medium di staminali mesenchimali, mMSC (G), trattate a 24 ore con il medium di staminali mesenchimali, mMSC 24h (H), trattate con il medium di progenitori endoteliali, mEPC (I), trattate a 24 ore con il medium di progenitori endoteliali, mEPC 24h (J) dimostrano una moderata sofferenza neuronale che è ridotta soprattutto per i neuroni trattati con il medium dei progenitori endoteliali. (10x) Scala, 30 μ m.

Valutazione del rescue neuronale mediante immunofluorescenza

Dopo avere osservato un'efficacia terapeutica da parte delle cellule staminali sia mesenchimali sia dei progenitori endoteliali nel proteggere i neuroni dal danno tardivo indotto da deprivazione di ossigeno e glucosio abbiamo voluto valutare anche con quantificazioni in immunofluorescenza l'effettiva efficacia terapeutica di queste cellule. Questa tecnica come già accennato in precedenza permette di quantificare con esattezza il numero di neuroni vivi (dopo colorazione per MAP-2) sul numero totale di nuclei presenti. Il calcolo quindi della percentuale di sopravvivenza rispetto al controllo rispecchia effettivamente l'efficacia del

trattamento testato. Come per la valutazione in campo chiaro sono stati utilizzati simili schemi terapeutici:

i.) nessun trattamento, ii.) trattamento immediato con il medium di cellule staminali mesenchimali (mMSC), iii.) trattamento immediato con il medium di progenitori endoteliali (mEPC) iv.) trattamento con cellule staminali mesenchimali in transwell (ins MSC) o v.) trattamento con progenitori endoteliali in transwell (ins EPC). Inoltre è stato studiato l'effetto degli stessi trattamenti se aggiunti 24h dopo l'induzione del danno. Il trattamento mediante cellule staminali in transwell permette, al contrario dell'aggiunta del solo medium condizionato, di avere una popolazione di cellule che produce durante tutto il trattamento fattori trofici, solubili, citochine etc. evitando quindi l'esauribilità di questi fattori. Se da una parte quindi l'aggiunta di cellule in transwell è vantaggiosa d'altra parte le cellule nel transwell possono risentire dell'ambiente di sofferenza neuronale e alterare le loro capacità terapeutiche. Studiare entrambe le condizioni permette quindi di capire meglio l'interazione tra le due popolazioni.

Come si può vedere nella **figura sotto** a 96 ore dal trattamento, in condizioni di normossia, le staminali mesenchimali nell'inserto (ins mMSC) aumentano la sopravvivenza neuronale. In condizioni di ipossia abbiamo invece osservato come il trattamento con il solo medium di staminali mesenchimali (mMSC) induca un significativo aumento di sopravvivenza. Soprendentemente il trattamento tardivo a 24 ore sia con il medium sia con inserti di MSC o di EPC induce un miglioramento della sopravvivenza neuronale.

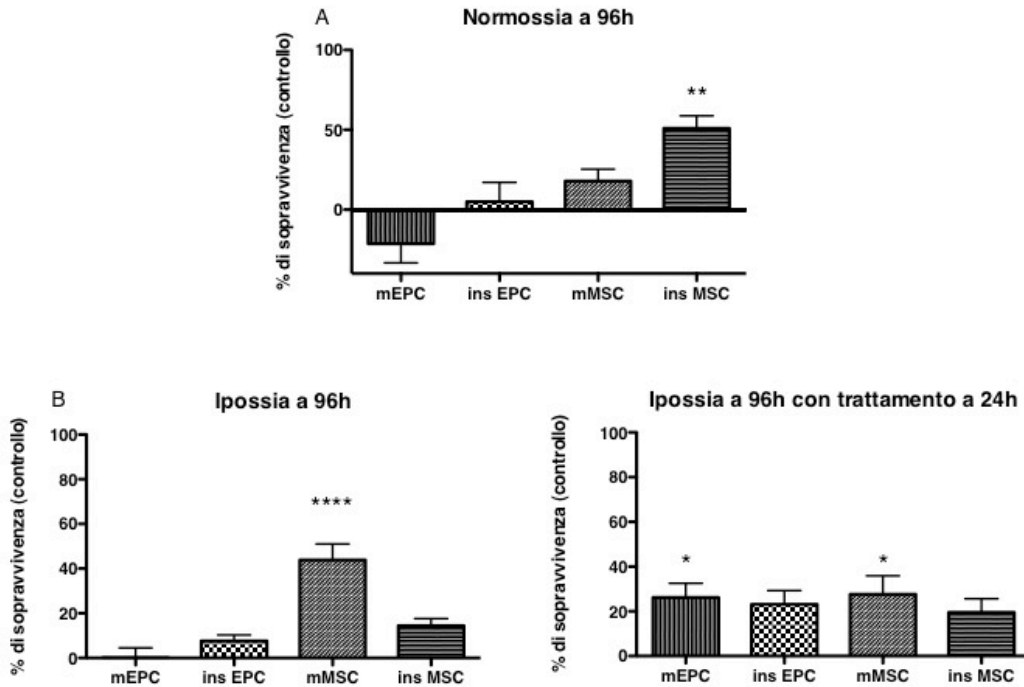


Figura: Quantificazione a 96 ore, mediante colorazione in immunofluorescenza, della sopravvivenza di neuroni sottoposti a deprivazione di ossigeno e glucosio per un'ora (DOG) dopo trattamento con cellule staminali mesenchimali o con progenitori endoteliali di colture neuronali.

(A) Cellule neuronali trattate con medium di cellule progenitrici endoteliali (mEPC), trattate con inserto di progenitori endoteliali (ins EPC), trattate con medium di cellule staminali mesenchimali (mMSC) o trattate mediante inserto di cellule staminali mesenchimali (ins MSC), 96 ore dopo il trattamento (normossia). Si noti come il trattamento con cellule mesenchimali mediante inserto aumenti significativamente la sopravvivenza dei neuroni. ($p < 0.01$, one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test).

(B) Cellule neuronali trattate con medium di cellule progenitrici endoteliali (mEPC), trattate con inserto di progenitori endoteliali (ins EPC), trattate con medium di cellule progenitrici endoteliali (mEPC) o trattate mediante inserto di cellule staminali mesenchimali (ins MSC), 96 ore dopo DOG. Si noti come il trattamento con il medium di cellule staminali mesenchimali aumenti significativamente la sopravvivenza dei neuroni. ($p < 0.0001$, one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test).

(C) Cellule neuronali trattate a 24 ore con medium di cellule progenitrici endoteliali (mEPC), trattate a 24 ore con inserto di progenitori endoteliali (ins EPC), trattate a 24 con medium di cellule staminali mesenchimali (mMSC) o trattate 24 ore mediante inserto di cellule staminali mesenchimali (ins MSC) a 96 ore dopo DOG. Si noti come il trattamento con il medium di progenitori endoteliali o mediante il medium di cellule staminali mesenchimali aumenti significativamente la sopravvivenza dei neuroni. ($p < 0.05$, one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test). Anche il trattamento mediante inserto induce un aumento di sopravvivenza neuronale che tuttavia non è statisticamente significativo. La sopravvivenza neuronale è stata calcolata come percentuale dei neuroni positivi per MAP-2 sul numero totale di cellule (DAPI) rispetto alla condizione di normossia a 96 ore non sottoposta a

trattamento ed espressa come differenza rispetto a neuroni sottoposti allo stesso danno ma non trattati.

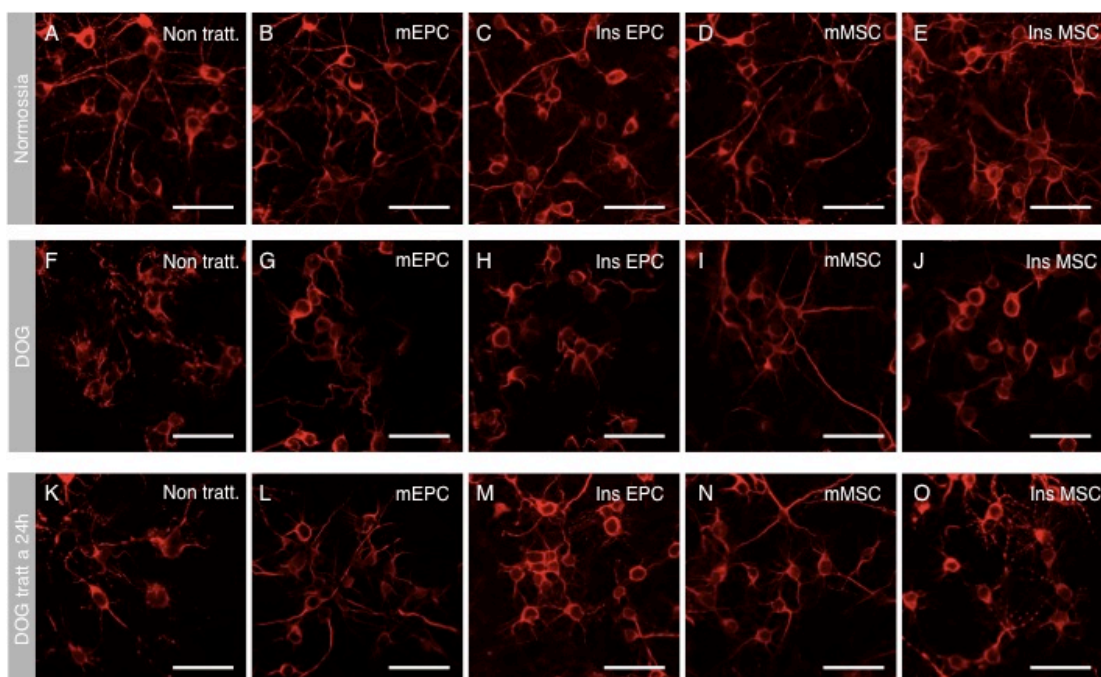


Figura: Il trattamento con cellule staminali mesenchimali o progenitori endoteliali aumenta la sopravvivenza dei neuroni sottoposti a deprivazione di ossigeno e glucosio (DOG) a 96 ore.

Microfotografie in immunofluorescenza di colture neuronali dopo colorazione per MAP-2 (in rosso).

(A- E) Colture neuronali esposte a normossia non trattate (A), trattate con medium di progenitori endoteliali, mEPC (B), trattate con inserti con cellule staminali endoteliali, ins EPC (C), trattate con medium di cellule staminali mesenchimali, mMSC (D) o trattate con inserti con cellule staminali mesenchimali, ins MSC (E).

(F- J) Colture neuronali esposte a deprivazione di glucosio e ossigeno per un'ora non trattate (F), trattate con medium di progenitori endoteliali, mEPC (G), trattate con inserti con cellule staminali endoteliali, ins EPC (H), trattate con medium di cellule staminali mesenchimali, mMSC (I) o trattate con inserti con cellule staminali mesenchimali, ins MSC (J).

(K- O) Colture neuronali esposte a deprivazione di glucosio e ossigeno per un'ora non trattate (K), trattate con medium di progenitori endoteliali, mEPC (L), trattate con inserti con cellule staminali endoteliali, ins EPC (M), trattate con medium di cellule staminali mesenchimali, mMSC (N) o trattate con inserti con cellule staminali mesenchimali, ins MSC (O).

Si può notare chiaramente come il trattamento con cellule mesenchimali in inserto (J, O) e progenitori endoteliali in inserto (M, O) protegga i neuroni dalla morte causata da DOG. (60x) Scala 15 μ m.

La sopravvivenza neuronale dopo i vari trattamenti è stata inoltre valutata anche a 7 giorni dopo l'induzione del danno. Anche a questo timepoint di valutazione molto tardivo, in cui è presente una marcata sofferenza neuronale anche nella condizione

di normossia, il trattamento con mMSC e mEPC così come di insMSC induce una significativa riduzione della morte neuronale. Simile a quanto osservato a 96 ore anche a 7 giorni le mMSC, quando applicate subito dopo danno neuronale, esercitano un significativo rescue. Tra i trattamenti applicati invece a 24 ore solo il trattamento con mMSC sembra a 7 giorni riuscire ad indurre una significativa protezione dal morte neuronale tardiva.

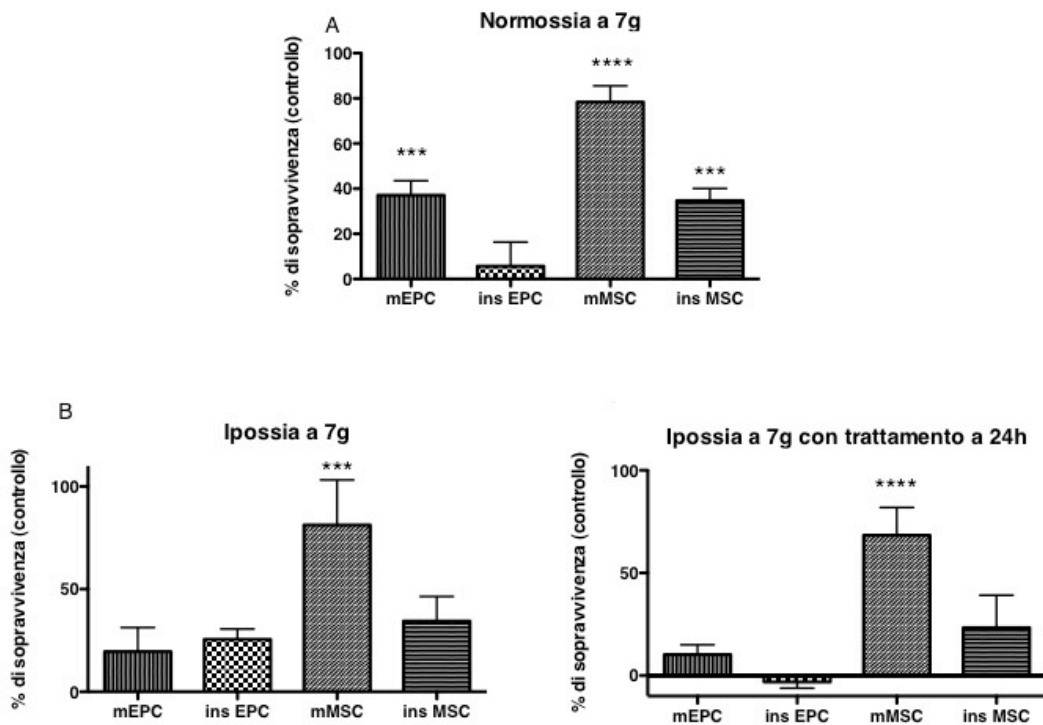


Figura: Quantificazione a 7 giorni mediante colorazione in immunofluorescenza della sopravvivenza di neuroni sottoposti a privazione di ossigeno e glucosio per un'ora (DOG) dopo trattamento con cellule staminali mesenchimali o con progenitori endoteliali di colture neuronali.

(A) Cellule neuronali trattate con medium di cellule progenitrici endoteliali (mEPC), trattate con inserto di progenitori endoteliali (ins EPC), trattate con medium di cellule staminali mesenchimali (mMSC) o trattate mediante inserto di cellule staminali mesenchimali (ins MSC) a 7giorni dopo il trattamento (normossia). Si noti come il trattamento con medium di progenitori endoteliali ($p < 0.001$), con il medium di cellule staminali mesenchimali ($p < 0.0001$) o con cellule mesenchimali mediante inserto aumenti significativamente la sopravvivenza dei neuroni ($p < 0.001$, one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test).

(B) Cellule neuronali trattate con medium di cellule progenitrici endoteliali (mEPC), trattate con inserto di progenitori endoteliali (ins EPC), trattate con medium di cellule staminali mesenchimali (mMSC) o trattate mediante inserto di cellule staminali mesenchimali (ins MSC) a 7 giorni dopo DOG. Si noti come il trattamento con il medium di cellule mesenchimali aumenti significativamente la sopravvivenza dei neuroni. ($p < 0.001$, one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test).

(C) Cellule neuronali trattate a 24 ore con medium di cellule progenitrici endoteliali (mEPC), trattate a 24 ore con inserto di progenitori endoteliali (ins EPC), trattate a 24 ore con medium di cellule staminali mesenchimali (mMSC) o trattate a 24 ore mediante inserto di cellule staminali mesenchimali (ins MSC) a 7 giorni dopo DOG. Si noti come il trattamento con il medium di cellule mesenchimali aumenti significativamente la sopravvivenza dei neuroni. ($p < 0.0001$, one-way ANOVA, Bonferroni post-hoc test).

La sopravvivenza neuronale è stata calcolata come percentuale dei neuroni positivi per MAP-2 sul numero totale di cellule (DAPI) rispetto alla condizione di normossia a 96 ore non sottoposta a trattamento ed espressa come differenza rispetto a neuroni sottoposti allo stesso danno (7 gg) ma non trattati.

Studio dei progenitori endoteliali nel vasospasmo

Caratteristiche cliniche

Le caratteristiche cliniche dei pazienti inclusi nello studio sono riassunte nella tabella sotto. Sono stati inclusi 10 pazienti affetti da emorragia subaracnoidea (ESA). Nei giorni successivi all'ESA 4 pazienti su 10 hanno sviluppato vasospasmo (3 pazienti hanno sviluppato vasospasmo in 6-7 giornata mentre uno in 9-10 giornata). I pazienti che non hanno sviluppato vasospasmo avevano un aneurisma a livello dell'arteria comunicante anteriore (3 pazienti), dell'arteria cerebrale media di sx (1 paziente), dell'arteria comunicante posteriore (1 paziente) o a livello paraclinoideo della carotide interna intracranica (1 paziente). I pazienti che hanno poi sviluppato vasospasmo non differivano per la distribuzione dell'aneurisma: 2 pazienti con aneurisma a livello della arteria comunicante anteriore, 1 paziente con aneurisma dell'arteria cerebrale media e un paziente con aneurisma a livello dell'arteria carotide interna - tratto intracranico.

Inoltre i due gruppi, pazienti senza vasospasmo e pazienti con vasospasmo non differivano al momento del ricovero per età (66.17 ± 5.75 e 60.0 ± 5.47 rispettivamente, $p=0.52$, Mann-Whitney test), per CGS (11 ± 1.15 e 13.5 ± 0.28 rispettivamente, $p=0.22$, Mann-Whitney test), per WFNS (3.3 ± 0.42 e 2.0 ± 0 rispettivamente, $p=0.06$, Mann-Whitney test), per il punteggio di Hunt & Hess (2.83 ± 0.3 e 3.0 ± 0 rispettivamente, $p=0.69$, Mann-Whitney test), per il punteggio di Fisher (3.67 ± 0.21 e 3.5 ± 0.28 rispettivamente, $p=0.7$, Mann-Whitney test), per outcome mRS (4.16 ± 0.6 e 4.5 ± 0.86 rispettivamente, $p=0.9$, Mann-Whitney test). I due gruppi differivano tuttavia per sesso (100% di femmine nel gruppo senza vasospasmo e 25% di femmine nel gruppo vasospasmo, $p=0.011$, Mann-Whitney test).

Tabella: Caratteristiche cliniche di 10 pazienti affetti da emorragia subaracnoidea.

Età	Sesso	Aneurisma	VS	Tratt.	CGS	WFNS	HH	Fisher score	mRS	idrocefalo - drenaggio	shunt	ICH	Edema cerebrale	Fumo	Ipert.	Cardio	PA iniz.	Prel.
71	F	AcomA	no	Clipping	12	4	3	3	6	si	DSE	no	no	nd	si	no	129/60	a
67	F	ACM sx	no	Clipping	7	4	4	4	6	no	no	si	si	nd	si	no	220/110	a
64	F	AcomPdx	no	Clipping	10	4	3	4	3	si	DSE			si	si	no	155/70	a - v
70	F	AComA	no	Endov.	14	2	2	3	3	no	no	no	no	si	si	si	140/60	a - v
84	F	ICA e PCA embr	no	Endov.	9	4	3	4	3	no	no	si	si	nd	si	nd	200/60	v
41	F	AcomA	no	Clipping	14	2	2	4	4	no	no		no	si	si	si	117/76	v
64	F	ICA dx	si	Endov.	14	2	3	4	6	si	DVE	si	si	si	si	si	130/70	a
72	M	AcomA dx	si	Clipping	13	2	3	3	3	si	DSE poi shunt	no	no	si	si		154/65	a
58	M	ACM dx	si	Clipping	14	2	3	3	3	si	DSE	no	no	si	si	nd	130/80	a - v
46	M	AcomA	si	Clipping	13	2	3	4	6	si	DVE		so	si	si	no	170/63	a - v

Abbreviazioni: AcomA, arteria comunicante anteriore; AcomP, arteria comunicante posteriore; ACM, arteria cerebrale media; Cardio., cardiopatie; CGS, Glasgow coma score; F, femmina; M, maschio; HH, Hunt & Hess score; ICA, cartotide interna; ICH, emorragia intracerebrale; Ipert., ipertensione; M, maschio; mRS, modified rankin score; PA iniz., pressione arteriosa al momento del ricovero; PCA, arteria cerebrale posterior; VS, vasospasmo; WFNS, World Federation of Neurosurgical Societies score; a, prelievo arterioso; v, prelievo venoso.

Considerando i valori di pressione arteriosa e gli esami ematochimici i pazienti senza vasospasmo non differivano al momento del ricovero da quelli con vasospasmo per pressione sistolica (160.0 ± 16.7 e 146.0 ± 9.7 rispettivamente, $p=0.91$, Mann-Whitney test), pressione diastolica (72.6 ± 7.9 e $68.7 \pm$ mmHg rispettivamente, $p=0.66$, Mann-Whitney test), leucociti (11.9 ± 2.6 e $11.8 \pm 1.3 \times 10^3/uL$ rispettivamente, $p=0.59$, Mann-Whitney test), emoglobina (11.28 ± 0.65 e 11.5 ± 1.2 g/dL rispettivamente, $p=0.89$, Mann-Whitney test), protrombina (90.9 ± 4.6 e 92.5 ± 3.5 % rispettivamente, $p=0.91$, Mann-Whitney test), INR (1.0 ± 0.03 e 1.05 ± 0.02 rispettivamente, $p=0.91$, Mann-Whitney test), antitombina III (82.25 ± 5.8 e 90.5 ± 3.7 % rispettivamente, $p=0.88$, Mann-Whitney test), PCR (16.67 ± 13.6 e 37 ± 20 mg/L rispettivamente, $p=0.4$, Mann-Whitney test) e fibrinogeno (333 ± 40.23 e 284 ± 38.3 mg/dL rispettivamente, $p=0.63$, Mann-Whitney test).

In 9-12 giornata i pazienti senza vasospasmo non differivano rispetto ai pazienti con vasospasmo per pressione sistolica (140 ± 5.7 e 133 ± 5.12 mmHg rispettivamente, $p=0.8$, Mann-Whitney test), pressione diastolica (63.3 ± 3.3 e 71.5 ± 3.5 mmHg rispettivamente, $p=0.37$, Mann-Whitney test), leucociti (11.28 ± 1.4 e $14.52 \pm 0.41 \times 10^3/uL$ rispettivamente, $p=0.16$, Mann-Whitney test), emoglobina (9.4 ± 0.42 e 10.5 ± 0.5 g/dL rispettivamente, $p=0.19$, Mann-Whitney test), protrombina (85.4 ± 5.7 e 76 ± 2.3 % rispettivamente, $p=0.35$, Mann-Whitney test),

INR (1.1 ± 0.04 e 1.1 ± 0.03 rispettivamente, $p=0.35$, Mann-Whitney test), antitombina III (102 ± 5.2 e 121 ± 7.7 % rispettivamente, $p=0.11$, Mann-Whitney test), VES (82 ± 9.6 e 64.5 ± 2.5 mm/h rispettivamente, $p=0.53$, Mann-Whitney test), PCR (101.6 ± 60.1 e 68.4 ± 32.3 mg/L rispettivamente, $p=1$, Mann-Whitney test).

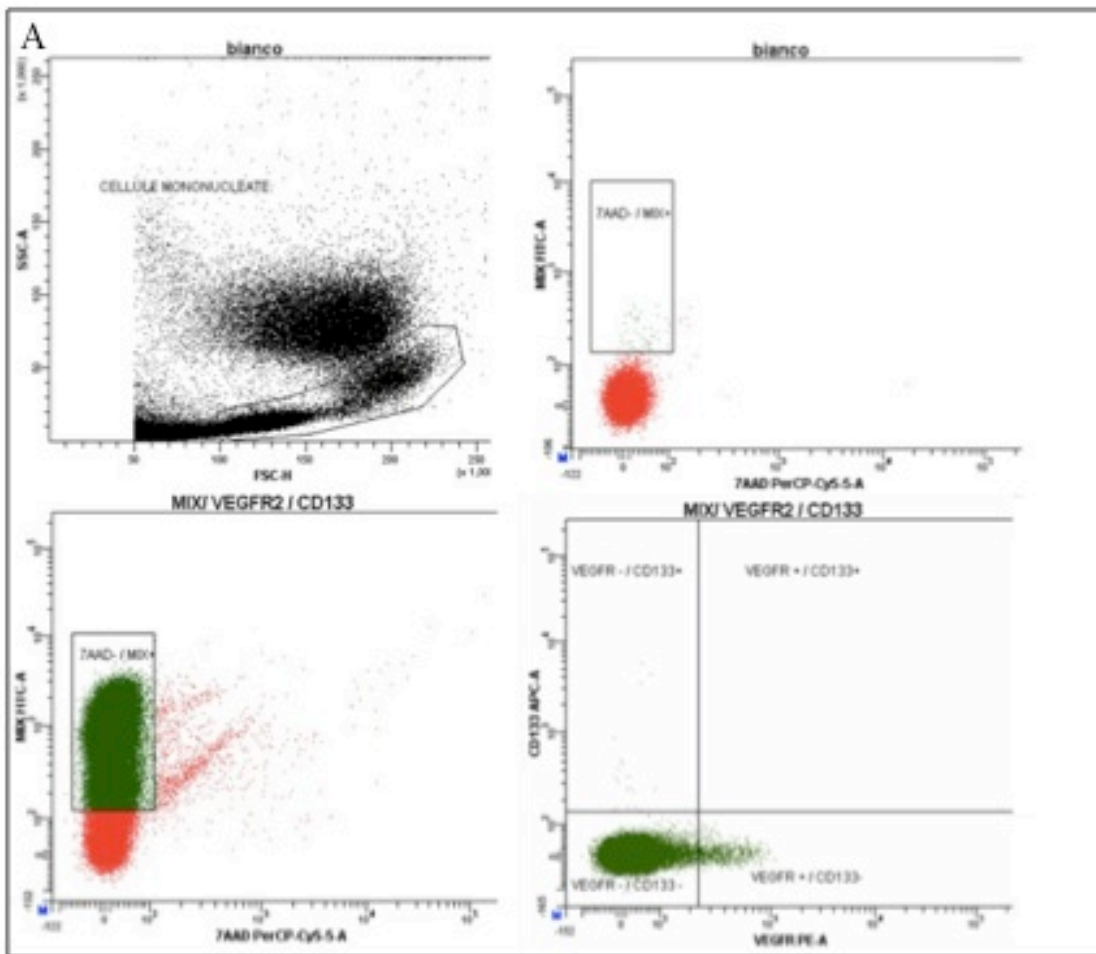
Sono stati inoltre analizzati markers di infiammazione nei giorni successivi al ricovero in pazienti senza vasospasmo e con vasospasmo: al giorno 4-5 il fibrinogeno era di 491 ± 34.8 e 656 ± 28.5 mg/dL rispettivamente, $p=0.13$, Mann-Whitney test, la proteina C reattiva di 133 ± 66.5 e 140 ± 38.9 mg/L rispettivamente, $p=0.8$, Mann-Whitney test, i leucociti (13 ± 1.4 e $8.8 \pm 1.0 \times 10^3$ /uL rispettivamente, $p=0.13$, Mann-Whitney test); successivamente al 7-9 giorno i livelli di proteina C reattiva erano di 41.4 ± 8.9 e 67.5 ± 30.9 mg/L rispettivamente, $p=0.78$, Mann-Whitney test e i leucociti erano 11 ± 1.4 e $9.7 \pm 0.36 \times 10^3$ /uL rispettivamente, $p=0.45$, Mann-Whitney test.

Analisi citofluorimetrica della presenza di progenitori endoteliali in pazienti con emorragia subaracnoidea: messa a punto di saggio citofluorimetrico per la quantificazione e l'isolamento delle EPC circolanti (EPCc)

Prima di procedere con l'analisi dei campioni di sangue derivati dai pazienti con emorragia subaracnoidea per studiare la correlazione tra la comparsa del vasospasmo e la presenza di progenitori endoteliali si è cercata di mettere a punto l'analisi citofluorimetrica partendo da sangue derivato da controlli sani.

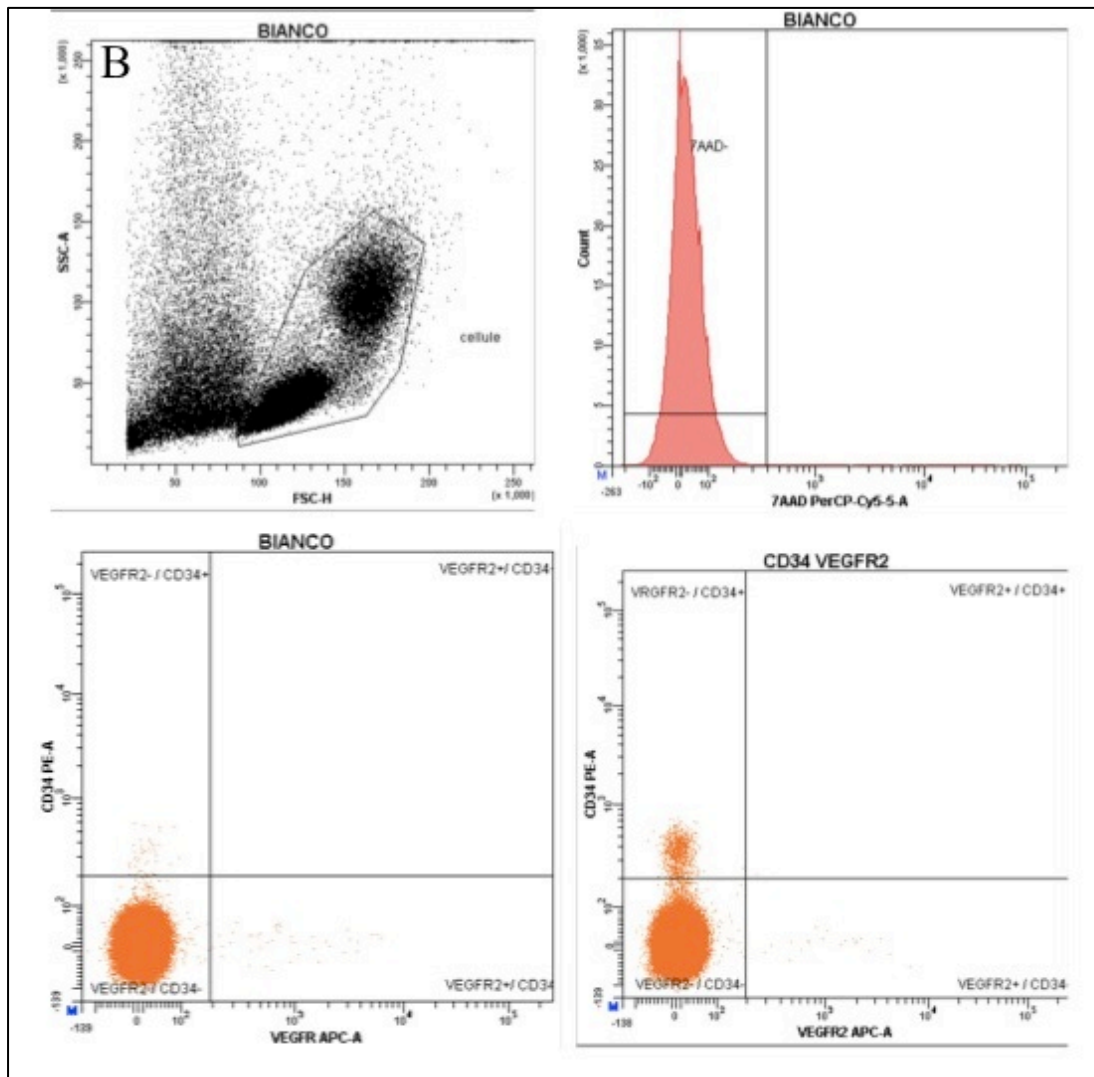
La popolazione cellulare in studio, progenitori endoteliali precoci circolanti (EPC), dovrebbe avere il seguente fenotipo: CD34+, VEGFR2+ e CD133+.

Tuttavia, nonostante siano state eseguite prove su campioni biologici diversi (sangue intero, cellule mononucleate e cellule CD34+ da sangue periferico); allo scopo di arricchire il campione dei progenitori d'interesse, e sia stato usato l'intercalante 7AAD per escludere dall'analisi le cellule morte, il limite di rilevazione della citofluorimetria (0.01%) si è rivelato insufficiente per la quantificazione delle cEPC- vedi figura sotto.



Tube: MIX/VEGFR2 / CD133

Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	608,738		100.0
■ CELLULE MONONUCLEATE	227,639	37.4	37.4
■ 7AAD- / MIX+	204,103	89.7	33.5
⊗ VEGFR- / CD133+	19	0.0	0.0
⊗ VEGFR+ / CD133+	0	0.0	0.0
⊗ VEGFR- / CD133-	203,294	99.6	33.4
⊗ VEGFR+ / CD133-	790	0.4	0.1



Tube: CD34 VEGFR2

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	1,724,249		100.0
cellule	1,234,741	71.6	71.6
7AAD-	1,231,964	99.8	71.4
VRGFR2- / CD34+	1,169	0.1	0.1
VEGFR2+ / CD34+	1	0.0	0.0
VEGFR2- / CD34-	1,230,774	99.9	71.4
VEGFR2+ / CD34-	20	0.0	0.0

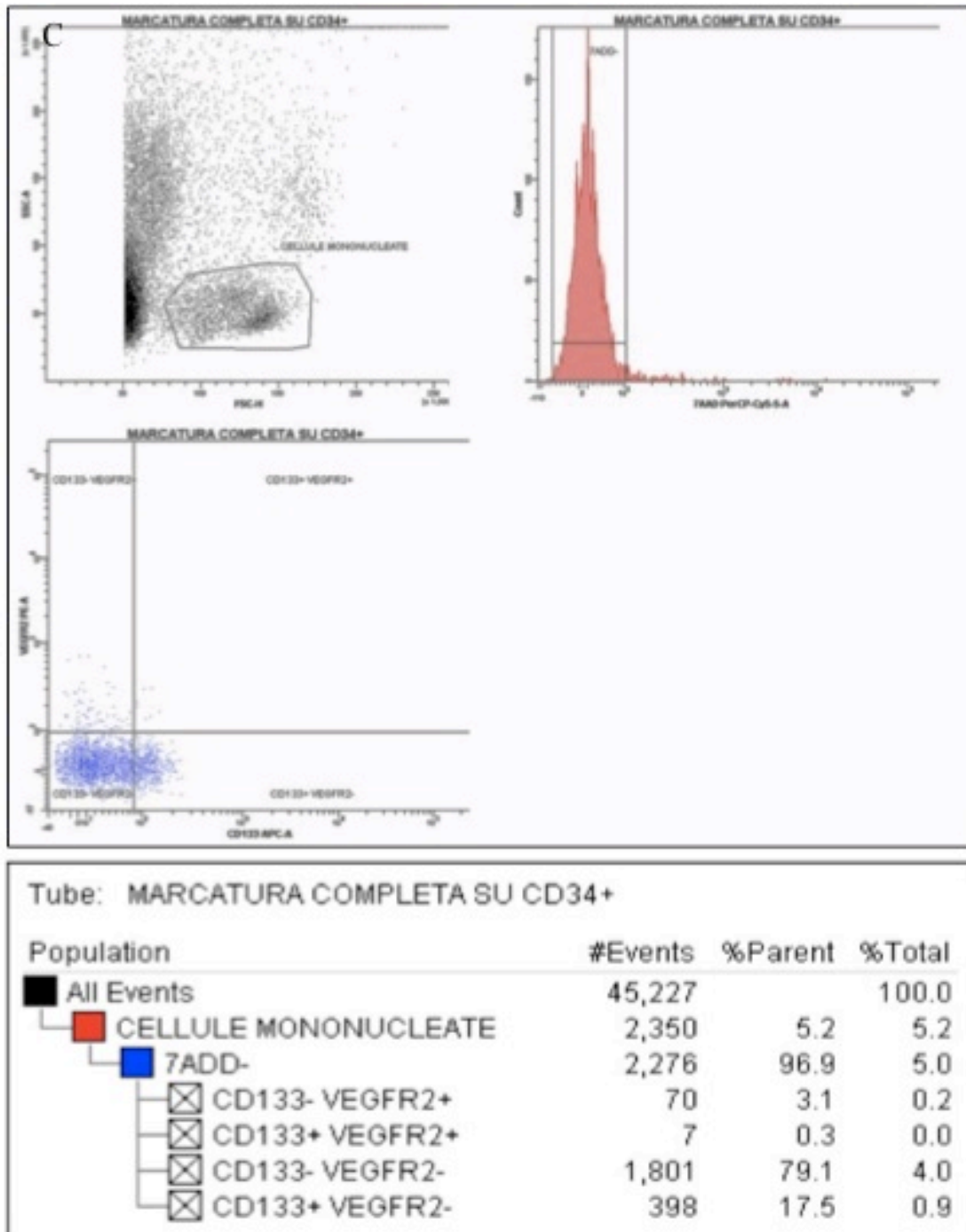


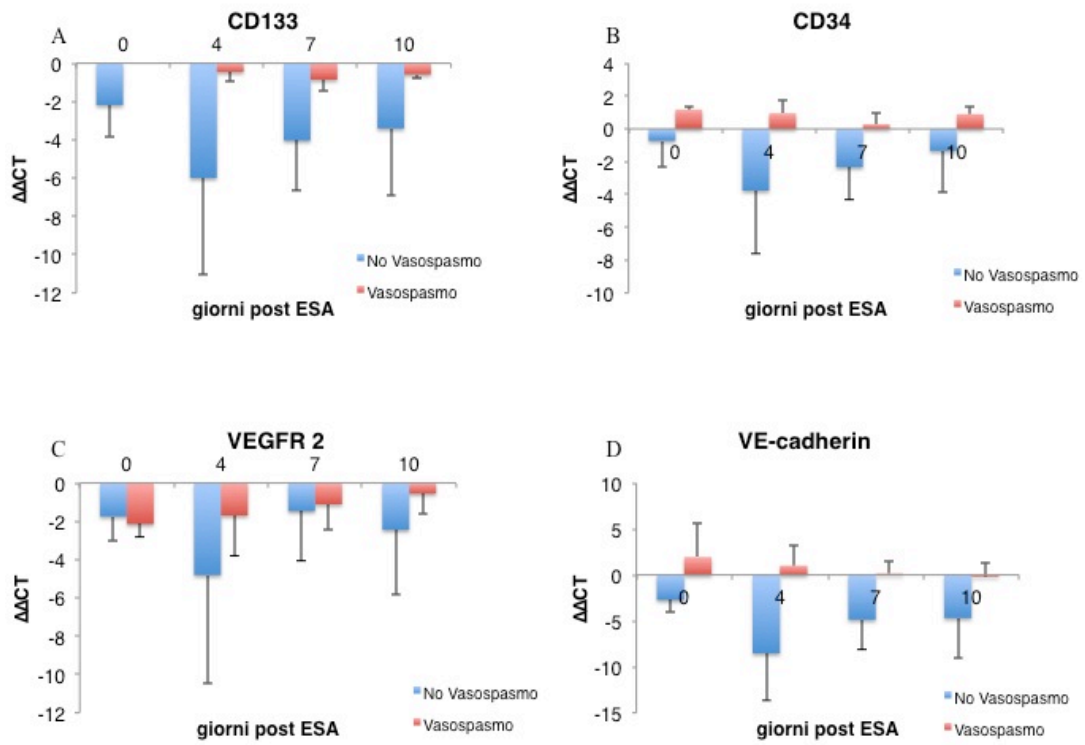
Figura: Prova di quantificazione delle EPCc mediante analisi citofluorimetrica: Le cellule sono state marcate con CD34-FITC, CD133-APC, VEGFR-PE, l'analisi è stata condotta sulla popolazione delle cellule mononucleate vive (7AAD negative) e CD34⁺. (A) sangue periferico intero; (B) cellule mononucleate da sangue periferico; (C) cellule CD34⁺ da sangue periferico. La percentuale di EPCc, CD34⁺, CD133⁺ e VEGFR⁺ è 0, non si riescono ad individuare le EPCc.

Analisi semi-quantitativa mediante Real Time PCR dell'espressione di marcatori delle EPCc su sangue di pazienti affetti da emorragia subaracnoidea.

A vari timepoints (1, 4, 7 e 10 giorni) dopo emorragia subaracnoidea è stato prelevato , in pazienti che hanno sviluppato vasospasmo (n=4) e in pazienti senza vasospasmo (n=4), sangue arterioso e sono state estratte le cellule mononucleate per l'analisi tramite real-time PCR dell'espressione di marcatori di EPCs quali CD133, CD34, VEGFR-2, VE-cadherina.

L'analisi ha dimostrato come i pazienti con ESA che hanno sviluppato vasospasmo dimostrano, rispetto ai pazienti con ESA senza vasospasmo, precocemente ai giorni 4 e 7 una marcata riduzione dei $\Delta\Delta CT$ di CD133 (non determinato, 46.5, 9.0, 7.1; rapporto tra la quantità di mRNA di pazienti senza e con vasospasmo al giorno 0, 4, 7 e 10 rispettivamente) , CD34 (3.7, 26.2, 6.1, 4.7; rapporto tra la quantità di mRNA di pz senza e con vasospasmo al giorno 0, 4, 7 e 10 rispettivamente), VEGFR-2 (0.7, 8.6, 1.2, 3.7; rapporto tra la quantità di mRNA di pazienti senza e con vasospasmo al giorno 0, 4, 7 e 10 rispettivamente) e VE-cadherina (25.5, 746.5, 32.9, 22.5; rapporto tra la quantità di mRNA di pazienti senza e con vasospasmo al giorno 0, 4, 7 e 10 rispettivamente). Questa riduzione del valore di $\Delta\Delta CT$ è indicativa di un aumento della quantità di mRNA presente nel sangue arterioso dei pazienti senza vasospasmo, indica quindi indirettamente un aumento di EPCc. Purtroppo per la scarsa numerosità dei gruppi studiati ed i numerosi timepoint scelti l'analisi statistica (2-way ANOVA con fattore trattamento e tempo, Bonferroni post-hoc test) non ha mostrato differenze statisticamente significative. Tenendo tuttavia conto delle importanti differenze che si sono viste ai vari timepoint tra i due gruppi è stata calcolata la dimensione approssimativa del campione per ottenere un test statisticamente significativo (potenza, β 80%; α = 5%). La numerosità per campione sarebbe di n= 9-12 pazienti per gruppo (quindi un totale di ca 18-24 pazienti).

I.



II.

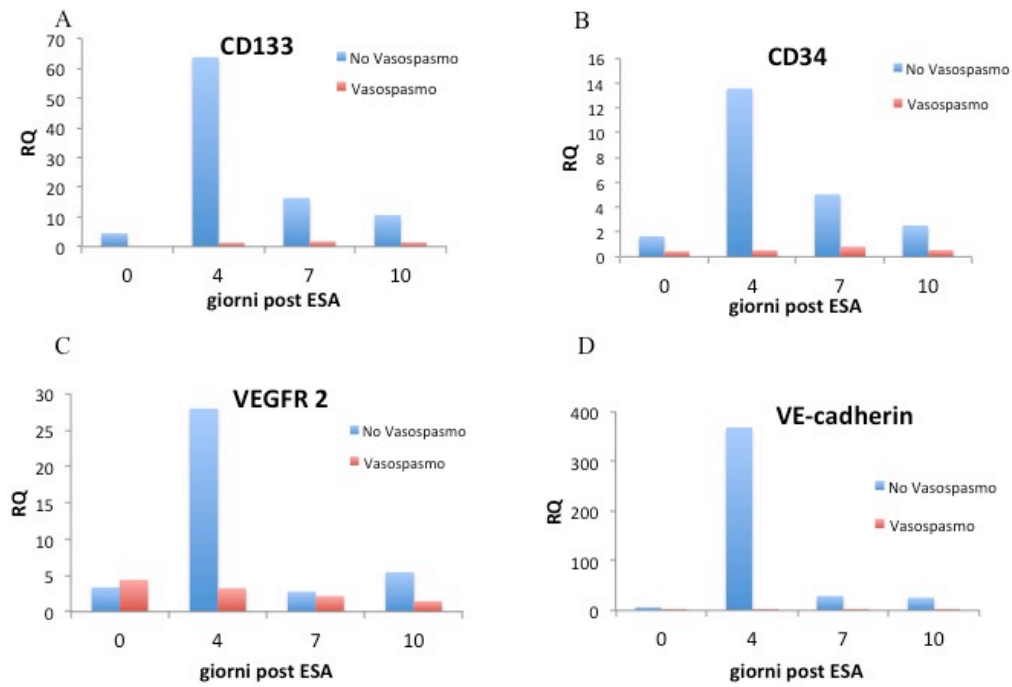


Figura: Analisi semi-quantitativa tramite rt-PCR dell'espressione di geni di progenitori endoteliali dopo emorragia subaracnoidea.

Analisi temporale dell'espressione di CD133 (A), CD34 (B), VEGFR-2 (C) e VE-cadherina (D), quali marcatori di EPCc nel sangue arterioso di pazienti con emorragia subaracnoidea senza vasospasmo (in blu) e con vasospasmo (in rosso) a 0, 4, 7 e 10 giorni dopo ESA. Si tenga conto che il vasospasmo nella maggioranza dei pazienti compare tra il 7 e il 10 giorno.

Sopra (I.) i valori di CT sono stati normalizzati per il riferimento endogeno [$\Delta CT = CT \text{ (target gene)} - CT \text{ (Beta Actina)}$] e confrontati con un gruppo di pazienti sani con la formula $\Delta\Delta CT$ [$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ (campione)} - \Delta CT \text{ (pazienti sani)}$]. I dati sono rappresentativi della media del gruppo (n=2-5 pazienti per gruppo per timepoint) \pm errore standard.

Sotto (II.) gli stessi dati sono espressi come real quantity (RQ) calcolata con la formula $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$

VI. Discussione

L'ischemia svolge un ruolo cruciale nell'*outcome* del paziente con emorragia subaracnoidea (ESA) e sempre più evidenze ne sottolineano una genesi multifattoriale: l'ipoperfusione o addirittura l'arresto del circolo cerebrale durante la fase di rottura dell'aneurisma, il vasospasmo delle grandi arterie subaracnoidee e anche la compromissione dell'autoregolazione distale a livello arteriolare e capillare, la presenza di microemboli, i fenomeni infiammatori che comportano edema interstiziale peggiorando le qualità di perfusione (*Pluta RM-Neurol Res 2009*).

In accordo con la letteratura più recente quindi il vasospasmo sembrerebbe solo un indicatore o una componente di un fenomeno più complesso ed ancora da chiarire. Recenti evidenze hanno mostrato che farmaci che agiscono sul vasospasmo, riducendone l'incidenza oppure volti a rilasciare lo spasmo dove presente- non sono stati ugualmente incisivi nel miglioramento dell'*outcome* (*Etminan N-JCBFM 2011*) e la prognosi rimane grave per un numero considerevole di pazienti, considerando che la mortalità varia dal 27-44% e che negli ultimi trent'anni si è osservata una riduzione della mortalità pari al 17% (*Nieuwkamp DJ-Lancet Neurol 2009*) per non parlare della morbilità. Ci sono anche evidenze di pazienti con danno ischemico tardivo in assenza di vasospasmo (*Woitzik J-J Cereb Blood Flow Metab 2011; Vergouwen MD-Stroke 2011*).

Come illustrato nell'introduzione, gli effetti dell'ESA sono articolati e pleiotropici e farmaci con un target particolare sul complesso meccanismo dello spasmo rischiano di avere il ruolo dell'anello mancante in una catena, che però non è più la stessa e che quindi non può rispondere alla maniera ideale, ipotizzata nel modello fisiopatologico - per esempio si aumenta un trasmettitore, ma è cambiata l'espressione del rispettivo recettore - come il recettore ET(A) per l'endotelina (*Kikkawa Y-JCBFM 2011; Vatter H-Acta Neurochir Suppl 2011*).

Per questo motivo aumenta l'interesse per farmaci pleiotropici, con effetti potenzialmente utili più articolati.

Già la nimodipina, oltre al ruolo di rilassante del muscolo liscio vascolare sembra dovere la sua efficacia ad un altro effetto, alla neuroprotezione (*Sahlin C-Brain Res 1987*).

Le statine inoltre presentano un profilo interessante perché agiscono su fronti

multipli: sulla funzione endoteliale, come antiossidanti, antiinfiammatori, antitrombotici, e come neuro e vasoprotettori (*Sabri M-World Neuosurg 2010*).

In questo panorama sembra appropriato l'interesse per le terapie 'intelligenti' ovvero cellule - mediate, e la valutazione di un approccio con cellule staminali.

Tuttavia l'approccio terapeutico con cellule staminali è spesso considerato con diffidenza nel timore di effetti collaterali non prevedibili come una proliferazione non controllata delle cellule trapiantate e quindi la loro oncogenicità ed il loro orientamento verso funzioni indesiderate (come la partecipazione alla cicatrice gliale, l'epilettogenicità etc.), nonché i costi ed i rischi – inclusi il rigetto e le infezioni relative al trapianto.

Recenti evidenze hanno sottolineato il ruolo delle cellule staminali come regolatori e bystander, piuttosto che come elementi con ruolo sostitutivo dei tessuti danneggiati - infatti la sopravvivenza delle cellule trapiantate nei tessuti ospitanti è spesso limitata (*Martino G-Nat Rev Neurosci 2006; Bacigaluppi M-Brain 2009*):

L'effetto delle staminali nel sistema nervoso sembrerebbe soprattutto rivolto al reclutamento degli elementi progenitori endogeni già presenti nelle nicchie staminali, all'orchestrazione di una risposta immunitaria meglio orientata verso un ripristino strutturale e funzionale piuttosto che verso la formazione di tessuto cicatriziale. Per questo motivo si sono trovate numerose analogie tra le cellule staminali neurali e le cellule staminali mesenchimali in termini di fattori neuroprotettori e/o antiinfiammatori prodotti e di meccanismi d'azione (*Martino G-Physiol Rev 2011*). Da queste ed analoghe considerazioni è cresciuto l'interesse per il potenziale utilizzo di cellule staminali non propriamente residenti nel sistema nervoso come potrebbero essere state le cellule staminali neuronali e l'attenzione si è spostata su una tipologia di cellula staminale più facilmente reperibile come le cellule staminali mesenchimali, presenti nei tessuti connettivi e nel midollo osseo.

Recentemente la scoperta delle cellule staminali endoteliali ha aperto nuove vie - ed il rapporto tra il loro valore prognostico ed il loro valore funzionale deve ancora essere chiarito, soprattutto per le patologie dell'apparato cardiocircolatorio e cerebrovascolare (*Sobrino T-Stroke 2007; Michowitz Y-Heart 2007; Rouhl RP-Stroke 2008*).

Un incredibile vantaggio inerente alle cellule progenitrici endoteliali riguarda la loro possibilità di essere mobilizzate nel sangue sia con stimoli endogeni, sia attraverso la somministrazione di farmaci o di citochine (*Hristov M-Arterioscler*

Thromb Vasc Biol 2003; Kusuyama T-J Pharmacol Sci 2006; Heeschen V-Blood 2003).

In vitro sono stati descritti numerosi modelli di ischemia, ma la maggior parte di essi è stato disegnato per valutare meccanismi molecolari associati ad essa o per indagare delle molecole protettive - per cui la maggior parte di questi modelli limita la valutazione alle prime ore o massimo alle prime 24 ore (*Kusumoto M-Metab Brain Dis 1997; Alonso D-Neuroscience 2002; Arthur PG Brain Res 2004; Jones PA- Cell Res 2004; Pellegrini G-Neuropharmacol 1999; Lynch Neurosci Lett 1998).*

Nel nostro caso, trattandosi della valutazione dell'efficacia di terapie cellulari abbiamo considerato un periodo più esteso.

I modelli in vitro comprendono le 'slice cultures' di ippocampo o di encefalo (*Vornov JJ -Brain Res 1994; Rabinovic GD-Clin Neurophysiol 2000)* colture di neuroni immortalizzati (*Pleasure SJ-J Neurosci 1992)* o colture primarie di neuroni miste (*Kaushal V-J Neurosci 2008)* o pure (*Scorziello A- J Neurosci Res 1997).*

Per ridurre il numero di variabili e trattandosi comunque di un modello -in vitro- ci siamo focalizzati quindi sulla coltura primaria di neuroni corticali di ratto. Per modellizzare l'ischemia in letteratura sono stati utilizzati modelli di danno neurologico come l'esposizione al glutammato che causa un danno eccitotossico (*Semkova I-Brain Res 1996)* o ossidativo come il mesilato della desferoxamina (*Zaman K-J Neurosci 1999).*

Per il nostro scopo è stata privilegiata la deplezione di ossigeno e glucosio come modello di danno neuronale perché le cascate che conseguono a questa deplezione energetica sono molteplici mentre per esempio il rilascio del glutammato può essere uno degli effetti, ma non l'unico. Inoltre abbiamo ritenuto che il doppio stimolo di privazione di ossigeno e glucosio potesse essere più fisiologico rispetto alla sola privazione di uno dei due elementi oltre ad essere più efficace nell'indurre morte neuronale ritardata (*Jones PA-Cell Res 2004).*

I tempi di esposizione all'OGD sono confrontabili con quelli descritti in letteratura che generalmente variano tra i 30 minuti (*Alonso D Neuroscience 2002), 40 minuti (Arthur PG-Brain Res 2004); 1 ora (Pellegrini G-Neuropharmacol 1999; Lynch J- Neurosci Lett 1998; Scorziello A-J Neurosci Res 2001) 2 ore (Kapinya KH-J Neurochem 2003; Scorziello A J-Neurosci Res 2003) o 0-6 ore (Jones PA-Cell Res*

2004).

Dalle analisi di sopravvivenza cellulare abbiamo potuto osservare che in condizioni di normossia la sopravvivenza cellulare valutata a 24 ore è ridotta in maniera significativa con la deprivazione di glucosio di due ore, mentre invece è più moderata per i tempi di 30 minuti e di un'ora.

Sempre valutando la sopravvivenza a 24 ore, la sola deprivazione di ossigeno per 30, 60 e 120 minuti non avrebbe un impatto rilevante sulla sopravvivenza neuronale.

La doppia deprivazione - di ossigeno e glucosio- per dei tempi crescenti di 30, 60 e 120 minuti risulta in un progressivo aumento dei neuroni sofferenti e dei neuroni morti, con una significatività a partire dai 60 minuti ed una mortalità a questo punto non troppo differente da quella osservata con un'esposizione a doppia deprivazione di 120 minuti.

Valutando le colture 96 ore dopo l'induzione si osserva una riduzione fisiologica dei neuroni vivi anche nelle colture non trattate.

La sola deprivazione di glucosio provoca una riduzione della sopravvivenza piuttosto graduata per i tempi 30, 60 e 120 minuti. Risulta particolarmente ridotta la sopravvivenza dei neuroni sottoposti a 120 minuti di deprivazione di glucosio.

A questo punto temporale di osservazione si nota anche una decrementale sopravvivenza a seconda del periodo di esposizione (30,60 e 120 minuti) del solo stimolo ipossico, con una riduzione significativa per i 120 minuti.

La doppia deprivazione assume una significatività per i tempi di 60 e 120 minuti, con differenze sfumate tra questi ultimi due tempi.

I risultati valutati in campo chiaro sono anche stati confermati dall'analisi delle immagini al microscopio confocale ed in fluorescenza dopo marcatura dei neuroni con MAP-2, colorazione per la glia con GFAP e dapi (quest'ultimo solo in fluorescenza per le conte).

Abbiamo inoltre potuto verificare in tale maniera che le colture si mantenevano, anche a 4 giorni dall'induzione, puramente neuronali- cioè senza alcuna proliferazione della glia - che risultava un reperto occasionale piuttosto raro.

Con questi esperimenti abbiamo quindi ritenuto il tempo di un'ora di deprivazione di ossigeno e glucosio quello più adeguato come modello di ischemia in vitro.

Per valutare quindi l'efficacia del trattamento con cellule mesenchimali e progenitori endoteliali per l'ischemia cerebrale, abbiamo utilizzato il modello sopra

descritto di deprivazione di ossigeno e glucosio (DOG) scegliendo 60 minuti come tempo di esposizione.

Precedenti prove di co-culture eseguite dal nostro gruppo di ricerca con neuroni corticali e cellule mesenchimali avevano mostrato come le cellule mesenchimali a contatto diretto con il neurone ne favorissero il distacco, per cui nel disegnare questo set-up sperimentale abbiamo preso in considerazione il medium condizionato dalle staminali e l'inserto. Si deve prendere atto che per motivi tecnici non abbiamo eseguito gli esperimenti con l'inserto sulle dish grigliate e quindi non disponiamo del timepoint 24 ore.

Come medium condizionato abbiamo utilizzato il neurobasal medium condizionato dalle staminali per 24 ore e diluito al 50% con neurobasal medium fresco.

Le cellule staminali che abbiamo preso in considerazione comprendono le cellule staminali mesenchimali (MSC) e le cellule progenitrici endoteliali (EPC). I trattamenti sono stati effettuati subito dopo l'induzione o in alternativa dopo 24 ore.

Come controllo sono stati studiati neuroni non sottoposti a stimolo DOG ed ai quali è stato effettuato un cambio terreno allo stesso timepoint dell'induzione degli altri e neuroni non sottoposti ad DOG ma ai quali veniva aggiunto il medium condizionato o l'inserto con MSC o EPC.

In condizioni di normossia il trattamento con staminali non fornisce vantaggi di sopravvivenza a 24 ore, mentre a 96 ore il trattamento con staminali potrebbe contribuire ad un vantaggio di sopravvivenza, in particolare quello relativo all'inserto con MSC. In condizioni di ipossia e di deprivazione di glucosio il vantaggio in termini di sopravvivenza diventa più evidente a 96 ore e anche qui sembrerebbe maggiore l'efficacia delle MSC. Quello che sorprende è che i trattamenti effettuati a 24 ore di distanza dall'induzione hanno un effetto di rescue decisamente più evidente.

Questo da un lato potrebbe sorprendere, considerando che i momenti immediatamente successivi al danno possano essere i più cruciali per il reclutamento degli elementi salvabili. D'altro canto invece è probabile che il cambio terreno per aggiungere i trattamenti dopo 24 ore, permetta di rimuovere i metaboliti tossici rilasciati nelle ore successive al danno dai neuroni e quindi di amplificare l'effetto positivo delle staminali, elicitando una migliore risposta. Del resto l'efficacia di un trattamento 'ritardato' è stata anche osservata su un modello

di neurotossicità da glutammato, nel quale l'effetto sembra essere dovuto all'interferenza con l'apoptosi e con lo scavenging dei radicali (*Schauer E-J Neurotransmission*).

Sarebbe interessante, dopo queste osservazioni ripetere l'esperimento inserendo anche un 'cambio terreno' di controllo dopo 24 ore - cioè con solo neurobasal medium, per meglio valutare l'efficacia di questo rispetto ai trattamenti con staminali.

Nelle valutazioni con immunofluorescenza a 7 giorni i risultati sopra descritti sembrano essere confermati nel loro insieme, anche se è verosimile che subentrino altre variabili: la naturale mortalità dei neuroni in coltura primaria e la sofferenza relativa al terreno che permane da 6-7 giorni. Recentemente è stato pubblicato un lavoro sulle caratteristiche morfologiche ed ultrastrutturali dei neuroni di ratto in coltura primaria che conferma la nostra osservazione: vi è un fisiologico decadimento della popolazione neuronale nel tempo, evidente in modo particolare già al giorno 14 in vitro (che corrisponderebbe al nostro giorno 8 sperimentale), e la sofferenza neuronale risulta particolarmente esacerbata dalla presenza di antibiotico e dal mancato cambio di terreno, piuttosto che dalla sostituzione totale del terreno al cambio, anziché solo di metà (*Robert F-Neuroscience 2011*).

Infine questi esperimenti sono da considerarsi per ora preliminari ed i risultati solamente indicativi di un trend. Andranno riconfermati con esperimenti a maggiore numerosità.

Un altro problema che merita la discussione in questa sede è intrinseco all'utilizzo di colture primarie di neuroni corticali. Nei ripetuti esperimenti abbiamo osservato una certa variabilità tra le colture al momento T0, cioè prima dell'inizio dell'induzione. Questo comporta la difficoltà nel riunire i risultati dei vari esperimenti - dato il noto fenomeno della variabilità sperimentale elevata con colture primarie (*Bourroughs SL-J Neurosci Methods 2012; Johnston P- Methods Mol Biol 2002; Eglén RM-Comb Chem High Throughput Screen 2008*), mentre invece rimane confrontabile il trend degli outcomes tra di essi. Per questo motivo sarà certamente necessario aumentare la ripetizione degli esperimenti, ma anche e soprattutto la numerosità dei campioni all'interno di essi.

Sino ad oggi non vi sono molti esperimenti in vitro che testano l'efficacia delle staminali su modelli di ischemia, ma i nostri risultati sembrerebbero la conferma di quanto dimostrato da altri autori su colture neuronali o su hippocampal slice

colture per le MSC: del loro effetto neuroprotettore anche in assenza di contatto, in coculture o da medium condizionato soprattutto mediato da bFGF, NGF ed IGF (*Sarnowska A-Experim Neurol 2009; Tate CC –Cell Transplant 2010 (abstract)*). In maniera simile cellule mononucleate CD 133+ ma anche CD 133- da sangue di cordone ombelicale in co-culture dirette ed indirette sembravano esercitare un'effetto di rescue sulla morte neuronale dovuta a stimolo OGD sia su colture organotipiche sia su cellule SH-SY5Y (*Reich DM-BMC Neurosci 2008; Hall AA-Neuroscience 2009; Hau S-BMC Neurosci 2008*), tuttavia sono ancora pochi gli studi in questo senso e in vitro non abbiamo identificato altri lavori- i meccanismi sembrano coinvolgere antiossidanti, e fattori neurotrofici (NGF, VEGF, bFGF).

Il fatto che non sia necessario un contatto cellula-cellula ha importanti conseguenze nella pratica clinica e conferma la possibilità di efficaci terapie cellulari anche attraverso il torrente circolatorio (*Li Y –Neurology 2001; Chen Y-J Neurol Res 2003*), rimane però la possibilità che il diretto contatto cellula-cellula permetta un'interazione più complessa (*Sarnowska A- Experim Neurol 2009*).

Il danno neuronale associato ad una deplezione dei substrati energetici come l'ossigeno ed il glucosio implica diversi meccanismi: si associa ad una liberazione del glutammato e sembra esserci un'attivazione dei recettori NMDA in entrambe le fasi. Il rigonfiamento in acuto è mediato dal rapido influsso di Na⁺, Cl⁻ ed acqua ed è peggiorato dalla rimozione del Ca²⁺ extracellulare. La degenerazione ritardata invece dipenderebbe dalla presenza del Ca²⁺ extracellulare e correla strettamente con l'uptake cellulare del Ca²⁺ (*Goldberg MP-J Neurosci 1993*). Un altro meccanismo di danno neuronale tardivo implica la disfunzione di enzimi che partecipano al metabolismo energetico come la piruvato deidrogenasi, un enzima mitocondriale che catalizza la decarbossilazione ossidativa del piruvato a formare dall'Acetyl CoA, NADH e CO₂ - si tratta di una reazione chiave tra il metabolismo energetico anaerobico e quello aerobico. Sembra che ci sia una perdita dell'attività in seguito alla 'riperfusion', dovuta a modificazioni ossidative, per cui in seguito all'ischemia si ha un ridotto consumo di ossigeno e glucosio. Inoltre sembrerebbe che la somministrazione di acetyl-L carnitina riduca il rapporto lattato/piruvato e la perdita neuronale in modelli animali di arresto-cardiocircolatorio (*Martin E-J Neurosci Res 2005*).

Il nostro modello in vitro di danno DOG sembra riprodurre un fenomeno di morte neuronale ritardata e dalle osservazioni morfologiche e dei quadri

immunoistochimici e dalle colorazioni con il DAPI si conferma che sembrano coinvolti diversi meccanismi: autofagia, apoptosi, necrosi e necroapoptosi. Inoltre la finestra temporale in cui si svolgono questi fenomeni presenta somiglianze con la morte cellulare che si osserva nel core- ma nel nostro caso più ancora a livello della penombra ischemica (*Meloni BP-J Neurosci Methods 2011*).

Per valutare se ci sia una correlazione tra le cellule progenitrici endoteliali ed il vasospasmo è stato incominciato uno studio osservazionale nei pazienti con ESA, previa approvazione da parte del comitato etico locale, con l'obiettivo di ottenere dei dosaggi delle EPC nel sangue a diversi tempi dopo il sanguinamento e di valutarne i livelli in relazione al vasospasmo.

L'ipotesi da verificare era se le EPC che in altre malattie cardiocircolatorie e cerebrovascolari sono sia un marcatore, sia un marcatore prognostico positivo (*Jung KH-JCBFM 2008; Bogoslovsky T-Neurology 2010; Rafat N-Stroke 2009*) fossero più numerose, o reclutate 'meglio' nei pazienti senza vasospasmo rispetto a quelli che lo sviluppavano.

E' inoltre stata tenuta traccia delle caratteristiche cliniche di ciascun paziente e dei trattamenti effettuati durante il ricovero, oltre agli esami ematici completi ed al doppler transcranico, nonché eventuali altri esami neuroradiologici ed infine l'outcome alla dimissione.

I timepoints che sono stati scelti sono collocati a distanza di giorni pressoché costanti ed ogni timepoint si colloca in una delle quattro fasi descritte per il vasospasmo: i rilievi sono stati effettuati al giorno 1 (prime 24 ore), 4,7 e 10 dopo l'ESA.

Il campione sino ad ora raccolto appariva ben bilanciato tra il gruppo vasospasmo e non per i seguenti punti: età, GCS, WFNS, Hunt & Hess, Fisher per outcome in GOS. Una differenza tra i due gruppi era nel sesso dei pazienti: 100% donne nel gruppo senza vasospasmo e solo 25% nel gruppo con vasospasmo. Il campione sino ad oggi analizzato è sicuramente molto limitato e lo studio richiederebbe un aumento della numerosità per poter trarre delle conclusioni più certe. Sulla base dei dati ottenuti, abbiamo calcolato che la numerosità del campione dovrebbe essere di 10 pazienti per ciascuno dei due gruppi, considerando però la necessità di bilanciarli, sarebbe opportuno raccogliere sino a 20 pazienti per ciascun gruppo.

Per il dosaggio delle EPC circolanti nei pazienti con ESA abbiamo riscontrato delle difficoltà nell'applicare il dosaggio citofluorimetrico, nonostante avessimo utilizzato diversi protocolli descritti in letteratura, a partenza da sangue intero, con selezione dei mononucleati attraverso lisi eritrocitaria o gradiente su Ficoll, attraverso pre-selezione immunomagnetica di cellule CD 34+, utilizzando come marcatori CD 133, CD 34, VEGFR-2 ed escludendo le cellule non progenitrici con una mix anti CD2/CD13 e CD22, ed utilizzando inoltre controllo isotipico a 7AAD come marcatore di vitalità e le biglie magnetiche come contatori di riferimento (*Cesari F-JCBFM 2009; Shaffer R-Clinical Cytometry 2006; Dulic-Sills A-J Immunol; Duda DG-Nature protocols 2007*).

Le difficoltà con il citofluorimetro sono relative al legame non specifico di controlli isotipici, alla morte cellulare, e soprattutto al fatto che la soglia di rilevamento per il citofluorimetro è di 0.01%, quindi di un ordine di grandezza inferiore alla frequenza di EPC all'interno della popolazione di cellule mononucleate (*Steurer M-BMC Res Notes 2008*). Valutando diversi protocolli utilizzati in studi che quantificavano le EPC nel sangue periferico con metodica citofluorimetrica, abbiamo notato che spesso sono utilizzate quantità di sangue molto esigue e probabilmente insufficienti per rilevare in maniera attendibile un fenomeno così raro, come la percentuale di queste cellule. Molti lavori inoltre quantificavano queste cellule/uL di sangue, senza tenere presente fattori dipendenti o indipendenti come l'ematocrito o la leucocitosi - che potrebbero aver influenzato il numero assoluto delle EPC (*Fadini DP-Atherosclerosis 2008; Valmigli M-Circulation 2004; Leone AM-Eur Heart J 2005; Cesari F-JCBFM 2009*).

Metodiche alternative descritte, ma recentemente un po' contestate sono quantificazioni per metodi colturali (es. la valutazione delle colony forming units CFU). Il problema principale in questo caso è la moltitudine di protocolli utilizzati: sangue intero, monociti etc, con o senza pre-plating, momenti diversi di valutazione, mosaici di antigeni caratterizzanti troppo parziali, e la distanza che separa quello che numericamente si può valutare in coltura sotto forma di colonia e i livelli di EPC nel sangue (adesione, proliferazione, differenziazione) (*Fadini GP-Arteriosclerosis 2008*).

Se però la qPCR ha una soglia di rilevamento per quantità molto inferiori, quindi una sensibilità molto superiore, questa metodica non è specifica. Mentre il riconoscimento di una cellula caratterizzata dalla combinazione di diversi antigeni è

univoca con il citofluorimetro, la qPCR non permette di identificare la presenza in contemporanea su una cellula di diversi marcatori. Inoltre quello che rileviamo con la qPCR è la quantità di RNA espresso all'interno di una popolazione mista ed inoltre il riscontro di RNA cellulare per una data proteina, come nel caso dei nostri antigeni, non significa avere la certezza che questa sia espressa sulla superficie. Tuttavia la movimentazione sincrona di diversi antigeni (ovvero della quantità di RNA) che sono espressi sulle EPC all'interno della popolazione di PBMC lascia ipotizzare che vi sia anche una movimentazione di queste cellule. Dopo un'accurata revisione della letteratura abbiamo scelto di analizzare le EPC osservando i seguenti antigeni: CD133 (AC133), CD34, VEGFR-2 (KDR o flk-1) e la VE caderina (CD144) (*Werner N-Basic Res Cardiol 2007; Dome B-Cancer Res 2006; Hristov M-Arterioscler Thromb Vasc Biol- 2003; Cesari F-JCBFM 2009; Hunting CB-Vox Sanguinis 2005*).

CD 133 è noto come un marcatore precoce delle staminali e progenitrici ematopoietiche (*Yin AH-Blood 1997*). Il numero di cellule CD 133+ nel sangue periferico 'non-mobilizzato' è nell'ordine dello 0.002% di tutti i PBMC (cellule mononucleate da sangue periferico). CD133 non è mai espresso dall'endotelio maturo. CD34 è il prototipo del marcatore staminale – espresso dalle cellule ematopoietiche staminali e dall'endotelio attivato del microcircolo, mentre non è presente sull'endotelio dei grossi vasi - probabilmente questa sialomucina funziona come molecola di adesione per le interazioni tra cellule endoteliali e precursori ematopoietici (*Fina L- Blood 1990; Cheng J-Blood 1996*). IL VEGFR-2 è un recettore tirosin-chinasico cruciale per le funzioni endoteliali, comprese la maturazione e la migrazione (*Karkkainen MJ- Oncogene 2000*). Infine la VE-caderina (VE-CAD o CD 144) è un marcatore condiviso tra le EPC circolanti 'late' e l'endotelio. Questo marcatore non è espresso dalle staminali a livello del midollo osseo (*Ribatti D-Leukemia Res 2007; Sen S-Clinical Science 2011; Resch T-Stem Cell Rev 2011*). Altri marcatori condivisi con l'endotelio maturo sono il platelet endothelial cell adhesion molecule (CD31) il vWF, eNOS e l'uptake delle LDL acetilate (*Hristov M-TCM 2003*). Da diversi lavori di revisione della vasta ed eterogenea letteratura sulle EPC, emerge che le EPC in realtà non sono cellule definite in maniera unica, ma che rappresentano un continuo da nicchie come il midollo osseo attraverso il circolo ematico e l'endotelio maturo, riflesso anche nell'espressione antigenica.

In letteratura la misurazione del livello dei marcatori delle EPC del sangue periferico con qRT-PCR è stata effettuata anche da altri autori utilizzando gli stessi marcatori: VEGFR-2, CD133, CD34 e VE-cad (*Dome B-Canc Res 2006*), inoltre, considerando i lavori più recenti e la critica emersa verso l'utilizzo della citofluorimetria, oltre che verso i metodi di coltura con il conteggio delle unità formanti colonie, la qRT-PCR è riconosciuta come metodica valida per riflettere il loro andamento (*Resch T-Stem Cell Rev 2011; Fadini GP-Atherosclerosis 2008; Steurer M-BMC Res Notes 2008*).

Nel nostro studio abbiamo notato un aumento sincrono di tutti i marcatori delle EPC nei pazienti con vasospasmo al secondo punto di rilevazione, cioè al giorno 4 dopo l'ESA ed un progressivo calo a partire dal terzo punto di rilevazione (giorno 7) nei pazienti senza vasospasmo rispetto a quelli che lo hanno sviluppato.

Nonostante tutte le cautele nell'interpretazione di questi dati- considerando la metodica e l'esiguità del campione, per cui servirebbero ulteriori conferme, si potrebbe ipotizzare che nei pazienti senza vasospasmo ci sia un migliore reclutamento di queste cellule in seguito all'ESA rispetto ai pazienti che lo hanno sviluppato, nei quali i livelli sembrerebbero rimanere bassi e costanti nel tempo.

Uno studio recente ha considerato la mobilitazione con statine delle EPC per facilitare la riepitelizzazione nei pazienti ai quali veniva messo uno stent. In questo studio si è osservato un aumento di 3.5 volte delle EPC circolanti in seguito alla somministrazione delle statine ad alto dosaggio (Atorvastatina 80mg) entro i primi tre giorni della somministrazione (*Hibbert B- PLoS One 2011*). Questo timing potrebbe essere sfruttabile nei pazienti con ESA per la mobilitazione delle EPC a scopo protettivo. Considerando inoltre gli altri effetti pleiotropi esercitati dalle statine in termini di neuroprotezione, la scarsa incidenza di effetti collaterali associati e il loro utilizzo molto iniziale in alcuni trial sul vasospasmo, la conferma dei risultati sopra menzionati sarebbe a favore del loro utilizzo. Dalla letteratura esistente iniziali evidenze sull'efficacia delle statine sembrano soprattutto provenire da studi con statine ad alto dosaggio (*Sillberg VA-Stroke 2009*).

Sarebbe inoltre anche importante proseguire queste analisi nei pazienti con ESA in terapia con statine e no e vedere se esiste una correlazione tra EPC, statine e vasospasmo o outcome. Uno studio simile permetterebbe inoltre di avere qualche evidenza aggiuntiva per comprendere se l'eventuale maggiore reclutamento di EPC

nei pazienti senza vasospasmo sia solo un marcatore prognostico o davvero anche l'indicatore di un migliore sistema di riparazione endoteliale.

Sicuramente tra i farmaci che possano mobilizzare le EPC le statine sono tra i più attraenti, poiché l'utilizzo di citochine note per avere effetti paragonabili sulla loro mobilizzazione, come il G-CSF e il VEGF (*Takahashi T-Nat Med 1999; Asahara T-EMBO J 1999*), sono anche proinfiammatorie e potrebbero associarsi a maggiori effetti collaterali (*Valable S-JCBFM 2005; Keller M- Pediatr Res 2006*).

Per quanto riguarda invece il modello di ischemia in vitro, abbiamo notato, in esperimenti che comunque necessitano di ulteriori conferme, una maggiore efficacia da parte delle MSC rispetto alle cellule endoteliali. Le MSC hanno mostrato un'efficacia nella modulazione del danno neuronale in diverse malattie neurologiche ed il loro effetto è dovuto al rilascio di sostanze anti-apoptotiche, anti-infiammatorie ed a molecole trofiche come nell'icuts e nel reclutamento di progenitori locali oltre che alla loro induzione a differenziarsi in cellule neuronali piuttosto che all'indirizzamento in senso oligodendrogliale (*Uccelli A-Nat Rev Immunol 2008; Li Y-Neurology 2002; Munoz J-PNAS 2005; Rivera F-Stem Cell 2006*). Per questi esperimenti sono state utilizzate cellule umane garantite come EPC dal produttore, provenienti da sangue di cordone ombelicale. E' da notare che tra gli antigeni utilizzati per caratterizzarle, mancano il CD34 ed il CD133, tipici marcatori di staminalità, inoltre la funzione di formare tubuli nel matrigel è anche svolta dall'endotelio maturo. Per questo motivo andranno ri-testate per queste proprietà ed eventualmente potrebbe essere interessante ripetere le prove con altri tipi di EPC. Un ulteriore punto di interesse riguarda lo studio differenziale delle citochine e/o fattori di crescita prodotti da MSC ed EPC e dalla cellule neuronali trattate con esse (per esempio VEGF, bFGF, BDNF, NGF).

Purtuttavia anche le MSC possono essere mobilizzate nel torrente ematico sia per esempio seguito a danno tissutale, come l'ischemia ed in particolare sono attratte da citochine come il VEGF ed il PDGF (*Wang J-Heart 2006; Ball SG- J Cell Mol Med 2007*). E' quindi possibile che queste cellule, note per potenziare anche le staminali residenti, possano svolgere un ruolo in sinergia alle EPC nel modulare lo sviluppo vasospasmo ed il danno ischemico tardivo. Una prospettiva sarebbe quindi quella di testare anche in vitro se possa esserci un effetto sinergico della doppia terapia staminale-mediata, cioè nel nostro caso mediata da EPC e MSC insieme.

VII. Conclusioni e Sviluppi Futuri

Il presente lavoro rappresenta l'inizio di un progetto più esteso ed i dati prodotti richiedono conferme su ulteriori prove. Tuttavia questi risultati sembrano dimostrare che le metodiche selezionate possano essere adatte agli obiettivi desiderati.

Inoltre è stato anche recentemente approvato un protocollo di ricerca per l'analisi in vivo dell'efficacia delle cellule staminali mesenchimali e progenitrici endoteliali in un modello di vasospasmo nel ratto - nel quale saranno considerati sia il vasospasmo sia il danno ischemico tardivo.

Sarà inoltre fondamentale fare luce sul timing della mobilizzazione farmacologica delle cellule progenitrici endoteliali (EPC), studiando nel tempo previo consenso i pazienti che iniziano terapie come le statine e l'eritropoietina. Dall'altro lato sarebbe utile poter disporre di una più numerosa coorte di dati e campioni di pazienti con l'ESA e valutare la differente espressione delle EPC nei giorni seguenti nei pazienti con o senza terapia con statine ponendo i risultati anche in relazione al vasospasmo ed al danno ischemico tardivo.

Infine sarà di grande interesse, nel caso che la nostra ipotesi venisse confermata - cioè che le EPC svolgano un ruolo protettivo sul vasospasmo e sull'ischemia cerebrale tardiva, delucidarne i meccanismi - sia in vitro, sia in vivo, sia eventualmente mediante l'analisi proteica su campioni di plasma e di liquor prelevati in parallelo ai campioni ematici per il dosaggio delle EPC.

Un altro fronte che meriterebbe approfondimenti potrebbe riguardare degli esperimenti in vitro analoghi a quelli da noi eseguiti con i neuroni corticali, utilizzando invece di essi cellule endoteliali. Il modello potrebbe includere sia lo stimolo ipossico-ischemico, sia eventualmente l'esposizione ad ossiemoglobina.

Inoltre potrebbe essere interessante analizzare in vitro l'effetto di queste cellule sullo spasmo del muscolo liscio - anche se i modelli sembrano abbastanza complessi.

Nel presente lavoro ci siamo concentrati sempre nella parte in vitro sul neurone perché questo rappresenta il fine ultimo di tutte le terapie volte a 'salvare' l'encefalo del paziente con ESA.

Tuttavia è noto che la glia svolge un ruolo fondamentale nel modulare i meccanismi infiammatori e riparativi per cui, piuttosto che studiare questo complesso sistema in

vitro, potrebbe essere più interessante studiarlo addirittura nel modello in vivo di vasospasmo, quindi in un modello più realistico, nel quale può entrare in gioco anche il sistema immunitario.

VIII. Bibliografia

1. Aaslid R, Huber P, Nornes H. A transcranial Doppler method in the evaluation of cerebrovascular spasm. **Neuroradiology**. 1986;28(1):11-6.
2. Aaslid R, Huber P, Nornes H. Evaluation of cerebrovascular spasm with transcranial Doppler ultrasound. **J Neurosurg**. 1984 Jan;60(1):37-41.
3. Abdelkarim GE, Gertz K, Harms C, Katchanov J, Dirnagl U, Szabó C, Endres M. Protective effects of PJ34, a novel, potent inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in in vitro and in vivo models of stroke. **Int J Mol Med**. 2001 Mar;7(3):255-60.
4. Aicher A, Heeschen C. Nonbone marrow-derived endothelial progenitor cells: what is their exact location? **Circ Res**. 2007 Oct 26;101(9):e102.
5. Al-Tamimi YZ, Orsi NM, Quinn AC, Homer-Vanniasinkam S, Ross SA. A review of delayed ischemic neurologic deficit following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: historical overview, current treatment, and pathophysiology. **World Neurosurg**. 2010 Jun;73(6):654-67. Review.
6. Alaraj A, Charbel FT, Amin-Hanjani S. Peri-operative measures for treatment and prevention of cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage. **Neurol Res**. 2009 Jul;31(6):651-9.
7. Allen GS, Ahn HS, Preziosi TJ, Battye R, Boone SC, Boone SC, Chou SN, Kelly DL, Weir BK, Crabbe RA, Lavik PJ, Rosenbloom SB, Dorsey FC, Ingram CR, Mellits DE, Bertsch LA, Boisvert DP, Hundley MB, Johnson RK, Strom JA, Transou CR. Cerebral arterial spasm--a controlled trial of nimodipine in patients with subarachnoid hemorrhage. **N Engl J Med**. 1983 Mar 17;308(11):619-24.
8. Alonso D, Encinas JM, Uttenthal LO, Boscá L, Serrano J, Fernández AP, Castro-Blanco S, Santacana M, Bentura ML, Richart A, Fernández-Vizarra P, Rodrigo J. Coexistence of translocated cytochrome c and nitrated protein in neurons of the rat cerebral cortex after oxygen and glucose deprivation. **Neuroscience**. 2002;111(1):47-56.
9. Andaluz N, Zuccarello M. Fenestration of the lamina terminalis as a valuable adjunct in aneurysm surgery. **Neurosurgery**. 2004 Nov;55(5):1050-9.

10. Arakawa Y, Kikuta K, Hojo M, Goto Y, Ishii A, Yamagata S. Milrinone for the treatment of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage: report of seven cases. **Neurosurgery**. **2001** Apr;48(4):723-8; discussion 728-30.
11. Arakawa Y, Kikuta K, Hojo M, Goto Y, Yamagata S, Nozaki K, Hashimoto N. Milrinone reduces cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage of WFNS grade IV or V. **Neurol Med Chir (Tokyo)**. **2004** Aug;44(8):393-400; discussion 401.
12. Arcasoy MO. The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin. **Br J Haematol**. **2008** Apr;141(1):14-31. Review.
13. Arthur PG, Lim SC, Meloni BP, Munns SE, Chan A, Knuckey NW. The protective effect of hypoxic preconditioning on cortical neuronal cultures is associated with increases in the activity of several antioxidant enzymes. **Brain Res**. **2004** Aug 13;1017(1-2):146-54.
14. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. **Science**. **1997** Feb 14;275(5302):964-7.
15. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. **EMBO J**. **1999** Jul 15;18(14):3964-72.
16. Asplund K. Haemodilution for acute ischaemic stroke. **Cochrane Database of Systematic Reviews** **2002**, Issue 4. Art. No.: CD000103. DOI: 10.1002/14651858.CD000103.
17. Azari MF, Mathias L, Ozturk E, Cram DS, Boyd RL, Petratos S. Mesenchymal stem cells for treatment of CNS injury. **Curr Neuropharmacol**. **2010** Dec;8(4):316-23.
18. Bacigaluppi M, Pluchino S, Peruzzotti-Jametti L, Kilic E, Kilic U, Salani G, Brambilla E, West MJ, Comi G, Martino G, Hermann DM. Delayed post-ischaemic neuroprotection following systemic neural stem cell transplantation involves multiple mechanisms. **Brain**. **2009** Aug;132(Pt 8):2239-51. Epub 2009 Jul 16.
19. Bacigaluppi S, Dehdashti AR, Agid R, Krings T, Tymianski M, Mikulis DJ. The contribution of imaging in diagnosis, preoperative assessment, and follow-up of moyamoya disease: a review. **Neurosurg Focus**. **2009** Apr;26(4):E3. Review. Erratum in: *Neurosurg Focus*. 2009 Apr;26(4):E3a.

20. Bacigaluppi S, Fontanella M, Manninen P, Ducati A, Tredici G, Gentili F. Monitoring techniques for prevention of procedure related ischemic damage in aneurysm surgery. **World Neurosurgery** *accettato per pubblicazione il 23 Novembre 2011*
21. Badjatia N, Topcuoglu MA, Pryor JC, Rabinov JD, Ogilvy CS, Carter BS, Rordorf GA. Preliminary experience with intra-arterial nicardipine as a treatment for cerebral vasospasm. **AJNR Am J Neuroradiol.** 2004 May;25(5):819-26.
22. Ball SG, Shuttleworth CA, Kielty CM. Mesenchymal stem cells and neovascularization: role of platelet-derived growth factor receptors. **J Cell Mol Med.** 2007 Sep-Oct;11(5):1012-30.
23. Barth M, Pena P, Seiz M, Thomé C, Muench E, Weidauer S, Hattingen E, Kasuya H, Schmiedek P. Feasibility of intraventricular nicardipine prolonged release implants in patients following aneurysmal subarachnoid haemorrhage. **Br J Neurosurg.** 2011 Feb 23. [Epub ahead of print]
24. Bederson JB, Levy AL, Ding WH, Kahn R, DiPerna CA, Jenkins AL 3rd, Vallabhajosyula P. Acute vasoconstriction after subarachnoid hemorrhage. **Neurosurgery.** 1998 Feb;42(2):352-60; discussion 360-2.
25. Bejjani GK, Bank WO, Olan WJ, Sekhar LN. The efficacy and safety of angioplasty for cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. **Neurosurgery.** 1998 May;42(5):979-86; discussion 986-7. Review.
26. Biondi A, Ricciardi GK, Puybasset L, Abdenmour L, Longo M, Chiras J, Van Effenterre R. Intra-arterial nimodipine for the treatment of symptomatic cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: preliminary results. **AJNR Am J Neuroradiol.** 2004 Jun-Jul;25(6):1067-76.
27. Birk S, Edvinsson L, Olesen J, Kruuse C. Analysis of the effects of phosphodiesterase type 3 and 4 inhibitors in cerebral arteries. **Eur J Pharmacol.** 2004 Apr 5;489(1-2):93-100.
28. Blum B, Benvenisty N. The tumorigenicity of diploid and aneuploid human pluripotent stem cells. **Cell Cycle.** 2009 Dec;8(23):3822-30.
29. Bogoslovsky T, Chaudhry A, Latour L, Maric D, Luby M, Spatz M, Frank J, Warach S. Endothelial progenitor cells correlate with lesion volume and growth in acute stroke. **Neurology.** 2010 Dec 7;75(23):2059-62.

30. Bohlius J, Wilson J, Seidenfeld J, Piper M, Schwarzer G, Sandercock J, Trelle S, Weingart O, Bayliss S, Brunskill S, Djulbegovic B, Benett CL, Langensiepen S, Hyde C, Engert E. Erythropoietin or darbepoetin for patients with cancer. **Cochrane Database Syst Rev.** 2006 Jul 19;3:CD003407.
31. Borel CO, McKee A, Parra A, Haglund MM, Solan A, Prabhakar V, Sheng H, Warner DS, Niklason L. Possible role for vascular cell proliferation in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. **Stroke.** 2003 Feb;34(2):427-33.
32. Brilstra EH, Algra A, Rinkel GJ, Tulleken CA, van Gijn J. Effectiveness of neurosurgical clip application in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **J Neurosurg.** 2002 Nov;97(5):1036-41.
33. Brilstra EH, Rinkel GJ, Algra A, van Gijn J. Rebleeding, secondary ischemia, and timing of operation in patients with subarachnoid hemorrhage. **Neurology.** 2000 Dec 12;55(11):1656-60.
34. Brisman JL, Song JK, Newell DW. Cerebral aneurysms. **N Engl J Med.** 2006 Aug 31;355(9):928-39.
35. Brown RD. Unruptured intracranial aneurysms. **Semin Neurol.** 2010 Nov;30(5):537-44.
36. Bunc G, Kovacic S, Strnad S. Evaluation of functional response of cerebral arteries by a new morphometric technique. **Auton Neurosci.** 2001 Oct 8;93(1-2):41-7.
37. Burroughs SL, Duncan RS, Rayudu P, Kandula P, Payne AJ, Clark JL, Koulen P, Kaja S. Plate reader-based assays for measuring cell viability, neuroprotection and calcium in primary neuronal cultures. **J Neurosci Methods.** 2012 Jan 15;203(1):141-5. Epub 2011 Sep 24.
38. Cahill J, Calvert JW, Solaroglu I, Zhang JH. Vasospasm and p53-induced apoptosis in an experimental model of subarachnoid hemorrhage. **Stroke.** 2006 Jul;37(7):1868-74.
39. Cahill J, Calvert JW, Zhang JH. Mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. **J Cereb Blood Flow Metab.** 2006 Nov;26(11):1341-53.
40. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **J Cell Biochem.** 2006 Aug 1;98(5):1076-84.
41. Cedzich C, Roth A. Neurological and psychosocial outcome after subarachnoid haemorrhage, and the hunt and hess scale as a predictor of clinical outcome. **Zentralbl Neurochir.** 2005 Aug;66(3):112-8. PMID: 16116553

42. Cesari F, Nencini P, Nesi M, Caporale R, Giusti B, Abbate R, Gori AM, Inzitari D. Bone marrow-derived progenitor cells in the early phase of ischemic stroke: relation with stroke severity and discharge outcome. **J Cereb Blood Flow Metab.** 2009 Dec;29(12):1983-90. Epub 2009 Sep 2.
43. Chaichana KL, Pradilla G, Huang J, Tamargo RJ. Role of inflammation (leukocyte-endothelial cell interactions) in vasospasm after subarachnoid hemorrhage. **World Neurosurg.** 2010 Jan;73(1):22-41.
44. Charbel FT, Du X, Hoffman WE, Ausman JI. Brain tissue PO₂, PCO₂, and pH during cerebral vasospasm. **Surg Neurol.** 2000 Dec;54(6):432-7; discussion 43
45. Charbord P. Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. **Hum Gene Ther.** 2010 Sep;21(9):1045-56.
46. Chen J, Li Y, Katakowski M, Chen X, Wang L, Lu D, Lu M, Gautam SC, Chopp M. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. **J Neurosci Res.** 2003 Sep 15;73(6):778-86.
47. Chen J, Magavi SS, Macklis JD. Neurogenesis of corticospinal motor neurons extending spinal projections in adult mice. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2004 Nov 16;101(46):16357-62. Epub 2004 Nov 8.
48. Chen J, Zhang ZG, Li Y, Wang L, Xu YX, Gautam SC, Lu M, Zhu Z, Chopp M. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. **Circ Res.** 2003 Apr 4;92(6):692-9.
49. Cheng J, Baumhueter S, Cacalano G, Carver-Moore K, Thibodeaux H, Thomas R, Broxmeyer HE, Cooper S, Hague N, Moore M, Lasky LA. Hematopoietic defects in mice lacking the sialomucin CD34. **Blood.** 1996 Jan 15;87(2):479-90.
50. Chironi G, Walch L, Pernollet MG, Gariépy J, Levenson J, Rendu F, Simon A. Decreased number of circulating CD34+KDR+ cells in asymptomatic subjects with preclinical atherosclerosis. **Atherosclerosis.** 2007 Mar;191(1):115-20. Epub 2006 Apr 18.
51. Chopp M, Li Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. **Lancet Neurol.** 2002 Jun;1(2):92-100.

52. Chow M, Dumont AS, Kassell NF. Endothelin receptor antagonists and cerebral vasospasm: an update. **Neurosurgery**. 2002 Dec;51(6):1333-41; discussion 1342. Review.
53. Clark JF, Sharp FR. Bilirubin oxidation products (BOXes) and their role in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. **J Cereb Blood Flow Metab**. 2006 Oct;26(10):1223-33
54. Clarke M. Systematic review of reviews of risk factors for intracranial aneurysms. **Neuroradiology**. 2008 Aug;50(8):653-64. Epub 2008 Jun 17.
55. Conti L, Cattaneo E. Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities? **Nat Rev Neurosci**. 2010 Mar;11(3):176-87. Epub 2010 Jan 28.
56. Cook DA. Mechanisms of cerebral vasospasm in subarachnoid haemorrhage. **Pharmacol Ther**. 1995 May;66(2):259-84. Review.
57. Crowley RW, Medel R, Kassell NF, Dumont AS. New insights into the causes and therapy of cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage. **Drug Discov Today**. 2008 Mar;13(5-6):254-60. Epub 2008 Jan 22.
58. Dankbaar JW, Rijdsdijk M, van der Schaaf IC, Velthuis BK, Wermer MJ, Rinkel GJ. Relationship between vasospasm, cerebral perfusion, and delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **Neuroradiology**. 2009 Dec;51(12):813-9. Epub 2009 Jul 22. PMID: 19623472
59. Davies SJ, Fitch MT, Memberg SP, Hall AK, Raisman G, Silver J. Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system. **Nature**. 1997 Dec 18-25;390(6661):680-3.
60. de Rooij NK, Linn FH, van der Plas JA, Algra A, Rinkel GJ. Incidence of subarachnoid haemorrhage: a systematic review with emphasis on region, age, gender and time trends. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**. 2007 Dec;78(12):1365-72. Epub 2007 Apr 30. Review. PMID: 17470467
61. de Rooij NK, Linn FH, van der Plas JA, Algra A, Rinkel GJ. Incidence of subarachnoid haemorrhage: a systematic review with emphasis on region, age, gender and time trends. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**. 2007 Dec;78(12):1365-72. Epub 2007 Apr 30.
62. Dehdashti AR, Le Roux A, Bacigaluppi S, Wallace MC. Long-term visual outcome and aneurysm obliteration rate for very large and giant ophthalmic segment aneurysms:

assessment of surgical treatment. **Acta Neurochir (Wien)**. 2011 Sep 25. [Epub ahead of print]

63. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, Rütten H, Fichtlscherer S, Martin H, Zeiher AM. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. **J Clin Invest**. 2001 Aug;108(3):391-7.
64. Dome B, Timar J, Dobos J, Meszaros L, Raso E, Paku S, Kenessey I, Ostoros G, Magyar M, Ladanyi A, Bogos K, Tovari J. Identification and clinical significance of circulating endothelial progenitor cells in human non-small cell lung cancer. **Cancer Res**. 2006 Jul 15;66(14):7341-7.
65. Donnan GA. The 2007 Feinberg lecture: a new road map for neuroprotection. **Stroke**. 2008 Jan;39(1):242. Epub 2007 Nov 29.
66. Donzelli E, Salvadè A, Mimo P, Viganò M, Morrone M, Papagna R, Carini F, Zaopo A, Miloso M, Baldoni M, Tredici G. Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold: In vitro osteogenic differentiation. **Arch Oral Biol**. 2007 Jan;52(1):64-73. Epub 2006 Oct 16.
67. Duda DG, Cohen KS, Scadden DT, Jain RK. A protocol for phenotypic detection and enumeration of circulating endothelial cells and circulating progenitor cells in human blood. **Nat Protoc**. 2007;2(4):805-10.
68. Dulic-Sills A, Blunden MJ, Mawdsley J, Bastin AJ, McAuley D, Griffiths M, Rampton DS, Yaqoob MM, Macey MG, Agrawal SG. New flow cytometric technique for the evaluation of circulating endothelial progenitor cell levels in various disease groups. **J Immunol Methods**. 2006 Oct 20;316(1-2):107-15. Epub 2006 Sep 20.
69. Dumont AS, Dumont RJ, Chow MM, Lin CL, Calisaneller T, Ley KF, Kassell NF, Lee KS. Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage: putative role of inflammation. **Neurosurgery**. 2003 Jul;53(1):123-33; discussion 133-5.
70. Edvinsson L, Juul R, Jansen I. Perivascular neuropeptides (NPY, VIP, CGRP and SP) in human brain vessels after subarachnoid haemorrhage. **Acta Neurol Scand**. 1994 Nov;90(5):324-30.
71. Egge A, Waterloo K, Sjøholm H, Ingebrigtsen T, Forsdahl S, Jacobsen EA, Romner B. **Acta Neurol Scand**. 2005 Aug;112(2):76-80. Outcome 1 year after aneurysmal

subarachnoid hemorrhage: relation between cognitive performance and neuroimaging.
PMID: 16008531

72. Egge A, Waterloo K, Sjøholm H, Solberg T, Ingebrigtsen T, Romner B. Prophylactic hyperdynamic postoperative fluid therapy after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a clinical, prospective, randomized, controlled study. **Neurosurgery**. 2001 Sep;49(3):593-605; discussion 605-6.
73. Ergün S, Gehling UM. Non-bone-marrow-derived endothelial progenitor cells: what is their exact location? **Circ Res**. 2007 Aug 3;101(3):e31.
74. Eskridge JM, McAuliffe W, Song JK, Deliganis AV, Newell DW, Lewis DH, Mayberg MR, Winn HR. Balloon angioplasty for the treatment of vasospasm: results of first 50 cases. **Neurosurgery**. 1998 Mar;42(3):510-6; discussion 516-7.
75. Etminan N, Vergouwen MD, Ilodigwe D, Macdonald RL. Effect of pharmaceutical treatment on vasospasm, delayed cerebral ischemia, and clinical outcome in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review and meta-analysis. **J Cereb Blood Flow Metab**. 2011 Jun;31(6):1443-51. Epub 2011 Feb 2.
76. Fadini GP, Baesso I, Albiero M, Sartore S, Agostini C, Avogaro A. Technical notes on endothelial progenitor cells: ways to escape from the knowledge plateau. **Atherosclerosis**. 2008 Apr;197(2):496-503. Epub 2008 Feb 4. Review.
77. Fassbender K, Hodapp B, Rossol S, Bertsch T, Schmeck J, Schütt S, Fritzinger M, Horn P, Vajkoczy P, Wendel-Wellner M, Ragoschke A, Kuehl S, Brunner J, Schürer L, Schmiedeck P, Hennerici M. Endothelin-1 in subarachnoid hemorrhage: An acute-phase reactant produced by cerebrospinal fluid leukocytes. **Stroke**. 2000 Dec;31(12):2971-5.
78. Feigin VL, Lawes CM, Bennett DA, Anderson CS. Stroke epidemiology: a review of population-based studies of incidence, prevalence, and case-fatality in the late 20th century. **Lancet Neurol**. 2003 Jan;2(1):43-53. Review. PMID: 12849300
79. Feigin VL, Rinkel GJ, Algra A, Vermeulen M, van Gijn J. Calcium antagonists for aneurysmal subarachnoid haemorrhage. **Cochrane Database Syst Rev**. 2000;(2):CD000277. Review. **Update in:** Cochrane Database Syst Rev. 2002;(4):CD000277.
80. Feinberg AP. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. **Nature**. 2007 May 24;447(7143):433-40.

81. Ferro JM, Canhão P, Peralta R. Update on subarachnoid haemorrhage. **J Neurol.** **2008** Apr;255(4):465-79. Epub 2008 Mar 25.
82. Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA, Greaves MF. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. **Blood.** **1990** Jun 15;75(12):2417-26.
83. Findlay JM, Weir BK, Kanamaru K, Espinosa F. Arterial wall changes in cerebral vasospasm. **Neurosurgery.** **1989** Nov;25(5):736-45; discussion 745-6.
84. Fisher CM, Kistler JP, Davis JM. Relation of cerebral vasospasm to subarachnoid hemorrhage visualized by computerized tomographic scanning. **Neurosurgery.** **1980** Jan;6(1):1-9.
85. Fisher JW. Landmark advances in the development of erythropoietin. **Exp Biol Med (Maywood).** **2010** Dec;235(12):1398-411
86. Fraticelli AT, Cholley BP, Losser MR, Saint Maurice JP, Payen D. Milrinone for the treatment of cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **Stroke.** **2008** Mar;39(3):893-8. Epub 2008 Jan 31.
87. Frazier JL, Pradilla G, Wang PP, Tamargo RJ. Inhibition of cerebral vasospasm by intracranial delivery of ibuprofen from a controlled-release polymer in a rabbit model of subarachnoid hemorrhage. **J Neurosurg.** **2004** Jul;101(1):93-8.
88. Frijns CJ, Rinkel GJ, Castigliego D, Van Gijn J, Sixma JJ, Fijnheer R. Endothelial cell activation after subarachnoid hemorrhage. **Neurosurgery.** **2002** Jun;50(6):1223-9; discussion 1229-30.
89. Frontera JA, Claassen J, Schmidt JM, Wartenberg KE, Temes R, Connolly ES Jr, MacDonald RL, Mayer SA. Prediction of symptomatic vasospasm after subarachnoid hemorrhage: the modified fisher scale. **Neurosurgery.** **2006** Jul;59(1):21-7; discussion 21-7.
90. Gage FH. Mammalian neural stem cells. **Science.** **2000** Feb 25;287(5457):1433-8. Review.
91. Gehling UM, Ergün S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schäfer B, Hossfeld DK, Fiedler W. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. **Blood.** **2000** May 15;95(10):3106-12.

92. Ghani U, Shuaib A, Salam A, Nasir A, Shuaib U, Jeerakathil T, Sher F, O'Rourke F, Nasser AM, Schwindt B, Todd K. Endothelial progenitor cells during cerebrovascular disease. **Stroke**. 2005 Jan;36(1):151-3.
93. Goldberg MP, Choi DW. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. **J Neurosci**. 1993 Aug;13(8):3510-24.
94. Gomis P, Graftieaux JP, Sercombe R, Hettler D, Scherpereel B, Rousseaux P. Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of high-dose methylprednisolone in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **J Neurosurg**. 2010 Mar;112(3):681-8.
95. Haley EC Jr, Kassell NF, Alves WM, Weir BK, Hansen CA. Phase II trial of tirilazad in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. A report of the Cooperative Aneurysm Study. **J Neurosurg**. 1995 May;82(5):786-90.
96. Haley EC Jr, Kassell NF, Apperson-Hansen C, Maile MH, Alves WM. A randomized, double-blind, vehicle-controlled trial of tirilazad mesylate in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a cooperative study in North America. **J Neurosurg**. 1997 Mar;86(3):467-74.
97. Hall AA, Leonardo CC, Collier LA, Rowe DD, Willing AE, Pennypacker KR. Delayed treatments for stroke influence neuronal death in rat organotypic slice cultures subjected to oxygen glucose deprivation. **Neuroscience**. 2009 Dec 1;164(2):470-7.
98. Hamada J, Kai Y, Morioka M, Yano S, Mizuno T, Hirano T, Kazekawa K, Ushio Y. Effect on cerebral vasospasm of coil embolization followed by microcatheter intrathecal urokinase infusion into the cisterna magna: a prospective randomized study. **Stroke**. 2003 Nov;34(11):2549-54. Epub 2003 Oct 16.
99. Hänggi D, Liersch J, Turowski B, Yong M, Steiger HJ. The effect of lumboventricular lavage and simultaneous low-frequency head-motion therapy after severe subarachnoid hemorrhage: results of a single center prospective Phase II trial. **J Neurosurg**. 2008 Jun;108(6):1192-9.
100. Hannoush EJ, Sifri ZC, Elhassan IO, Mohr AM, Alzate WD, Offin M, Livingston DH. Impact of enhanced mobilization of bone marrow derived cells to site of injury. **J Trauma**. 2011 Aug;71(2):283-9; discussion 289-91.

101. Hansen-Schwartz J, Vajkoczy P, Macdonald RL, Pluta RM, Zhang JH. Cerebral vasospasm: looking beyond vasoconstriction. **Trends Pharmacol Sci.** 2007 Jun;28(6):252-6. Epub 2007 Apr 26.
102. Harrigan MR, Ennis SR, Masada T, Keep RF. Intraventricular infusion of vascular endothelial growth factor promotes cerebral angiogenesis with minimal brain edema. **Neurosurgery.** 2002 Mar;50(3):589-98.
103. Hattingen E, Blasel S, Dettmann E, Vatter H, Pilatus U, Seifert V, Zanella FE, Weidauer S. Perfusion-weighted MRI to evaluate cerebral autoregulation in aneurysmal subarachnoid haemorrhage. **Neuroradiology.** 2008 Nov;50(11):929-38. Epub 2008 Jun 17.
104. Hattingen E, Blasel S, Dumesnil R, Vatter H, Zanella FE, Weidauer S. MR angiography in patients with subarachnoid hemorrhage: adequate to evaluate vasospasm-induced vascular narrowing? **Neurosurg Rev.** 2010 Oct;33(4):431-9.
105. Hau S, Reich DM, Scholz M, Naumann W, Emmrich F, Kamprad M, Boltze J. Evidence for neuroprotective properties of human umbilical cord blood cells after neuronal hypoxia in vitro. **BMC Neurosci.** 2008 Feb 29;9:30.
106. Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. **Blood.** 2003 Aug 15;102(4):1340-6. Epub 2003 Apr 17. Erratum in: *Blood.* 2004 Jun 15;103(12):4388.
107. Heran NS, Hentschel SJ, Toyota BD. Jugular bulb oximetry for prediction of vasospasm following subarachnoid hemorrhage. **Can J Neurol Sci.** 2004 Feb;31(1):80-6.
108. Hertel F, Walter C, Bettag M, Mörsdorf M. Perfusion-weighted magnetic resonance imaging in patients with vasospasm: a useful new tool in the management of patients with subarachnoid hemorrhage. **Neurosurgery.** 2005;56(1):28-35; discussion 35.
109. Hibbert B, Ma X, Pourdjabbar A, Simard T, Rayner K, Sun J, Chen YX, Filion L, O'Brien ER. Pre-procedural atorvastatin mobilizes endothelial progenitor cells: clues to the salutary effects of statins on healing of stented human arteries. **PLoS One.** 2011 Jan 25;6(1):e16413.
110. Hosoda K, Fujita S, Kawaguchi T, Shose Y, Hamano S, Iwakura M. Effect of clot removal and surgical manipulation on regional cerebral blood flow and delayed

- vasospasm in early aneurysm surgery for subarachnoid hemorrhage. **Surg Neurol.** **1999** Jan;51(1):81-8.
111. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: isolation and characterization. **Trends Cardiovasc Med.** **2003** Jul;13(5):201-6. Review.
112. <http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics7.asp>
113. Hunt WE, Hess RM. Surgical risk as related to time of intervention in the repair of intracranial aneurysms. **J Neurosurg.** **1968** Jan;28(1):14-20. No abstract available.
114. Hunting CB, Noort WA, Zwaginga JJ. Circulating endothelial (progenitor) cells reflect the state of the endothelium: vascular injury, repair and neovascularization. **Vox Sang.** **2005** Jan;88(1):1-9.
115. Jerndal M, Forsberg K, Sena ES, Macleod MR, O'Collins VE, Linden T, Nilsson M, Howells DW. A systematic review and meta-analysis of erythropoietin in experimental stroke. **J Cereb Blood Flow Metab.** **2010** May;30(5):961-8. Epub 2009 Dec 30.
116. Johnston P. Cellular assays in HTS. *Methods Mol Biol.* 2002;190:107-16. Review. Eglén RM, Gilchrist A, Reisine T. The use of immortalized cell lines in GPCR screening: the good, bad and ugly. **Comb Chem High Throughput Screen.** **2008** Aug;11(7):560-5. Review.
117. Johnston SC, Selvin S, Gress DR. The burden, trends, and demographics of mortality from subarachnoid hemorrhage. **Neurology.** **1998** May;50(5):1413-8. PMID: 9595997
118. Jones PA, May GR, McLuckie JA, Iwashita A, Sharkey J. Apoptosis is not an invariable component of in vitro models of cortical cerebral ischaemia. **Cell Res.** **2004** Jun;14(3):241-50.
119. Jung KH, Chu K, Lee ST, Park HK, Kim DH, Kim JH, Bahn JJ, Song EC, Kim M, Lee SK, Roh JK. Circulating endothelial progenitor cells as a pathogenetic marker of moyamoya disease. **J Cereb Blood Flow Metab.** **2008** Nov;28(11):1795-803.
120. Juvola S. Plasma endothelin concentrations after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **J Neurosurg.** **2000** Mar;92(3):390-400.
121. Kapinya KJ, Harms U, Harms C, Blei K, Katchanov J, Dirnagl U, Hörtnagl H. Role of NAD(P)H:quinone oxidoreductase in the progression of neuronal cell death in vitro and following cerebral ischaemia in vivo. **J Neurochem.** **2003** Mar;84(5):1028-39.

122. Karkkainen MJ, Petrova TV. Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Oncogene**. 2000 Nov 20;19(49):5598-605. Review.
123. Kassell NF, Torner JC, Haley EC Jr, Jane JA, Adams HP, Kongable GL. The International Cooperative Study on the Timing of Aneurysm Surgery. Part 1: Overall management results. **J Neurosurg**. 1990 Jul;73(1):18-36.
124. Kasuya H, Weir BK, White DM, Stefansson K. Mechanism of oxyhemoglobin-induced release of endothelin-1 from cultured vascular endothelial cells and smooth-muscle cells. **J Neurosurg**. 1993 Dec;79(6):892-8.
125. Kaushal V, Schlichter LC. Mechanisms of microglia-mediated neurotoxicity in a new model of the stroke penumbra. **J Neurosci**. 2008 Feb 27;28(9):2221-30.
126. Keller M, Simbruner G, Góna A, Urbanek M, Tinhofer I, Griesmaier E, Sarkozy G, Schwendimann L, Gressens P. Systemic application of granulocyte-colony stimulating factor and stem cell factor exacerbates excitotoxic brain injury in newborn mice. **Pediatr Res**. 2006 Apr;59(4 Pt 1):549-53.
127. Khaldoyanidi S. Directing stem cell homing. **Cell Stem Cell**. 2008 Mar 6;2(3):198-200.
128. Khan WA, Blobe GC, Hannun YA. Arachidonic acid and free fatty acids as second messengers and the role of protein kinase C. **Cell Signal**. 1995 Mar;7(3):171-84. Review.
129. Kikkawa Y, Matsuo S, Kameda K, Hirano M, Nakamizo A, Sasaki T, Hirano K. Mechanisms underlying potentiation of endothelin-1-induced myofilament Ca(2+) sensitization after subarachnoid hemorrhage. **J Cereb Blood Flow Metab**. 2011 Sep 28. doi: 10.1038/jcbfm.2011.132.
130. Kinouchi H, Ogasawara K, Shimizu H, Mizoi K, Yoshimoto T. Prevention of symptomatic vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage by intraoperative cisternal fibrinolysis using tissue-type plasminogen activator combined with continuous cisternal drainage. **Neurol Med Chir (Tokyo)**. 2004 Nov;44(11):569-75; discussion 576-7.
131. Klimo P Jr, Kestle JR, MacDonald JD, Schmidt RH. Marked reduction of cerebral vasospasm with lumbar drainage of cerebrospinal fluid after subarachnoid hemorrhage. **J Neurosurg**. 2004 Feb;100(2):215-24.

132. Koç ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, Lazarus HM. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. **J Clin Oncol.** 2000 Jan;18(2):307-16.
133. Koliass AG, Sen J, Belli A. Pathogenesis of cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: putative mechanisms and novel approaches. **J Neurosci Res.** 2009 Jan;87(1):1-11.
134. Kosnik EJ, Hunt WE. Postoperative hypertension in the management of patients with intracranial arterial aneurysms. **J Neurosurg.** 1976 Aug;45(2):148-54.
135. Krex D, Schackert HK, Schackert G. Genesis of cerebral aneurysms--an update. **Acta Neurochir (Wien).** 2001;143(5):429-48; discussion 448-9.
136. Krings T, Mandell DM, Kiehl TR, Geibprasert S, Tymianski M, Alvarez H, terBrugge KG, Hans FJ. Intracranial aneurysms: from vessel wall pathology to therapeutic approach. **Nat Rev Neurol.** 2011 Sep 20;7(10):547-59.
137. Kusuyama T, Omura T, Nishiya D, Enomoto S, Matsumoto R, Murata T, Takeuchi K, Yoshikawa J, Yoshiyama M. The effects of HMG-CoA reductase inhibitor on vascular progenitor cells. **J Pharmacol Sci.** 2006 Aug;101(4):344-9. Epub 2006 Aug 5.
138. Lanterna LA, Lunghi A, Martchenko S, Gritti P, Bonaldi G, Biroli F. Cerebral watershed hypoperfusion in subarachnoid hemorrhage: computed tomography perfusion analysis. **J Neurosurg.** 2011 Apr;114(4):961-8.
139. Lanzino G, Kassell NF, Dorsch NW, Pasqualin A, Brandt L, Schmiedek P, Truskowski LL, Alves WM. Double-blind, randomized, vehicle-controlled study of high-dose tirilazad mesylate in women with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Part I. A cooperative study in Europe, Australia, New Zealand, and South Africa. **J Neurosurg.** 1999 Jun;90(6):1011-7.
140. Lanzino G, Kassell NF. Double-blind, randomized, vehicle-controlled study of high-dose tirilazad mesylate in women with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Part II. A cooperative study in North America. **J Neurosurg.** 1999 Jun;90(6):1018-24.
141. Leng LZ, Fink ME, Iadecola C. Spreading depolarization: a possible new culprit in the delayed cerebral ischemia of subarachnoid hemorrhage. **Arch Neurol.** 2011 Jan;68(1):31-6. Epub 2010 Sep 13.

142. Leone AM, Rutella S, Bonanno G, Abbate A, Rebuzzi AG, Giovannini S, Lombardi M, Galiuto L, Liuzzo G, Andreotti F, Lanza GA, Contemi AM, Leone G, Crea F. Mobilization of bone marrow-derived stem cells after myocardial infarction and left ventricular function. **Eur Heart J.** **2005** Jun;26(12):1196-204. Epub 2005 Feb 25.
143. Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. **Annu Rev Cell Dev Biol.** **2005**;21:605-31. Review.
144. Li X, Tjwa M, Moons L, Fons P, Noel A, Ny A, Zhou JM, Lennartsson J, Li H, Luttun A, Pontén A, Devy L, Bouché A, Oh H, Manderveld A, Blacher S, Communi D, Savi P, Bono F, Dewerchin M, Foidart JM, Autiero M, Herbert JM, Collen D, Heldin CH, Eriksson U, Carmeliet P. Revascularization of ischemic tissues by PDGF-CC via effects on endothelial cells and their progenitors. **J Clin Invest.** **2005** Jan;115(1):118-27.
145. Li Y, Chen J, Chen XG, Wang L, Gautam SC, Xu YX, Katakowski M, Zhang LJ, Lu M, Janakiraman N, Chopp M. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. **Neurology.** **2002** Aug 27;59(4):514-23.
146. Li Y, Chen J, Wang L, Lu M, Chopp M. Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells. **Neurology.** **2001** Jun 26;56(12):1666-72.
147. Lindegaard KF, Nornes H, Bakke SJ, Sorteberg W, Nakstad P. Cerebral vasospasm diagnosis by means of angiography and blood velocity measurements. **Acta Neurochir (Wien).** **1989**;100(1-2):12-24.
148. Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, Uchida S, Masuda H, Kawamoto A, Walsh K, Isner JM, Asahara T. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow--derived endothelial progenitor cells. **J Clin Invest.** **2001** Aug;108(3):399-405.
149. Loch Macdonald R. Management of cerebral vasospasm. **Neurosurg Rev.** **2006** Jul;29(3):179-93. Epub 2006 Feb 24.
150. Lovelock CE, Rinkel GJ, Rothwell PM. Time trends in outcome of subarachnoid hemorrhage: Population-based study and systematic review. **Neurology.** **2010** May 11;74(19):1494-501. Epub 2010 Apr 7. Review. PMID: 20375310
151. Lynch JJ 3rd, Alexander KM, Jarvis MF, Kowaluk EA. Inhibition of adenosine kinase during oxygen-glucose deprivation in rat cortical neuronal cultures. **Neurosci Lett.** **1998** Aug 21;252(3):207-10.
152. Macdonald RL, Higashida RT, Keller E, Mayer SA, Molyneux A, Raabe A, Vajkoczy P, Wanke I, Bach D, Frey A, Marr A, Roux S, Kassell N. Clazosentan, an endothelin

- receptor antagonist, in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage undergoing surgical clipping: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial (CONSCIOUS-2). **Lancet Neurol.** **2011** Jul;10(7):618-25. Epub 2011 Jun 2.
153. Macdonald RL. Erythropoietin: will it improve outcome after subarachnoid hemorrhage? **World Neurosurg.** **2010** May;73(5):463-4.
154. Mack WJ, Ducruet AF, Hickman ZL, Garrett MC, Albert EJ, Kellner CP, Mocco J, Connolly ES Jr. Early plasma complement C3a levels correlate with functional outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **Neurosurgery.** **2007** Aug;61(2):255-60; discussion 260-1.
155. Madhavan L, Ourednik V, Ourednik J. Neural stem/progenitor cells initiate the formation of cellular networks that provide neuroprotection by growth factor-modulated antioxidant expression. **Stem Cells.** **2008** Jan;26(1):254-65. Epub 2007 Oct 25.
156. Martin E, Rosenthal RE, Fiskum G. Pyruvate dehydrogenase complex: metabolic link to ischemic brain injury and target of oxidative stress. **J Neurosci Res.** **2005** Jan 1-15;79(1-2):240-7.
157. Martin NA, Doberstein C, Zane C, Caron MJ, Thomas K, Becker DP. Posttraumatic cerebral arterial spasm: transcranial Doppler ultrasound, cerebral blood flow, and angiographic findings. **J Neurosurg.** **1992** Oct;77(4):575-83.
158. Martino G, Pluchino S, Bonfanti L, Schwartz M. Brain regeneration in physiology and pathology: the immune signature driving therapeutic plasticity of neural stem cells. **Physiol Rev.** **2011** Oct;91(4):1281-304.
159. Martino G, Pluchino S. The therapeutic potential of neural stem cells. **Nat Rev Neurosci.** **2006** May;7(5):395-406.
160. Master Z, McLeod M, Mendez I. Benefits, risks and ethical considerations in translation of stem cell research to clinical applications in Parkinson's disease. **J Med Ethics.** **2007** Mar;33(3):169-73.
161. McGirt MJ, Mavropoulos JC, McGirt LY, Alexander MJ, Friedman AH, Laskowitz DT, Lynch JR. Leukocytosis as an independent risk factor for cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **J Neurosurg.** **2003** Jun;98(6):1222-6.
162. McGuinness B, Gandhi D. Endovascular management of cerebral vasospasm. **Neurosurg Clin N Am.** **2010** Apr;21(2):281-90.

163. Mee E, Dorrance D, Lowe D, Neil-Dwyer G. Controlled study of nimodipine in aneurysm patients treated early after subarachnoid hemorrhage. **Neurosurgery**. **1988** Mar;22(3):484-91.
164. Meloni BP, Majda BT, Knuckey NW. Evaluation of preconditioning treatments to protect near-pure cortical neuronal cultures from in vitro ischemia induced acute and delayed neuronal death. **Brain Res**. **2002** Feb 22;928(1-2):69-75.
165. Meloni BP, Meade AJ, Kitikomolsuk D, Knuckey NW. Characterisation of neuronal cell death in acute and delayed in vitro ischemia (oxygen-glucose deprivation) models. **J Neurosci Methods**. **2011** Jan 30;195(1):67-74.
166. Michowitz Y, Goldstein E, Wexler D, Sheps D, Keren G, George J. Circulating endothelial progenitor cells and clinical outcome in patients with congestive heart failure. **Heart**. **2007** Sep;93(9):1046-50. Epub 2007 Feb 3.
167. Mies G, Paschen W. Regional changes of blood flow, glucose, and ATP content determined on brain sections during a single passage of spreading depression in rat brain cortex. **Exp Neurol**. **1984** May;84(2):249-58.
168. Mizukami M, Kawase T, Usami T, Tazawa T. Prevention of vasospasm by early operation with removal of subarachnoid blood. **Neurosurgery**. **1982** Mar;10(3):301-7.
169. Mori K, Yamamoto T, Nakao Y, Osada H, Hara Y, Oyama K, Esaki T. Initial clinical experience of vasodilatory effect of intra-cisternal infusion of magnesium sulfate for the treatment of cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **Neurol Med Chir (Tokyo)**. **2009** Apr;49(4):139-44; discussion 144-5.
170. Munch E, Vajkoczy P. Current advances in the diagnosis of vasospasm. **Neurol Res**. **2006** Oct;28(7):703-12.
171. Munoz JR, Stoutenger BR, Robinson AP, Spees JL, Prockop DJ. Human stem/progenitor cells from bone marrow promote neurogenesis of endogenous neural stem cells in the hippocampus of mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**. **2005** Dec 13;102(50):18171-6. Epub 2005 Dec 5.
172. Muroi C, Mink S, Seule M, Bellut D, Fandino J, Keller E. Monitoring of the inflammatory response after aneurysmal subarachnoid haemorrhage in the clinical setting: review of literature and report of preliminary clinical experience. **Acta Neurochir Suppl**. **2011**;110(Pt 1):191-6. Review.

173. Muroi C, Terzic A, Fortunati M, Yonekawa Y, Keller E. Magnesium sulfate in the management of patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a randomized, placebo-controlled, dose-adapted trial. **Surg Neurol.** **2008** Jan;69(1):33-9; discussion 39.
174. Nahed BV, Bydon M, Ozturk AK, Bilguvar K, Bayrakli F, Gunel M. Genetics of intracranial aneurysms. **Neurosurgery.** **2007** Feb;60(2):213-25; discussion 225-6.
175. Neil-Dwyer G, Cruickshank J. The blood leucocyte count and its prognostic significance in subarachnoid haemorrhage. **Brain.** **1974** Mar;97(1):79-86.
176. Nieuwkamp DJ, Setz LE, Algra A, Linn FH, de Rooij NK, Rinkel GJ. Changes in case fatality of aneurysmal subarachnoid haemorrhage over time, according to age, sex, and region: a meta-analysis. **Lancet Neurol.** **2009** Jul;8(7):635-42. Epub 2009 Jun 6.
177. Nishioka H, Torner JC, Graf CJ, Kassell NF, Sahs AL, Goettler LC. Cooperative study of intracranial aneurysms and subarachnoid hemorrhage: a long-term prognostic study. II. Ruptured intracranial aneurysms managed conservatively. **Arch Neurol.** **1984** Nov;41(11):1142-6. PMID: 6487096
178. Ohkuma H, Manabe H, Tanaka M, Suzuki S. Impact of cerebral microcirculatory changes on cerebral blood flow during cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **Stroke.** **2000** Jul;31(7):1621-7.
179. Ohkuma H, Tsurutani H, Suzuki S. Incidence and significance of early aneurysmal rebleeding before neurosurgical or neurological management. **Stroke.** **2001** May;32(5):1176-80.
180. Ohkuma H. Effect of clot removal and the different incidence of vasospasm between clipping and GDC. **Neurol Res.** **2006** Jun;28(4):424-30.
181. Ohlstein B, Kai T, Decotto E, Spradling A. The stem cell niche: theme and variations. **Curr Opin Cell Biol.** **2004** Dec;16(6):693-9.
182. Ohta H, Ito Z. [Cerebral infraction due to vasospasm, revealed by computed tomography (author's transl)]. **Neurol Med Chir (Tokyo).** **1981** Apr;21(4):365-72. Japanese. PMID: 6165907
183. Ostergaard JR. Risk factors in intracranial saccular aneurysms. Aspects on the formation and rupture of aneurysms, and development of cerebral vasospasm. **Acta Neurol Scand.** **1989** Aug;80(2):81-98. Review. PMID: 2683556

184. Ostrowski RP, Colohan AR, Zhang JH. Molecular mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. **Neurol Res.** 2006 Jun;28(4):399-414.
185. Passerini T, Sangalli L, Vantini S, Piccinelli M, Bacigaluppi S, Antiga L, Boccardi E, Secchi P, Veneziani A. An Integrated Statistical Investigation of the Internal Carotid Arteries hosting Cerebral Aneurysms. **Cardiovascular Engineering and Technology.** 2011 accettato per pubblicazione in il 22 Novembre 2011
186. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. **Blood.** 2000 Feb 1;95(3):952-8.
187. Pellegrini-Giampietro DE, Peruginelli F, Meli E, Cozzi A, Albani-Torregrossa S, Pellicciari R, Moroni F. Protection with metabotropic glutamate 1 receptor antagonists in models of ischemic neuronal death: time-course and mechanisms. **Neuropharmacology.** 1999 Oct;38(10):1607-19.
188. Pellettieri L, Carlson CA, Lindholm L. Is the vasospasm following subarachnoidal hemorrhage an immunoreactive disease? **Experientia.** 1981 Nov 15;37(11):1170-1.
189. Pellettieri L, Nilsson B, Carlsson CA, Nilsson U. Serum immunocomplexes in patients with subarachnoid hemorrhage. **Neurosurgery.** 1986 Nov;19(5):767-71.
190. Piccinelli M, Bacigaluppi S, Boccardi E, Ene-Iordache B, Remuzzi A, Veneziani A, Antiga L. Geometry of the internal carotid artery and recurrent patterns in location, orientation, and rupture status of lateral aneurysms: an image-based computational study. **Neurosurgery.** 2011 May;68(5):1270-85; discussion 1285.
191. Pickard JD, Murray GD, Illingworth R, Shaw MD, Teasdale GM, Foy PM, Humphrey PR, Lang DA, Nelson R, Richards P, et al. Effect of oral nimodipine on cerebral infarction and outcome after subarachnoid haemorrhage: British aneurysm nimodipine trial. **BMJ.** 1989 Mar 11;298(6674):636-42.
192. Pleasure SJ, Page C, Lee VM. Pure, postmitotic, polarized human neurons derived from NTera 2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons. **J Neurosci.** 1992 May;12(5):1802-15.
193. Pluta RM, Hansen-Schwartz J, Dreier J, Vajkoczy P, Macdonald RL, Nishizawa S, Kasuya H, Wellman G, Keller E, Zauner A, Dorsch N, Clark J, Ono S, Kiris T, Leroux

- P, Zhang JH. Cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage: time for a new world of thought. **Neurol Res.** **2009** Mar;31(2):151-8.
194. Pluta RM, Oldfield EH. Analysis of nitric oxide (NO) in cerebral vasospasm after aneurysmal bleeding. **Rev Recent Clin Trials.** **2007** Jan;2(1):59-67.
195. Pluta RM, Oldfield EH. Sodium nitrite as a therapeutic agent for central nervous system diseases. **Surg Neurol.** **2006** Jul;66(1):5-7; discussion 8-10.
196. Pluta RM. Delayed cerebral vasospasm and nitric oxide: review, new hypothesis, and proposed treatment. **Pharmacol Ther.** **2005** Jan;105(1):23-56. Review.
197. Pradilla G, Garzon-Muvdi T, Ruzevick JJ, Bender M, Edwards L, Momin EN, Thompson RC, Tamargo RJ. Systemic L-Citrulline Prevents Cerebral Vasospasm in Haptoglobin 2-2 Transgenic Mice After Subarachnoid Hemorrhage. **Neurosurgery.** **2011** Sep 12. E-pub ahead of print PMID: 21915076
198. Qureshi IA, Mehler MF. The emerging role of epigenetics in stroke: III. Neural stem cell biology and regenerative medicine. **Arch Neurol.** **2011** Mar;68(3):294-302.
199. Rabinovici GD, Lukatch HS, MacIver MB. Hypoglycemic and hypoxic modulation of cortical micro-EEG activity in rat brain slices. **Clin Neurophysiol.** **2000** Jan;111(1):112-21.
200. Rafat N, Beck GCh, Peña-Tapia PG, Schmiedek P, Vajkoczy P. Increased levels of circulating endothelial progenitor cells in patients with Moyamoya disease. **Stroke.** **2009** Feb;40(2):432-8. Epub 2008 Dec 18.
201. Ramakrishna R, Sekhar LN, Ramanathan D, Temkin N, Hallam D, Ghodke BV, Kim LJ. Intraventricular tissue plasminogen activator for the prevention of vasospasm and hydrocephalus after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **Neurosurgery.** **2010** Jul;67(1):110-7; discussion 117.
202. Recinos PF, Pradilla G, Thai QA, Perez M, Hdeib AM, Tamargo RJ. Controlled release of lipopolysaccharide in the subarachnoid space of rabbits induces chronic vasospasm in the absence of blood. **Surg Neurol.** **2006** Nov;66(5):463-9; discussion 469.
203. Reich DM, Hau S, Stahl T, Scholz M, Naumann W, Emmrich F, Boltze J, Kamprad M. Neuronal hypoxia in vitro: investigation of therapeutic principles of HUCB-MNC and CD133+ stem cells. **BMC Neurosci.** **2008** Sep 19;9:91.

204. Resch T, Pircher A, Kähler CM, Pratschke J, Hilbe W. Endothelial Progenitor Cells: Current Issues on Characterization and Challenging Clinical Applications. **Stem Cell Rev.** **2011** Nov 18
205. Ribatti D. The discovery of endothelial progenitor cells. An historical review. **Leuk Res.** **2007** Apr;31(4):439-44. Epub 2006 Nov 20.
206. Rivera FJ, Couillard-Despres S, Pedre X, Ploetz S, Caioni M, Lois C, Bogdahn U, Aigner L. Mesenchymal stem cells instruct oligodendrogenic fate decision on adult neural stem cells. **Stem Cells.** **2006** Oct;24(10):2209-19
207. Rivera FJ, Sierralta WD, Minguell JJ, Aigner L. Adult hippocampus derived soluble factors induce a neuronal-like phenotype in mesenchymal stem cells. **Neurosci Lett.** **2006** Oct 2;406(1-2):49-54.
208. Robert F, Cloix JF, Hevor T. Ultrastructural characterization of rat neurons in primary culture. **Neuroscience.** **2011** Oct 18.
209. Roeder I, Lorenz R. Asymmetry of stem cell fate and the potential impact of the niche: observations, simulations, and interpretations. **Stem Cell Rev.** **2006**;2(3):171-80.
210. Roman RJ, Renic M, Dunn KM, Takeuchi K, Haccin-Bey L. Evidence that 20-HETE contributes to the development of acute and delayed cerebral vasospasm. **Neurol Res.** **2006** Oct;28(7):738-49.
211. Roos YB, de Haan RJ, Beenen LF, Groen RJ, Albrecht KW, Vermeulen M. Complications and outcome in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage: a prospective hospital based cohort study in the Netherlands. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.** **2000** Mar;68(3):337-41.
212. Rothoerl RD, Axmann C, Pina AL, Woertgen C, Brawanski A. Possible role of the C-reactive protein and white blood cell count in the pathogenesis of cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **J Neurosurg Anesthesiol.** **2006** Jan;18(1):68-72.
213. Roufosse CA, Direkze NC, Otto WR, Wright NA. Circulating mesenchymal stem cells. **Int J Biochem Cell Biol.** **2004** Apr;36(4):585-97.
214. Rouhl RP, van Oostenbrugge RJ, Damoiseaux J, Tervaert JW, Lodder J. Endothelial progenitor cell research in stroke: a potential shift in pathophysiological and therapeutical concepts. **Stroke.** **2008** Jul;39(7):2158-65.

215. Rousseaux P, Scherpereel B, Bernard MH, Graftieaux JP, Guyot JF. Fever and cerebral vasospasm in ruptured intracranial aneurysms. **Surg Neurol.** 1980 Dec;14(6):459-65.
216. Ruigrok YM, Rinkel GJ. Genetics of intracranial aneurysms. *Stroke.* 2008 Mar;39(3):1049-55.
217. Sabri M, Ai J, Knight B, Tariq A, Jeon H, Shang X, Marsden PA, Loch Macdonald R. Uncoupling of endothelial nitric oxide synthase after experimental subarachnoid hemorrhage. **J Cereb Blood Flow Metab.** 2011 Jan;31(1):190-9. Epub 2010 Jun 2.
218. Sabri M, Macdonald RL. Statins: a potential therapeutic addition to treatment for aneurysmal subarachnoid hemorrhage? **World Neurosurg.** 2010 Jun;73(6):646-53. Review.
219. Sahlin C, Brismar J, Delgado T, Owman C, Salford LG, Svendgaard NA. Cerebrovascular and metabolic changes during the delayed vasospasm following experimental subarachnoid hemorrhage in baboons, and treatment with a calcium antagonist. **Brain Res.** 1987 Feb 17;403(2):313-32.
220. Santhanam AV, Smith LA, Akiyama M, Rosales AG, Bailey KR, Katusic ZS. Role of endothelial NO synthase phosphorylation in cerebrovascular protective effect of recombinant erythropoietin during subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm. **Stroke.** 2005 Dec;36(12):2731-7. Epub 2005 Nov 3.
221. Sarnowska A, Braun H, Sauerzweig S, Reymann KG. The neuroprotective effect of bone marrow stem cells is not dependent on direct cell contact with hypoxic injured tissue. **Exp Neurol.** 2009 Feb;215(2):317-27. Epub 2008 Nov 13.
222. Sayama CM, Liu JK, Couldwell WT. Update on endovascular therapies for cerebral vasospasm induced by aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **Neurosurg Focus.** 2006 Sep 15;21(3):E12.
223. Schauer E, Wronski R, Patockova J, Moessler H, Doppler E, Hutter-Paier B, Windisch M. Neuroprotection of cerebrolysin in tissue culture models of brain ischemia: post lesion application indicates a wide therapeutic window. **J Neural Transm.** 2006 Jul;113(7):855-68.
224. Schievink WI. Intracranial aneurysms. **N Engl J Med.** 1997 Jan 2;336(1):28-40.
225. Schmidt-Lucke C, Rössig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kämper U, Dimmeler S, Zeiher AM. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells

- predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. **Circulation**. 2005 Jun 7;111(22):2981-7. Epub 2005 May 31.
226. Schneider UC, Dreher S, Hoffmann KT, Schmiedek P, Kasuya H, Vajkoczy P. The use of nicardipine prolonged release implants (NPRI) in microsurgical clipping after aneurysmal subarachnoid haemorrhage: comparison with endovascular treatment. **Acta Neurochir (Wien)**. 2011 Nov;153(11):2119-25. Epub 2011 Aug 21.
227. Schubert GA, Thome C. Cerebral blood flow changes in acute subarachnoid hemorrhage. **Front Biosci**. 2008 Jan 1;13:1594-603.
228. Schuh A, Liehn EA, Sasse A, Hristov M, Sobota R, Kelm M, Merx MW, Weber C. Transplantation of endothelial progenitor cells improves neovascularization and left ventricular function after myocardial infarction in a rat model. **Basic Res Cardiol**. 2008 Jan;103(1):69-77. Epub 2007 Nov 12.
229. Schwarz SC, Schwarz J. Translation of stem cell therapy for neurological diseases. **Transl Res**. 2010 Sep;156(3):155-60. Epub 2010 Jul 23.
230. Scorziello A, Florio T, Bajetto A, Thellung S, Schettini G. TGF-beta1 prevents gp120-induced impairment of Ca²⁺ homeostasis and rescues cortical neurons from apoptotic death. **J Neurosci Res**. 1997 Sep 1;49(5):600-7.
231. Scorziello A, Pellegrini C, Forte L, Tortiglione A, Gioielli A, Iossa S, Amoroso S, Tufano R, Di Renzo G, Annunziato L. Differential vulnerability of cortical and cerebellar neurons in primary culture to oxygen glucose deprivation followed by reoxygenation. **J Neurosci Res**. 2001 Jan 1;63(1):20-6.
232. Scott RB, Eccles F, Lloyd A, Carpenter K. From multidimensional neuropsychological outcomes to a cognitive complication rate: the International Subarachnoid Aneurysm Trial. **Trials**. 2008 Mar 14;9:13. PMID: 18341689
233. Semkova I, Schilling M, Henrich-Noack P, Rami A, Kriegelstein J. Clenbuterol protects mouse cerebral cortex and rat hippocampus from ischemic damage and attenuates glutamate neurotoxicity in cultured hippocampal neurons by induction of NGF. **Brain Res**. 1996 Apr 22;717(1-2):44-54.
234. Sen S, McDonald SP, Coates PT, Bonder CS. Endothelial progenitor cells: novel biomarker and promising cell therapy for cardiovascular disease. *Clin Sci (Lond)*. 2011 Apr;120(7):263-83. Review.

235. Shaffer RG, Greene S, Arshi A, Supple G, Bantly A, Moore JS, Mohler ER 3rd. Flow cytometric measurement of circulating endothelial cells: the effect of age and peripheral arterial disease on baseline levels of mature and progenitor populations. **Cytometry B Clin Cytom.** **2006** Mar;70(2):56-62.
236. Shankar JJ, dos Santos MP, Deus-Silva L, Lum C. Angiographic evaluation of the effect of intra-arterial milrinone therapy in patients with vasospasm from aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **Neuroradiology.** **2011** Feb;53(2):123-8. Epub 2010 Jun 5.
237. Shankar JJ, Tan IY, Krings T, Terbrugge K, Agid R. CT angiography for evaluation of cerebral vasospasm following acute subarachnoid haemorrhage. **Neuroradiology.** **2011** PMID: 21541687.
238. Shibuya M, Suzuki Y, Sugita K, Saito I, Sasaki T, Takakura K, Nagata I, Kikuchi H, Takemae T, Hidaka H, et al. Effect of AT877 on cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Results of a prospective placebo-controlled double-blind trial. **J Neurosurg.** **1992** Apr;76(4):571-7.
239. Shin HK, Dunn AK, Jones PB, Boas DA, Moskowitz MA, Ayata C. Vasoconstrictive neurovascular coupling during focal ischemic depolarizations. **J Cereb Blood Flow Metab.** **2006** Aug;26(8):1018-30.
240. Sillberg VA, Wells GA, Perry JJ. Do statins improve outcomes and reduce the incidence of vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a meta-analysis. **Stroke.** **2008** Sep;39(9):2622-6. Epub 2008 Jul 24.
241. Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. **Blood.** **1991** Jul 1;78(1):55-62.
242. Smith WS, Dowd CF, Johnston SC, Ko NU, DeArmond SJ, Dillon WP, Setty D, Lawton MT, Young WL, Higashida RT, Halbach VV. Neurotoxicity of intra-arterial papaverine preserved with chlorobutanol used for the treatment of cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **Stroke.** **2004** Nov;35(11):2518-22. Epub 2004 Oct 7.
243. Sobrino T, Hurtado O, Moro MA, Rodríguez-Yáñez M, Castellanos M, Brea D, Moldes O, Blanco M, Arenillas JF, Leira R, Dávalos A, Lizasoain I, Castillo J. The increase of circulating endothelial progenitor cells after acute ischemic stroke is associated with good outcome. **Stroke.** **2007** Oct;38(10):2759-64.

244. Soehle M, Czosnyka M, Pickard JD, Kirkpatrick PJ. Continuous assessment of cerebral autoregulation in subarachnoid hemorrhage. **Anesth Analg.** 2004 Apr;98(4):1133-9
245. Somjen GG. Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. **Physiol Rev.** 2001 Jul;81(3):1065-96.
246. Steurer M, Kern J, Zitt M, Amberger A, Bauer M, Gastl G, Untergasser G, Gunsilius E. Quantification of circulating endothelial and progenitor cells: comparison of quantitative PCR and four-channel flow cytometry. **BMC Res Notes.** 2008 Aug 28;1:71.
247. Strippoli GF, Navaneethan SD, Craig JC. Haemoglobin and haematocrit targets for the anaemia of chronic kidney disease. **Cochrane Database Syst Rev.** 2006 Oct 18;(4):CD003967. Review.
248. Strong AJ, Anderson PJ, Watts HR, Virley DJ, Lloyd A, Irving EA, Nagafuji T, Ninomiya M, Nakamura H, Dunn AK, Graf R. Peri-infarct depolarizations lead to loss of perfusion in ischaemic gyrencephalic cerebral cortex. **Brain.** 2007 Apr;130(Pt 4):995-1008.
249. Sviri GE, Feinsod M, Soustiel JF. Brain natriuretic peptide and cerebral vasospasm in subarachnoid hemorrhage. Clinical and TCD correlations. **Stroke.** 2000 Jan;31(1):118-22.
250. Takenaka K, Kassell NF, Foley PL, Lee KS. Oxyhemoglobin-induced cytotoxicity and arachidonic acid release in cultured bovine endothelial cells. **Stroke.** 1993 Jun;24(6):839-45; discussion 845-6.
251. Tamatani S, Sasaki O, Takeuchi S, Fujii Y, Koike T, Tanaka R. Detection of delayed cerebral vasospasm, after rupture of intracranial aneurysms, by magnetic resonance angiography. **Neurosurgery.** 1997 Apr;40(4):748-53; discussion 753-4.
252. Tate CC, Fonck C, McGrogan M, Case CC. Human mesenchymal stromal cells and their derivative, SB623 cells, rescue neural cells via trophic support following in vitro ischemia. **Cell Transplant.** 2010;19(8):973-84. Epub 2010 Mar 26.
253. Teerlink T. ADMA metabolism and clearance. **Vasc Med.** 2005 Jul;10 Suppl 1:S73-81. Review.

254. Thijssen DH, Torella D, Hopman MT, Ellison GM. The role of endothelial progenitor and cardiac stem cells in the cardiovascular adaptations to age and exercise. **Front Biosci.** 2009 Jan 1;14:4685-702. Review.
255. Thomas JE, Nemirovsky A, Zelman V, Giannotta SL. Rapid reversal of endothelin-1-induced cerebral vasoconstriction by intrathecal administration of nitric oxide donors. **Neurosurgery.** 1997 Jun;40(6):1245-9.
256. Thomé C, Seiz M, Schubert GA, Barth M, Vajkoczy P, Kasuya H, Schmiedek P. Nicardipine pellets for the prevention of cerebral vasospasm. **Acta Neurochir Suppl.** 2011;110(Pt 2):209-11.
257. Tonn J, Hoffmann O, Hofmann E, Schlake HP, Sörensen N, Roosen K. "De novo" formation of intracranial aneurysms: who is at risk? **Neuroradiology.** 1999 Sep;41(9):674-9.
258. Treggiari MM, Walder B, Suter PM, Romand JA. Systematic review of the prevention of delayed ischemic neurological deficits with hypertension, hypervolemia, and hemodilution therapy following subarachnoid hemorrhage. **J Neurosurg.** 2003 May;98(5):978-84.
259. Turner JD, Mammis A, Prestigiacomo CJ. Erythropoietin for the treatment of subarachnoid hemorrhage: a review. **World Neurosurg.** 2010 May;73(5):500-7.
260. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. **Nat Rev Immunol.** 2008 Sep;8(9):726-36. Review.
261. Vajkoczy P, Horn P, Thome C, Munch E, Schmiedek P. Regional cerebral blood flow monitoring in the diagnosis of delayed ischemia following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **J Neurosurg.** 2003 Jun;98(6):1227-34.
262. Vajkoczy P, Meyer B, Weidauer S, Raabe A, Thome C, Ringel F, Breu V, Schmiedek P. Clazosentan (AXV-034343), a selective endothelin A receptor antagonist, in the prevention of cerebral vasospasm following severe aneurysmal subarachnoid hemorrhage: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter phase IIa study. **J Neurosurg.** 2005 Jul;103(1):9-17.
263. Valable S, Montaner J, Bellail A, Berezowski V, Brillault J, Cecchelli R, Divoux D, Mackenzie ET, Bernaudin M, Roussel S, Petit E. VEGF-induced BBB permeability is associated with an MMP-9 activity increase in cerebral ischemia: both effects decreased by Ang-1. **J Cereb Blood Flow Metab.** 2005 Nov;25(11):1491-504.

264. Valgimigli M, Rigolin GM, Fucili A, Porta MD, Soukhomovskaia O, Malagutti P, Bugli AM, Bragotti LZ, Francolini G, Mauro E, Castoldi G, Ferrari R. CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. **Circulation.** 2004 Sep 7;110(10):1209-12. Epub 2004 Jul 12.
265. van den Bergh WM, Dijkhuizen RM, Rinkel GJ. Potentials of magnesium treatment in subarachnoid haemorrhage. **Magnes Res.** 2004 Dec;17(4):301-13.
266. van Gijn J, Kerr RS, Rinkel GJ. Subarachnoid haemorrhage. **Lancet.** 2007 Jan 27;369(9558):306-18.
267. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. **Circulation.** 2001 Jun 19;103(24):2885-90.
268. Vatter H, Konczalla J, Seifert V. Endothelin related pathophysiology in cerebral vasospasm: what happens to the cerebral vessels? **Acta Neurochir Suppl.** 2011;110(Pt 1):177-80.
269. Vatter H, Konczalla J, Weidauer S, Preibisch C, Zimmermann M, Raabe A, Seifert V. Effect of delayed cerebral vasospasm on cerebrovascular endothelin A receptor expression and function. **J Neurosurg.** 2007 Jul;107(1):121-7.
270. Vatter H, Mursch K, Zimmermann M, Zilliken P, Kolenda H, Seifert V, Schilling L. Endothelin-converting enzyme activity in human cerebral circulation. **Neurosurgery.** 2002 Aug;51(2):445-51; discussion 451-2.
271. Velly L, Pellegrini L, Guillet B, Bruder N, Pisano P. Erythropoietin 2nd cerebral protection after acute injuries: a double-edged sword? **Pharmacol Ther.** 2010 Dec;128(3):445-59. Epub 2010 Aug 21.
272. Verfaillie CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. **Trends Cell Biol.** 2002 Nov;12(11):502-8. Review.
273. Vergouwen MD, Etminan N, Ilodigwe D, Macdonald RL. Lower incidence of cerebral infarction correlates with improved functional outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **J Cereb Blood Flow Metab.** 2011 Apr 20. PMID: 21505477
274. Vergouwen MD, Ilodigwe D, Macdonald RL. Cerebral infarction after subarachnoid hemorrhage contributes to poor outcome by vasospasm-dependent and -independent effects. **Stroke.** 2011 Apr;42(4):924-9.

275. Visocchi M, Della Pepa GM, Esposito G, Tufo T, Zhang W, Li S, Zhong J. Spinal cord stimulation and cerebral hemodynamics: updated mechanism and therapeutic implications. **Stereotact Funct Neurosurg.** **2011**;89(5):263-74. Epub 2011 Aug 19
276. 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** Jul;10(7):626-36.
277. Vornov JJ, Tasker RC, Coyle JT. Delayed protection by MK-801 and tetrodotoxin in a rat organotypic hippocampal culture model of ischemia. **Stroke.** **1994** Feb;25(2):457-64; discussion 464-5.
278. Walton JN. The prognosis and management of subarachnoid haemorrhage. **Can Med Assoc J.** **1955** Feb 1;72(3):165-75.
279. Wang Y, Johnsen HE, Mortensen S, Bindslev L, Ripa RS, Haack-Sørensen M, Jørgensen E, Fang W, Kastrup J. Changes in circulating mesenchymal stem cells, stem cell homing factor, and vascular growth factors in patients with acute ST elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. **Heart.** **2006** Jun;92(6):768-74. Epub 2005 Oct 26.
280. Wang Y, Kilic E, Kilic U, Weber B, Bassetti CL, Marti HH, Hermann DM. VEGF overexpression induces post-ischaemic neuroprotection, but facilitates haemodynamic steal phenomena. **Brain.** **2005** Jan;128(Pt 1):52-63.
281. Wartenberg KE, Mayer SA. Medical complications after subarachnoid hemorrhage. **Neurosurg Clin N Am.** **2010** Apr;21(2):325-38.
282. Weant KA, Ramsey CN 3rd, Cook AM. Role of intraarterial therapy for cerebral vasospasm secondary to aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **Pharmacotherapy.** **2010** Apr;30(4):405-17. Review.
283. Weidauer S, Lanfermann H, Raabe A, Zanella F, Seifert V, Beck J. Impairment of cerebral perfusion and infarct patterns attributable to vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a prospective MRI and DSA study. **Stroke.** **2007** Jun;38(6):1831-6. Epub 2007 Apr 19. PMID: 17446425
284. Weir B, Macdonald RL, Stoodley M. Etiology of cerebral vasospasm. **Acta Neurochir Suppl.** **1999**;72:27-46. Review.

285. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. **N Engl J Med.** **2005** Sep 8;353(10):999-1007.
286. Werner N, Wassmann S, Ahlers P, Schiegl T, Kosiol S, Link A, Walenta K, Nickenig G. Endothelial progenitor cells correlate with endothelial function in patients with coronary artery disease. **Basic Res Cardiol.** **2007** Nov;102(6):565-71.
287. Wiebers DO, Whisnant JP, Huston J 3rd, Meissner I, Brown RD Jr, Piepgras DG, Forbes GS, Thielen K, Nichols D, O'Fallon WM, Peacock J, Jaeger L, Kassell NF, Kongable-Beckman GL, Torner JC; International Study of Unruptured Intracranial Aneurysms Investigators. Unruptured intracranial aneurysms: natural history, clinical outcome, and risks of surgical and endovascular treatment. **Lancet.** **2003** Jul 12;362(9378):103-10.
288. Willinsky RA, Taylor SM, TerBrugge K, Farb RI, Tomlinson G, Montanera W. Neurologic complications of cerebral angiography: prospective analysis of 2,899 procedures and review of the literature. **Radiology.** **2003**;227(2):522-8.
289. Woitzik J, Dreier JP, Hecht N, Fiss I, Sandow N, Major S, Winkler M, Dahlem YA, Manville J, Diepers M, Muench E, Kasuya H, Schmiedek P, Vajkoczy P. Delayed cerebral ischemia and spreading depolarization in absence of angiographic vasospasm after subarachnoid hemorrhage. **J Cereb Blood Flow Metab.** **2011** Dec 7. doi: 10.1038/jcbfm.2011.169.
290. Wojakowski W, Landmesser U, Bachowski R, Jadczyk T, Tendera M. Mobilization of stem and progenitor cells in cardiovascular diseases. *Leukemia.* 2011 Jul 26. doi: 10.1038/leu.2011.184.
291. Xie A, Aihara Y, Bouryi VA, Nikitina E, Jahromi BS, Zhang ZD, Takahashi M, Macdonald RL. Novel mechanism of endothelin-1-induced vasospasm after subarachnoid hemorrhage. **J Cereb Blood Flow Metab.** **2007** Oct;27(10):1692-701. Epub 2007 Mar 28.
292. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. **Blood.** **1997** Dec 15;90(12):5002-12.
293. Zaman K, Ryu H, Hall D, O'Donovan K, Lin KI, Miller MP, Marquis JC, Baraban JM, Semenza GL, Ratan RR. Protection from oxidative stress-induced apoptosis in cortical

neuronal cultures by iron chelators is associated with enhanced DNA binding of hypoxia-inducible factor-1 and ATF-1/CREB and increased expression of glycolytic enzymes, p21(waf1/cip1), and erythropoietin. **J Neurosci.** **1999** Nov 15;19(22):9821-30.

294. Zawadzka M, Rivers LE, Fancy SP, Zhao C, Tripathi R, Jamen F, Young K, Goncharevich A, Pohl H, Rizzi M, Rowitch DH, Kessler N, Suter U, Richardson WD, Franklin RJ. CNS-resident glial progenitor/stem cells produce Schwann cells as well as oligodendrocytes during repair of CNS demyelination. **Cell Stem Cell.** **2010** Jun 4;6(6):578-90.

295. Zhang S, Wang L, Liu M, Wu B. Tirilazad for aneurysmal subarachnoid haemorrhage. **Cochrane Database Syst Rev.** **2010** Feb 17;(2): CD006778.

296. Zhao XD, Zhou YT, Zhang X, Zhuang Z, Shi JX. A meta analysis of treating subarachnoid hemorrhage with magnesium sulfate. **J Clin Neurosci.** **2009** Nov;16(11):1394-7. Epub 2009 Aug 22. Review.

297. Zubkov AY, Rollins KS, Parent AD, Zhang J, Bryan RM Jr. Mechanism of endothelin-1-induced contraction in rabbit basilar artery. **Stroke.** **2000** Feb;31(2):526-33

IX. RINGRAZIAMENTI

Mi rendo sempre più conto che un presupposto insostituibile per lo sviluppo delle competenze personali e professionali è la preziosa esperienza di incontri con persone e team.

Con questa consapevolezza do in questo mio lavoro un particolare spazio ai “ringraziamenti” .

Un ringraziamento particolare al Professor Giovanni Tredici, che mi ha permesso di far parte del suo gruppo in questi anni e che comprendendo il mio desiderio di conciliare l’attività neurochirurgica a quella di ricerca, mi ha sempre incoraggiato in tale senso. Ringrazio il Prof. per gli approfondimenti in ambito scientifico, per i suoi consigli e le discussioni cliniche, preziose per la incredibile esperienza di neurologo e di neurofisiologo. Un esempio per tutti noi la sua quotidiana attenta disponibilità ogni giorno in laboratorio, nonostante gli impegni accademici.

Persino la pausa pranzo partecipata da tutti i colleghi del laboratorio con la presenza del Prof. diventa un importante momento di serenità e discussione che si chiude puntualmente con il caffè dell’enorme caffettiera, versato nelle tazzine variopinte. Questo rito oltre che essere un momento condiviso sembra aumentare l’efficienza del mattino e del pomeriggio, scandendo la giornata in maniera molto strutturata.

Ho avuto una più che positiva esperienza con il laboratorio in cui ho imparato molto riguardo l’attività e le metodiche di ricerca, scoprendo un modello di lavoro in cui il clima di collaborazione, gentilezza ed amicizia valorizza la motivazione dei ricercatori la produttività del gruppo, l’impegno costruttivo.

Desidero ringraziare la Dott.ssa Elisabetta Donzelli che mi ha assistito per tutte queste fasi del progetto, per avermi insegnato tecniche di biologia molecolare e metodi di colture cellulari. La ringrazio anche per l’amicizia e per aver condiviso con me la caparbia nel riuscire a studiare le EPC ed alcuni aspetti inerenti al vasospasmo anche nei momenti più difficili.

Vorrei ringraziare la Prof. Paola Marmiroli, per essere sempre vicina con amicizia, intelligenza e generosità nei confronti di noi dottorandi.

Grazie al Prof. Guido Cavaletti, per rappresentare l’esempio del medico-ricercatore e per la sua attenzione per ciascuno di noi.

Grazie anche alla Dott.ssa Gabriella Niccolini, per la sua amicizia leale e allegra e per il suo pragmatismo, alla Dottoressa Federica Avezza e alla Dottoressa Mariarosaria Miloso per loro gentilezza.

Ringrazio moltissimo il Dott. Daniele Maggioni e la Dott.ssa Maddalena Ravasi per la loro amicizia ed il loro aiuto per gli esperimenti in vitro - in particolare per le colture neuronali - e la loro partecipazione alle gioie e alle delusioni dei miei esperimenti.

Ringrazio la Dott.ssa Arianna Scuteri per la sua amicizia e per il suo parere schietto e competente.

Grazie alla Dott.ssa Elisa Ballarini per aver condiviso le fasi iniziali di questo progetto, con enorme pazienza, impegno e simpatia.

Grazie alla Dott.ssa Roberta Rigoglio per molti consigli e per aver reso possibile gli esperimenti citofluorimetrici.

Grazie alla Dott.ssa Cristina Caldara per la sua amicizia e per il suo supporto durante le 'prime' di svariati esperimenti, alla Dott.ssa Juliana Redondo ed alla Dott.ssa Marianna Monfrini.

Grazie anche a Valentina e ad Azzurra che stanno preparando le loro tesi di laurea in Biotecnologie, per il tempo condiviso in camera cellule.

Grazie a Dana Foudah per alcuni consigli sia durante il lavoro sotto-cappa, sia durante l'immuno-istochimica.

Grazie alla Dott.ssa Virginia Rodriguez per avermi introdotta al microscopio a fluorescenza e per avermi permesso di ottenere delle immagini al microscopio con-focale.

Grazie a Mario Bossi per alcune divertenti discussioni- in particolare sul mondo difficile dei neuroni da coltura primaria e per alcuni ragguagli sui microscopi.

Grazie anche alle Dott.sse Valentina Carozzi, Cecilia Ceresa, a Norberto Oggioni, a Giancarlo ed a Monica ed a tutti gli altri amici del laboratorio per la loro partecipazione.

Grazie ai colleghi del San Gerardo, sempre disponibili ad aiutarci come la Dott.ssa Lanzafame, la Dott.ssa Radaelli.

Grazie anche a tutti i vicini di laboratorio, a Massi sempre pronto per un consiglio, a Gigi e a Stuart, a Serena, a Simona e a Gabriele, ad Alessandro, Barbara, Pamela, al Dr Villa, agli informatici ed anche ai custodi (che a volte hanno avuto pazienza nel chiudere i cancelli..).

Ringrazio inoltre tutti i medici dell'Ospedale C.T.O. Maria Adelaide, in particolare il Dott. Giuliano Faccani ed il Dott. Michele Naddeo, della neurochirurgia- oltre al gruppo di anestesia e rianimazione diretto dal Dr. Maurizio Berardino, la Divisione di Neuroradiologia diretta dalla Dott.ssa Consuelo Valentini ed in particolare il Dr. Fabrizio Venturi, il pronto soccorso il Comitato Etico dell'Ospedale C.T.O. Maria Adelaide e dell'Ospedale Molinette, il Dr Costa della Neurofisiologia, il Prof. Carannante che ha

presentato il nostro progetto al Comitato Etico Locale e tutti gli infermieri – per aver permesso di incominciare questo studio clinico. Ringrazio la Dott.ssa Fiorio ed il Dr Bracco e i loro tecnici che hanno avuto la pazienza di ospitarmi nel loro laboratorio di analisi per l'allestimento dei campioni- a tutte le ore ed in tutti i giorni della settimana immaginabili.

Grazie al Prof. Christopher Wallace, al Prof. Michael Tymianski, al Prof. Fred Gentili, al Prof. Karl Ter Brugge, al Prof. Timo Krings alla Dott.ssa Ronit Agid e a tutti i colleghi neurochirurghi e neuroradiologi soprattutto di Toronto che mi hanno permesso di acquisire un'incredibile esperienza in ambito della neurochirurgia cerebrovascolare presso l'Università di Toronto che spazia dalla strategia chirurgica (ho potuto eseguire i primi interventi di neurochirurgia vascolare come primo operatore), alla gestione clinica ed ambulatoriale. In particolare ho trovato molto interessante il diverso modo di insegnare una materia come la chirurgia. All'Università di Toronto ho potuto inoltre apprezzare le metodiche delle ricerche cliniche prospettive osservazionali o riguardanti farmaci innovativi e l'organizzazione della ricerca di base e preclinica in ambito neurochirurgico. Infine sempre a Toronto ho osservato un esempio di strategia di fund-raising e anche di divulgazione scientifica - per cui l'università e gli ospedali sono al centro dell'attenzione pubblica e considerati un vero orgoglio della città e del paese e quindi sostenuti a tutti i livelli.

Grazie al Prof. Y. Yonekawa a Zurigo e al Prof. J. Hernesniemi a Helsinki, per avermi ospitata presso le loro neurochirurgie con e generosità per la condivisione dei casi neurochirurgici ed il loro insegnamento.

Ringrazio il Prof. Alessandro Ducati perché presso l'Ospedale Molinette ho potuto svolgere, prima di partire per il Canada, le prime guardie, i primi ambulatori ed i primi interventi come neurochirurgo specialista.

Ringrazio il Professor Giorgetti, chirurgo vascolare presso l'ospedale Humanitas, per avermi permesso di condividere per un periodo con la sua squadra tutte le esperienze chirurgiche ed il modo di pensare (comprese le endoarterectomie).

Sono anche grata ad altri neurochirurghi che in questi anni mi hanno permesso di visitare le loro divisioni e di vedere i loro metodi, talvolta anche coinvolgendomi negli interventi: il Prof. Peter Schmiedeck, il Prof. Peter Vajkozcy, ed il Dr. Thomé all'Università di Heidelberg-Mannheim, il Prof. Karl Ungersboeck a Vienna, il Prof. Richard Hayward ed il

Dr Dominic Thompson a Londra; il Prof. Andreas Schwarz a Bolzano, il Prof. Giorgio Frank a Bologna.

Ringrazio tutti i miei amici anche al di fuori dall'ambito neuroscientifico per avermi accompagnata in questi anni, tra i quali in particolare: Margherita e Paolo, Costanza, Francesca, Valeria, Filippo, Carolina, la Marghe, Guilia, i gemelli Stechel, Giorgione per straordinarie capacità organizzative, Alberto, gli amici torinesi ed in particolare Valentina e Ube, gli amici del Wycliffe College a Toronto che mi hanno fatto sentire a casa, grazie a Karl per la forza che spesso mi mandava e a Milena.

Grazie a Giorgio e a Donatella.

Grazie a Giorgio e alla carissima Gigliola per l'affetto. Grazie anche agli amici di famiglia che in tutti questi anni ci sono stati vicini, in particolare Anna e Roberto.

Grazie alla Zia Silvia per il suo generoso aiuto logistico nel periodo torinese ed il suo affetto; alla Zia Beate ed allo Zio Peter per la loro vicinanza nonostante la distanza geografica e per tutti i pensieri belli che mi hanno trasmesso; alla Zia Ingrid per l'incoraggiamento ed allo Zio Ulli per averci trasmesso l'interesse per i viaggi.

Grazie ai miei Nonni Vera, Joseph, Paolo e Margherita – ai quali penso tutti i giorni con stima, affetto e nostalgia.

Ringrazio il Professor Giovanelli Barilari per avermi ammesso nel 1998 come studente interna nel suo reparto di Neurochirurgia e per il periodo interessante che ho condiviso con la sua squadra.

Ringrazio anche il Prof. Villani mio direttore di specialità ed il Prof. Gaini. Ringrazio il Dr. Rampini ed il Prof. Zavanone che hanno partecipato come corelatori alla mia tesi di specializzazione e che seguono il mio iter di neurochirurgo con sostegno e simpatia.

Il Dr. Finocchiaro per avermi ospitata per la tesi di laurea nel suo laboratorio di neuro-oncologia e per avermi introdotta al laboratorio, alla lettura ed alla scrittura scientifici. Sono grata, con stima, al Prof. Calissano per i meravigliosi racconti sul mondo dei neuroni.

Ringrazio la Dott.ssa Maria Federica Ferrio-Fontanella che mi ha dato consigli per il doppler transcranico. Grazie al Dr. Guglielmo Pero e al Dr. Luca Quilici di Niguarda per l'amicizia e la condivisione di discussioni su casi neurovascolari.

Ringrazio con stima la Dott.ssa Silvana Penco per interessanti colloqui su argomenti di genetica in ambito neurovascolare.

Grazie al Dr Assietti per il lavoro clinico e chirurgico condiviso durante questi ultimi mesi di dottorato.

Ringrazio il Prof. Marco Fontanella importante riferimento come neurochirurgo vascolare e ricercatore.

Ringrazio inoltre il Professor Marco Cenzato ed il Professor Edoardo Boccardi, alla guida del gruppo neurovascolare di Niguarda, per avermi permesso con generosità di far parte delle riunioni neurovascolari, e di condividere insieme a loro i casi più complessi, di far parte ancora dell'importante scuola di neurochirurgia vascolare a Milano fondata dal Dr. Collice - che mi ha trasmesso l'interesse per la neurochirurgia vascolare e al quale vorrei dedicare questa tesi ed i miei lavori in questo ambito.

Un grazie infinito ai miei genitori.

Grazie a Paolina, per il suo affetto da sorellina ingegnere - di poche parole, ma profondo. Infine un grazie super-speciale a Marco, da sempre fratello e 'collega', da un po' anche collega per la medicina e per le neuroscienze- per il suo *humor*, la sua visione, la sua generosità e la sua amicizia.