



**Università  
degli Studi  
di Ferrara**

DOTTORATO DI RICERCA IN

" SCIENZE BIOTECNOLOGICHE E BIOMEDICHE "

CICLO XXXVI

COORDINATORE Prof. Pinton Paolo

**IDENTIFICAZIONE DI BIOMARCATORI EMATICI COINVOLTI NEL  
RIMODELLAMENTO DELLA PARETE AORTICA DOPO TRATTAMENTO DI  
ANEURISMI DELL'AORTA ADDOMINALE**

Settore Scientifico Disciplinare D.M 45/2013

**Dottorando**

Dott. Pierfilippo Acciarri

**Tutore**

Prof. Vincenzo Gasbarro

Anno Accademico 2020 – 2023

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| INTRODUZIONE.....           | 3  |
| OBIETTIVI DELLO STUDIO..... | 27 |
| MATERIALI E METODI.....     | 27 |
| RISULTATI .....             | 33 |
| DISCUSSIONE .....           | 39 |
| CONCLUSIONI.....            | 44 |

## **INTRODUZIONE:**

Un aneurisma dell'aorta addominale (AAA) è una condizione in cui vi è un'espansione anormale e permanente della parete dell'aorta a livello addominale.

La più diffusa definizione di aneurisma si basa sui diametri dell'aorta addominale: un diametro aortico di 3 o più cm (misura che solitamente si presenta a più di 2 deviazioni standard sopra al diametro medio in entrambi i sessi), si considera aneurismatico. Questa definizione, basata su diametri repertati con indagine ecocolordoppler, presenta una sensibilità del 67% ed una specificità del 97% nel prevedere la necessità di correzione dell'aneurisma aortico addominale (AAA) entro 10 anni.<sup>1</sup> Tuttavia, un cut-off più basso risulterebbe essere più appropriato per quanto riguarda il sesso femminile e la popolazione asiatica, a causa della variabilità del valore medio dell'aorta nativa nelle differenti popolazioni e nei differenti sessi.<sup>2</sup>

La patogenesi dell'AAA coinvolge due aspetti principali: la degradazione della matrice extracellulare che indebolisce la parete aortica e l'infiltrazione infiammatoria all'interno della parete degli aneurismi aortici che accelera la progressione dell'aneurisma.<sup>1,2</sup>

La parete vascolare aortica è un tessuto costituito da cellule endoteliali, del muscolo liscio, fibroblasti e matrice extracellulari. Questa struttura è recettiva a vari stimoli, molti dei quali possono contribuire a modificazioni fisiopatologiche, a seguito di interazioni cellulari autocrine/paracrine: la parete vascolare si adatta così a questi segnali, producendo dei mediatori di segnale che influenzano la funzione e la struttura della parete stessa. Questo complesso e dinamico processo di modificazioni vascolari viene definito come “rimodellamento vascolare”.

In letteratura ad oggi sono presenti numerosi studi riguardanti gli ipotetici biomarker utilizzabili nella diagnosi e nel follow up della patologia aneurismatica aortica addominale. A causa della vastità dei biomarker analizzabili, ogni gruppo di lavoro si è concentrato solo su alcune categorie di proteine, di DEGs o di miRNA.

Questa revisione della letteratura mira ad approfondire quali sono i trascritti maggiormente descritti in letteratura ed a cercare di raggruppare quelli che sono i dati analizzati dai vari gruppi.

## Proteine

Tra i biomarker, le proteine rappresentano la categoria maggiormente riportata in letteratura, con particolare attenzione rivolta a quelle che sono le proteine che vanno ad impattare sulle caratteristiche/sulle modifiche della matrice extracellulare.

Queste possono essere suddivise in:

- Proteine correlate al metabolismo della matrice extracellulare (ECM)
- Proteine dell'infiammazione

### Proteine correlate al metabolismo della matrice extracellulare

La ECM della parete aortica è prevalentemente costituita da macromolecole, quali elastina e collagene, e possiede molte funzioni essenziali per l'omeostasi vasale. Il danno o il rimodellamento inappropriato della ECM si pensa possa contribuire alla genesi ed alla progressione dell'AAA. La perdita dell'elastina e la degradazione del collagene portano ad indebolimento, dilatazione e, in ultima istanza, alla rottura della parete aortica.<sup>3</sup>

Su modelli animali sono stati studiati i ruoli di elastina e collagene nella patogenesi di AAA, attraverso l'infusione di proteasi. In particolare, l'infusione di elastasi ha permesso di studiare lo sviluppo della dilatazione aortica ma la rottura della parete sembra non avvenire sino all'infusione di collagenasi. Questo avvalorava l'ipotesi che le elastasi siano coinvolte nella dilatazione aortica e che le collagenasi siano necessarie per la rottura di AAA.<sup>3,4</sup>

La proteolisi della matrice extracellulare inoltre risulta fondamentale per acconsentire l'ingresso delle cellule infiammatorie dal lume vasale/dai vasa vasorum nella tunica media, scatenando così una catena di processi infiammatori che permettono lo sviluppo di AAA e ne regolano il suo decorso.

Di seguito approfondiamo sia le proteine di questa categoria maggiormente studiate in letteratura che altre proteine meno citate ma che potrebbero risultare un buon biomarker per AAA.

- Peptidi sierici dell'elastina (SEP)

Rappresentano i prodotti di degradazione circolanti dell'elastina. Come citato sopra, le elastasi sono coinvolte nello sviluppo di AAA: una volta degradata l'elastina, i suoi peptidi

sierici sono rilasciati in circolo e potrebbero essere utilizzabili come marker. Per quanto riguarda il rapporto tra SEP ed il tasso di espansione di AAA, gli studi ci forniscono dati contrastanti. Alcuni gruppi hanno mostrato una correlazione statisticamente significativa se si prende in considerazione la crescita riguardante uno stretto follow-up di tempo (12-18 mesi): il gruppo di Degg et al. <sup>5</sup> ad esempio, analizzando oltre 200 biomarker correlabili alla crescita di AAA, ha riscontrato una correlazione tra tasso di crescita di AAA e SEP, statisticamente significativa ( $P=0.04$ ) dal tempo iniziale di osservazione sino a 18 mesi di follow-up. Il gruppo di Lindholt et al. <sup>6</sup> ha condotto 3 differenti studi, includenti in totale 205 pazienti, e tutti hanno mostrato una correlazione statisticamente significativa tra SEP e tasso di espansione di AAA (coefficienti di correlazione -r- dei tre studi  $r_1=0.31$ ,  $r_2=0.33$ ,  $r_3=0.51$ ). <sup>7</sup> Per quanto riguarda invece il rischio di rottura, gli studi a disposizione si dimostrano coerenti, con una correlazione significativa tra SEP e rischio di rottura. Il Chichester Aneurysm screening Group ha mostrato nei loro studi che i livelli di SEP erano significativamente più alti in pazienti con grandi AAA ( $>60\text{mm}$ ) che sono andati incontro a rottura, paragonati a quelli non andati incontro a rottura ( $P=0.041$ ) <sup>3</sup>.

La **desmosina** rappresenta un aminoacido strutturale che viene specificatamente rilasciato in circolo quando l'elastina matura si rompe. Groeneveld et al. <sup>7</sup> hanno ipotizzato nel loro studio che le concentrazioni di demosina plasmatica possano riflettere in qualche modo l'attività del processo patologico negli aneurismi. Nel loro studio non sono state trovate correlazioni significative tra demosina e tasso di crescita di AAA (dato in contrasto con quanto descritto sopra per i SEP generici), tuttavia hanno dimostrato una correlazione tra demosina plasmatica e diametro di AAA al baseline ( $P$  tra 0.001-0.002 in diverse corti di studio per diametri misurati mediante ecocolordoppler;  $P=0.003$  per misurazioni con Angio-TC) ed anche una associazione tra valore baseline di demosina plasmatica e rischio di rottura ( $P=0.044$ ). Le concentrazioni di questo aminoacido inoltre sono risultate correlate con i livelli plasmatici di

MMP2, di TIMP1 e di IL6 (la cui descrizione sarà trattata di seguito), ma, rispetto a queste ultime, ha mostrato una migliore discriminazione nel predire una complicanza di AAA<sup>7</sup>.

- Collagene

Come sopra descritto, i vari tipi di collagene forniscono stabilità alla parete arteriosa. Nell'aorta il collagene di tipo I comprende circa 2/3 del contenuto totale in collagene ed è contenuto prevalentemente nell'intima e nell'avventizia. Il collagene di tipo III si presenta più abbondante nella tonaca media e si ritrova maggiormente in depositi densi lungo la lamina elastica. <sup>3</sup>I membri delle metaloproteinasi e delle cistein proteasi possono degradare le struttura del collagene di tipo I e III: lo squilibrio tra degradazione del collagene e la deposizione dello stesso è stata associata con progressione e rottura di AAA. È dunque stato ipotizzato l'utilizzo di metaboliti del collagene come biomarker per AAA.

Il **propeptide amino terminale del collagene tipo III (PIIINP)** riflette il quantitativo di sintesi di collagene di tipo III, mentre il **propeptide carbossi terminale del collagene tipo I (PICP)** riflette la sintesi di collagene tipo I.

Per quanto riguarda lo sviluppo di AAA, i livelli sierici di PIIINP sono stati riscontrati maggiormente elevati nei pazienti con AAA rispetto ai pazienti con patologia aortica ostruttiva (PAO)<sup>27</sup>. Uno studio in letteratura si concentra sulla correlazione tra PIIINP ed espansione di AAA ( $r=0.24$ ): lo studio comprendeva 99 pazienti in follow-up e la correlazione ha aumentato la sua significatività a 2 anni di follow up ( $p=0.002$ )<sup>3,7,8</sup>. Inoltre, i livelli sierologici di PIIINP sono stati correlati con lo spessore del trombo intraluminale. Infine, in pazienti con diagnosi di rottura di AAA, sono stati rilevati livelli anomalmente alti di PIIINP, indicando che i livelli sierici di questo marker potrebbero essere utili per fornire un dato di prognosi di rottura.

Lo studio dei livelli sierici di PICP, differentemente, ha fornito scarsi risultati riguardo alla sua possibilità di utilizzo: gli autori non hanno descritto significatività statistica tra livelli di

PICP e diametro aortico o suo tasso di espansione.<sup>3</sup> Tuttavia, i livelli di PICP sono risultati elevati nei tessuti di AAA prelevati durante intervento chirurgico di correzione<sup>9</sup>.

- Elastasi

L'elastasi è un enzima facente parte della famiglia delle serin-proteasi e rappresenta il principale enzima catabolico coinvolto nella degradazione dell'elastina matura e la sua attività viene inibita dalla tripsina. A sua volta successivamente la tripsina viene inibita **dall'alfa-1-antitripsina (A1AT)**<sup>3</sup>. Il fumo, maggior fattore di rischio cardiovascolare, è in grado di aumentare la produzione di elastasi da parte dei leucociti della parete aortica, spiegando quindi parte del meccanismo patogenetico di AAA in cui è coinvolta questa proteina.<sup>10</sup>

La concentrazione nella parete aortica di elastasi è risultata elevata in AAA rispetto a pazienti con PAO in un altro lavoro di Lindholt et al.<sup>10,11</sup>

In base ai meccanismi di regolazione dell'elastasi sopra descritti, **A1AT** è stato studiato come biomarker per lo studio di AAA. Questo in particolare si è reso necessario in quanto alcuni gruppi di studio hanno dimostrato che l'elastasi viene degradata molto rapidamente dalle sue antiproteinasi una volta che viene a contatto con il sangue<sup>3</sup>, pertanto i livelli di sierici di A1AT o dei complessi elastasi-A1AT (misurabili) riflettono quella che è l'attività di questo enzima. Il gruppo di Campa et.al ha infatti effettuato uno studio su 44 pazienti, di cui 23 aneurismatici, mostrando che i pazienti con AAA rispetto a soggetti sani o con AOP presentavano livelli sierici superiori di A1AT. Tuttavia, l'utilizzo del complesso elastasi-A1AT per valutare la progressione di AAA ha fornito risultati discordanti tra i vari studi. In particolare, un gruppo di lavoro in letteratura ha prodotto diversi studi su questo aspetto, producendo dati statisticamente significativi in alcuni lavori e in altri non è stato possibile mostrare alcuna correlazione. Questo dato è espressione del fatto che occorrono ulteriori studi prospettici per valutare l'effettiva applicabilità di A1AT per il suo utilizzo come marker di progressione di patologia aneurismatica.

- Altre serin-proteasi

Le serin-proteasi sono una classe di peptidasi che partecipano ad un ampio range di funzioni all'interno dell'organismo, inclusa la coagulazione, l'immunità e l'infiammazione.<sup>3</sup>

La **plasmina** è un enzima proteolitico che degrada molte proteine plasmatiche ed attiva tre vie della proteolisi, in particolare attiva la fibrinolisi. Degrada in modo diretto alcune componenti della ECM ed ha un effetto indiretto altre componenti attraverso la degradazione delle metalloproteinasi (MMP).

La plasmina viene rilasciata in circolo in forma inattiva conosciuta come plasminogeno. Il plasminogeno viene cleavato dall'**attivatore tissutale del plasminogeno (tPA)**, dall'**attivatore urochinasi del plasminogeno (uPA)**, dalla **trombina** e dal **fattore di Hageman (fattore XII)**. L'attività di questi enzimi attivatori viene regolata da un inibitore delle serin-proteasi: l'**inibitore degli attivatori del plasminogeno di tipo 1 (PAI-1)**, il maggiore inibitore del sistema fibrinolitico.

A loro volta tPA o uPA possono essere attivati da altri fattori, quali **cotina**, **omocisteina**, il **fattore inibente i macrofagi (MIF)**, il **transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)** e le **immunoglobuline dirette contro la Chlamydia pneumoniae (IgA-CP)**.

Come accade per l'elastasi, anche la plasmina viene inibita a contatto col sangue dalla  $\alpha$ 2-antiplasmina, originando i **complessi plasmina-antiplasmina (PAPs)**.<sup>3</sup>

In base ai meccanismi di regolazione sopra descritti, si può comprendere come tutte le proteine sopra descritte siano state studiate, ipotizzando che la maggior presenza di fattori favorenti la fibrinolisi possa essere marker di AAA, mentre la presenza di fattori inibenti la fibrinolisi possa rappresentare un marker con valore predittivo negativo per la presenza di AAA.

Per quanto riguarda i **PAPs**, la letteratura ci riporta scarsi dati riguardo al suo utilizzo. Il gruppo di Lindholt ha rilevato una correlazione statisticamente significativa col tasso di crescita di AAA ed hanno ipotizzato anche un loro potenziale nel predire i casi necessitanti

di andare incontro a chirurgia nei primi 5 anni, combinando il dato sierico con le dimensioni iniziali di AAA (sensibilità e specificità 83%,  $r=0.39$ ,  $P<0.001$ )<sup>10,12</sup>.

Maggiormente studiato invece risulta **tPA** ed i risultati tra i vari autori sono concordi nell'affermare che esiste una valida correlazione tra valore sierico di tPA ed AAA.<sup>3</sup> Inoltre, ancora una volta viene riscontrato che il fumo aumenti la produzione di cotinina, a sua volta attivatore di tPA.<sup>3</sup> Memon et al.<sup>13</sup> hanno rilevato attraverso l'analisi della regressione lineare dei livelli di t-PA in 133 pazienti con AAA, un'associazione significativa con il tasso di espansione dell'aneurisma sia prima che dopo aver aggiustato i dati per il diametro basale dell'aneurisma ( $P=0.016$ ). Lindholt et al.<sup>14</sup> a loro volta in un altro studio hanno dimostrato una correlazione significativa tra livelli di tPA ed espansione di AAA in un gruppo di 70 pazienti ( $r=0.37$ ). Dal punto di vista tissutale, Reilly et al.<sup>15</sup> hanno riscontrato elevati livelli di tPA nella parete aortica aneurismatica di 12 pazienti, rispetto a pazienti sani o con PAO (tot 14 pazienti), con una differenza statisticamente significativa tra i vari gruppi ( $P<0.05$ ).

Per quanto riguarda la correlazione tra tPA e rischio di rottura, i dati in letteratura non sono uniformi. Due gruppi di lavoro hanno misurato livelli bassi di tPA in pazienti con AAA rotto rispetto ad AAA integro<sup>16,17</sup>, mentre Skagius et al.<sup>18</sup> hanno osservato livelli 1.7 volte superiori in 50 pazienti con AAA rotto rispetto a 45 pazienti trattati in elezione.

Il **PAI-1** come già detto, rappresenta il principale regolatore del processo fibrinolitico, facente anch'esso parte del gruppo delle serin proteasi. Il suo principale ruolo è quello di inibire uPA e tPA, ma inibisce anche l'attività delle MMP, andando quindi ad agire in un ulteriore modo sulla degradazione della matrice extracellulare. Il gruppo di Lindholt ha rilevato una correlazione significativa (anche se debole) tra PAI-1 e tasso di espansione di AAA<sup>14</sup>. Dal punto di vista della rottura invece, 3 studi hanno riportato un livello di 4 volte superiore di PAI-1 in AAA rotti rispetto a pazienti operati in elezione (totale di 234 pazienti nei 3 studi,  $P<0.05$  in tutti e 3 gli studi).<sup>16,17,18</sup>

- Cistein proteasi

Le cistein proteasi sono una famiglia di enzimi coinvolti nella degradazione prevalentemente della matrice extracellulare ma anche dell'elastina. La famiglia è costituita da **cathepsine**, **caspasi**, **calpaine**. Un potente inibitore di queste cistein proteasi è la **cistatina C**.<sup>3</sup>

In questo gruppo di enzimi, le più studiate in letteratura sono le **cathepsine**, tuttavia con disomogeneità per quanto riguarda il tipo di catepsina studiata. Alcune cathepsine hanno meccanismi d'azione simili alle elastasi, mentre altre agiscono similmente alle MMP. Tutte le cellule maggiormente rappresentate nella parete di AAA esprimono le cathepsine (cellule muscolari lisce, cellule endoteliali, macrofagi infiltranti la parete). In modelli in vitreo si è osservato che quando i macrofagi derivanti dai monociti prendono contatto con la matrice extracellulare, rilasciano cathepsine sia in forma matura che in forma di precursori e l'ambiente acido circostante rende così possibile sia l'elastolisi che la limitazione all'accesso degli inibitori di queste proteasi. Ogni catepsina sembra avere un ruolo specifico patogenetico in AAA: ad es l'espressione di catepsina K è risultata elevata in AAA ed è stato ipotizzato che promuova la proliferazione di cellule T, l'apoptosi delle cellule muscolari lisce vascolari e la degradazione dell'elastina;<sup>19</sup> la catepsina L invece promuove l'accumulo di cellule infiammatorie nei siti di lesione arteriosa, l'angiogenesi e l'espressione di altre proteasi.<sup>20</sup>

Il gruppo di Abisi et al.<sup>21</sup> ha studiato i livelli di attività di varie cathepsine, in particolare di catepsina B,H,L ed S sia nel tessuto aortico che i livelli circolanti, mostrando come questi siano elevati in AAA rispetto a POA ed inoltre nel loro studio attraverso un'analisi con Western blot ha dimostrato elevati livelli di catepsina K ed S sia nella parete aneurismatica che nelle placche aterosclerotiche coronariche e carotidee, comparate rispetto a quelle di soggetti sani, indicando come il ruolo di queste proteasi sia veramente ampio.

Il gruppo di Memon et al.<sup>13</sup> ha studiato catepsina Z come biomarker, rilevando un aumento statisticamente significativo della sua concentrazione in pazienti con AAA rispetto ai soggetti sani in prima istanza, tuttavia, dopo aver aggiustato i dati per le variabili confondenti, il dato

ha perso significatività. Nonostante questo, catepsina Z è risultata avere correlazione positiva con il diametro aortico in AAA rispetto ai pazienti sani.

Data la vastità degli studi e dei ruoli accennati sopra, occorreranno ulteriori studi per la corretta definizione dei ruoli di queste proteasi e del loro possibile utilizzo in modo efficace come biomarker.

Ciò che invece risulta più chiaro è il ruolo di **cistatina C** nell'inibire le cistein proteasi e su come sia meglio utilizzabile come marker. Le cellule muscolari lisce di soggetti normali esprimono alte concentrazioni di cistatina C per controbilanciare gli effetti delle cistein proteasi: in modelli murini knockout per cistatina C è stata mostrata un'aumentata attività di catepsina B, S ed L, risultando in un aumento della degradazione dell'elastina con conseguente dilatazione del tessuto aortico aterosclerotico.<sup>22</sup> Esistono dunque due meccanismi coesistenti nella patologia AAA: iperespressione di catepsine e soppressione dell'espressione di cistatina C, dove entrambi i processi amplificano gli effetti della degradazione della matrice extracellulare.<sup>3</sup> Questi processi sono probabilmente il risultato di una risposta a citochine infiammatorie. I pazienti con basse concentrazioni sieriche di cistatina C presentano maggior vulnerabilità alla formazione di AAA: il diametro di AAA è risultato infatti inversamente correlato con i livelli sierici di cistatina C in vari studi, con ridotti livelli di cistatina C invece in tessuti aortici di pazienti con AAA.<sup>23</sup> Dal punto di vista del tasso di progressione tuttavia, vi sono scarsi studi e Lindholt et al. hanno rilevato una correlazione moderatamente negativa tra i livelli di cistatina C ed il tasso di espansione annuale di AAA ( $r=-0.24, P<0.05$ ).<sup>24</sup>

Tuttavia, è stata studiata anche cistatina B, in particolare Wang et al.<sup>25</sup> hanno studiato il plasma di 551 pazienti affetti da AAA, rilevando un livello elevato di cistatina B rispetto ai controlli sani, statisticamente significativo ( $P<0.001$ ). Questo suggerisce che cistatina C e cistatina B, nonostante siano proteine facenti parti dello stesso gruppo, svolgano ruoli differenti nella fisiopatologia di AAA.

- Metalloproteinasi

Le MMP sono delle endopeptidasi zinco e calcio-dipendenti sintetizzate come zimogeni inattivi (pro-MMP) e richiedono di essere attivate per indurre la loro funzione enzimatica. Gli inibitori tissutali endogeni delle metalloprotease (TIMP) regolano i livelli di attività di MMP. Sia la trascrizione di MMPs che di TIMPs è strettamente controllata, regolata chimicamente e da processi ossidoriduttivi mitocondriali ed anche dallo stress meccanico.<sup>3</sup> Le funzioni dirette delle MMP includono degradazione della matrice extracellulare, controllo dell'infiammazione, induzione dell'apoptosi; le funzioni indirette delle MMP variano dal rilascio di citochine e fattori di crescita dalla matrice extracellulare degradata. Numerose sono le MMP studiate e descritte in letteratura, ma quelle maggiormente studiate sono **MMP-2**, **MMP-9**, **MMP-12**. Le TIMP invece vanno da TIMP-1 a TIMP-4 e la più studiata in letteratura è **TIMP-1**.

Sia MMP-2 che MMP-9 sono metallogelatinasi e vanno principalmente ad agire sulla degradazione del collagene.

Per quanto riguarda **MMP-2** e la sua correlazione con il diametro aortico, gli studi non hanno rilevato una correlazione statisticamente significativa, nonostante vi sia ampia presenza di MMP-2 nel siero di pazienti con AAA a confronto con pazienti sani (n=10 per pz con AAA).<sup>26,27</sup> Per quanto riguarda la correlazione tra livello di MMP-2 e tasso di espansione, anche qui non vi è stata trovata correlazione statisticamente significativa, in particolare in un lavoro di Lindholt et al.<sup>28</sup> sono state analizzate concentrazioni sieriche in 36 pazienti affetti da AAA, senza ottenere dati significativi per il tasso di espansione (P=0.95). Ad oggi non sembrano essere stati effettuati particolari studi su MMP2 in pazienti con rottura di AAA.

**MMP-9** è senza dubbio la proteina maggiormente studiata in letteratura per il suo importante ruolo nella patogenesi di AAA. A riprova del fatto che MMP-9 è fondamentale per lo sviluppo della patologia aneurismatica, sono stati costruiti dei modelli murini con deficit di MMP-9: in

questi, è stata mostrata resistenza alla formazione di aneurisma dopo somministrazione di elastasi e questa resistenza è stata persa dopo trapianto di midollo osseo da topi wild-type.<sup>29</sup> Non tutti gli studi sono concordi con la sua effettiva correlazione con il diametro aneurismatico: Hovsepian et al.<sup>30</sup> hanno rilevato correlazione tra livelli di MMP-9 e presenza di AAA ma senza osservare correlazione con il diametro aortico; viceversa, Lindholt et al.<sup>28</sup> nello stesso studio condotto per MMP-2 su 36 soggetti con aneurismi che variavano da 30 a 50mm di diametro, vi è stata trovata correlazione statisticamente significativa con il diametro aortico e i livelli di MMP-9 ( $P=0.04$ ). Per quanto riguarda il tasso di espansione invece i dati sembrano essere maggiormente concordi. Quasi tutti gli studi sopra citati infatti presentano una correlazione statisticamente significativa tra livelli di MMP-9 e tasso di espansione<sup>26,27,28,30</sup>. Tuttavia, in uno degli studi più ampi eseguiti su una corte di 163 pazienti dal gruppo di Flondell-Sitè<sup>31</sup>, non vi è stata trovata correlazione statisticamente significativa durante il follow-up. I livelli di MMP-9 sono invece risultati più elevati negli AAA rotti rispetto agli AAA operati in elezione ( $P=0.006$ ) ed in particolare, Wilson et al.<sup>32</sup> hanno rilevato valori pre-operatori di MMP-9 più elevati nei soggetti con AAA rotto non sopravvissuti all'intervento rispetto a soggetti sopravvissuti a 30 giorni ( $P=0.017$ ).

Sebbene sia meno citata rispetto ai primi 2, **MMP-12** è una metalloproteasi (in particolare, una metalloelastasi agente non solo sul collagene ma anche sull'elastina), rilasciata dai macrofagi infiltranti la parete aortica, che sembra avere un importante ruolo patogenetico in AAA. In particolare, un gruppo di studio ha analizzato quelle che sono le componenti che vanno ad agire sul rimodellamento della matrice extracellulare attraverso un'analisi proteomica effettuata tramite western blot: in questo lavoro, nonostante numerose MMP siano state correlate alla proteolisi della matrice extracellulare implicata in AAA, MMP-12 è risultata l'unica con aumento significativo. Il gruppo ha successivamente eseguito un'analisi in vitro incubando campioni aortici di soggetti normali macroscopicamente in unione con MMP-12 ricombinante ad hanno utilizzato MMP-9 come metalloproteasi di controllo

addizionale: MMP-12 è risultato avere un effetto più pronunciato per la degradazione di fibronectina, tenascina, collagene XII e trombospondina.<sup>33</sup> Appare dunque plausibile affermare che il livello di attività di MMP-12 riscontrato a livello di parete sia correlato con il diametro dell'aneurisma aortico; tuttavia, questo rappresenta una speculazione dal momento in cui è possibile misurare questo marker solo nella parete aortica post-chirurgica. I vari studi hanno quindi rilevato la presenza di questa MMP-12 solo a livello di parete e non a livello circolante, in quanto questo enzima causa esso stesso la produzione di marker circolanti.

L'azione delle metalloproteasi è regolata degli inibitori tissutali **TIMP** ed, in particolare, **TIMP-1** agisce andando a regolare soprattutto l'azione di MMP-9<sup>3</sup>. A supporto di questo, lo stesso gruppo di studio di MMP-9 citato sopra, ha creato dei modelli murini knockout per TIMP-1, mostrando un aumento significativo nella formazione di AAA indotto dall'elastasi a confronto con animali wild-type.<sup>55</sup>

Nonostante questo, i vari gruppi di studio non hanno riscontrato una modificazione statisticamente significativa per l'utilizzo di TIMP-1 come marker per valutare il tasso di espansione di AAA: in particolare Flondell-Sitè et al.<sup>31</sup> (n pazienti=163) e Lindholt et al.<sup>28</sup> (n pazienti=36) hanno studiato i valori sierici di TIMP-1 senza risultati statisticamente significativi. Wilson et al.<sup>32</sup> hanno invece esaminato TIMP-1 nel siero dei pazienti con AAA rotto, senza anch'essi trovare un risultato statisticamente significativo.

### Proteine dell'infiammazione

Generalmente, le modificazioni date da infiammazione e degenerazione della parete aortica vanno a causare diminuzione della resistenza della parete, portando a dilatazione aortica progressiva, sino ad arrivare alla rottura quando lo stress di parete va a superare quella che è la resistenza intrinseca della parete stessa. L'infiammazione è dunque un processo importante nella formazione degli AAA, come dimostrato dalla presenza nella tonaca media e nell'avventizia di infiltrazione di cellule infiammatorie.<sup>34</sup> L'espressione di citochine proinfiammatorie è stato rilevato nei tessuti aneurismatici ed i livelli di citochine circolanti sono risultati elevati nei pazienti con AAA. Le citochine possono

regolare l'espressione delle MMPs, delle serin proteasi e delle cathepsine in modo quindi indiretto ed a livello locale le citochine possono guidare a loro volta la formazione dell'aneurisma.<sup>34</sup>

I linfociti T sono le cellule infiltranti che predominano la parete di AAA e le cellule le risposte delle Th2 sembrano essere maggiori in AAA rispetto ai pazienti con PAO. I linfociti T secernono interferone  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e interleuchina-2 (IL-2), IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), transforming growth factor-1beta (TGF-1 $\beta$ ). Gli altri tipi di cellule presenti nella parete di AAA include cellule B, cellule natural killer, mastociti, basofili, cellule endoteliali e macrofagi, i quali producono citochine Th2 correlate.

- TNF- $\alpha$

Il tumor necrosis factor è un'importante citochina utilizzata dal sistema immunitario per la comunicazione cellulare. In particolare, quando le cellule infiammatorie incontrano un'infezione, rilasciano TNF per allertare altre cellule del sistema immunitario andando ad alimentare la risposta infiammatoria.

TNF potrebbe avere un ruolo centrale nel processo di dilatazione aortica, causando apoptosi delle cellule muscolari lisce ed inducendo il rilascio di proteasi che vanno ad indebolire la matrice aortica, agendo in modo indiretto<sup>34</sup>. Nello specifico, TNF quando rilasciato dai linfociti T-helper 1 o da macrofagi attivati va a inibire in modo diretto la sintesi del collagene. Anche in questo caso sono stati costruiti dei modelli murini con delezione di TNF, portando a riduzione della formazione di aneurismi.<sup>35</sup>

Vari studi hanno rilevato un'alta concentrazione sierica di TNF nei pazienti portatori di AAA rispetto ai soggetti sani<sup>36,37</sup>, tuttavia non vi sono dati concordi per quanto riguarda la correlazione tra livelli sierici di TNF e diametro dell'aneurisma. Treska et al. hanno misurato i livelli di TNF plasmatici in un gruppo di 90 pazienti con AAA, riscontrandone bassi livelli per AAA voluminosi (>50mm) e sintomatici. Al contrario, l'espressione di TNF era aumentata per AAA di piccole dimensioni (30-50mm).<sup>36</sup> Altri autori invece non hanno riscontrato alcuna correlazione tra livelli di TNF e diametro aortico.<sup>37</sup> Per quanto riguarda la

correlazione tra livelli di TNF e tasso di crescita di AAA, non sono state riscontrati dati statisticamente significativi.<sup>38</sup> Per questi motivi ad oggi TNF- $\alpha$  non sembra essere un buon biomarker per la comprensione della patologia aortica aneurismatica. Occorre inoltre considerare che TNF non è solamente prodotto dalle cellule infiammatorie infiltranti la parete, bensì anche da altre cellule quali cellule del tessuto adiposo, creando quindi un fattore confondente nella valutazione di questo parametro.<sup>10</sup>

- IFN- $\gamma$

IFN- $\gamma$  è un'importante citochina per l'immunità innata ed adattativa contro le infezioni da agenti esterni. Ha effetti immunostimolanti ed immunomodulatori. È prodotta principalmente dalle cellule natural killer e dalle cellule Th1 per la regolazione delle cellule Th2 al fine di richiamare ulteriori cellule infiammatorie nel sito di lesione. Per quanto riguarda il suo ruolo in AAA, IFN- $\gamma$  va ad inibire la produzione di collagene da parte delle cellule muscolari lisce vascolari. Diversi studi hanno ormai dimostrato il coinvolgimento di IFN- $\gamma$  nella patogenesi di AAA e di come i suoi livelli circolanti siano riscontrati elevati.<sup>39</sup> Dal punto di vista del tasso di espansione, i livelli di IFN- $\gamma$  sono stati correlati in modo statisticamente significativo durante i primi 6 mesi di follow-up ( $P < 0.02$ ).<sup>39</sup>

Come dato eccezionale ed utile allo scopo del presente studio, alcuni autori hanno riscontrato che i livelli di IFN- $\gamma$  circolante e tissutale sembrano essere maggiormente elevati nelle donne affette da AAA rispetto ad altri gruppi di patologie del sesso femminile<sup>39</sup> ma anche rispetto agli uomini affetti da AAA.<sup>40,41</sup> Tuttavia, per verificare che questo dato sia dovuto a differenze sesso specifiche, occorreranno ulteriori studi con più alta numerosità di pazienti.

- TGF-1 $\beta$

TGF-1 $\beta$  controlla la proliferazione, la differenziazione e l'induzione di apoptosi in numerose tipologie cellulari. È inoltre un potente induttore della secrezione di cistatina C da parte delle cellule muscolari lisce vascolari e, di conseguenza, un deficit di TGF-1 $\beta$  potrebbe contribuire

alla fisiopatologia del rimodellamento della parete vascolare. In effetti, una bassa attività sistemica di TGF-1 $\beta$  è stata osservata nei pazienti affetti da AAA dal gruppo di Shi et al.<sup>42</sup>. Poco è stato studiato di questo biomarker e l'unico dato significativo è quello dato dal gruppo di Lindholt et al.<sup>28</sup> che ha riscontrato che i livelli di TGF-1 $\beta$  non vanno a correlare col tasso di progressione di AAA (r=0.001 e P=0.999).

- Interleuchine

Le interleuchine sono un vasto gruppo di citochine (da IL-1 a IL-17) prodotte dalle cellule T, dai fagociti mononucleati e da altre cellule tissutali. Svolgono una vasta varietà di funzioni ma sono soprattutto coinvolte nello stimolare le cellule a dividersi e a differenziarsi. Ogni interleuchina agisce su un dato gruppo di cellule che possiede i recettori di superficie specifici per quella IL (anche se alcune IL hanno target sovrapposti).<sup>34</sup> Diverse IL sono state testate per la loro correlazione con AAA, con le dimensioni di AAA e con la sintomatologia di AAA. Ad esempio Treska et al.<sup>36</sup> hanno riscontrato che le concentrazioni di **IL-1 $\beta$** , di **IL-2** e di **IL-6** sono significativamente più elevate in pazienti con AAA rispetto ai controlli sani, mentre i livelli di IL-8 sono risultati simili. Nel medesimo studio, è stato riscontrato un trend tra livelli circolanti di IL-8 ed aumento del diametro di AAA, mentre non è stato possibile correlare la sintomatologia di AAA con alcun livello specifico di interleuchine.

La maggior parte degli studi si è concentrata sul ruolo di IL-1 $\beta$  e di IL-6.

**IL-1 $\beta$**  è un importante mediatore della risposta infiammatoria in quanto coinvolto in numerose attività cellulari come sopra descritto ed il suo aumento è causa di numerose patologie autoinfiammatorie. In letteratura si ritrovano vari studi che riportano aumenti di IL-1 $\beta$  sia a livello circolante che a livello tissutale in pazienti con AAA rispetto ai controlli sani.<sup>38,41</sup>

In uno di questi studi, inoltre, i livelli di IL-1 $\beta$  sono stati riscontrati ugualmente alti sia in pazienti con piccoli che con grandi aneurismi, a suggerire che il processo infiammatorio IL-1 $\beta$ -mediato sia presente sia negli stadi precoci che in quelli avanzati di patologia.<sup>38</sup> Questo

gruppo, tuttavia, non ha riscontrato correlazione tra livelli di IL-1 $\beta$  e progressione della patologia aneurismatica.

**IL-6** appare essere la principale citochina consistentemente associata con AAA: in modelli in vitro la sua secrezione avviene in livelli maggiormente elevati in AAA rispetto ai controlli sani ed ai pazienti con PAO.<sup>37</sup> Questo dato è stato confermato dagli studi in vivo dosando IL-6 circolante, con livelli elevati in AAA rispetto ai controlli.<sup>36</sup>

Anche IL-6 è stata studiata su modelli murini ed il gruppo di Sun et al.<sup>43</sup> ha riportato che in soggetti con AAA elastasi indotto il livello di IL-6 risultava elevato, mentre in modelli con deficit di IL-6 la formazione di AAA veniva soppressa data la riduzione dell'infiammazione e l'aumento della conservazione di elastina e collagene.

Un dato interessante riguardante questo marker è dato dal fatto che i livelli baseline di IL-6 sembrano crescere al crescere del diametro aortico sia in soggetti con AAA che in soggetti sani: questi dati suggeriscono che IL-6 potrebbe svolgere un ruolo nei processi patogenetici precoci della dilatazione aortica.<sup>44,45</sup> Il gruppo di lavoro di Dawson et al.<sup>44</sup> inoltre si è concentrato molto sul ruolo di questa citochina in AAA, mostrando dei dati interessanti sull'autoalimentazione del processo infiammatorio aneurismatico: infatti i livelli di IL-6 sono stati correlati con la superficie dell'aneurisma e, dato che la parete aneurismatica stessa va a produrre IL-6, questo causa un aumento di IL-6 nel plasma in un processo di fatto ridondante. La cosa ancor più interessante è che i livelli di IL-6 riscontrati da questo gruppo non sono correlati solamente all'infiammazione sistemica bensì all'aneurisma stesso.<sup>45</sup> Questo dato viene tuttavia stroncato dal gruppo di studio di Jones et al. che non ha riscontrato correlazione tra IL-6 e tasso di espansione di AAA in un gruppo di 466 pazienti (vs 27 pazienti nel precedente studio), dato confermato anche dal gruppo di Flondell-Sitè e da Treska et al.<sup>34,36</sup>  
46Sebbene dunque IL-6 sia un importantissimo fattore concorrente nella patogenesi di AAA, appare al momento non utile come biomarker per il follow up di AAA.

I miRNA rappresentano una parte della trascrittomica che negli ultimi anni sta assumendo sempre più importanza, in quanto solo di recente è stato analizzato il loro possibile ruolo nella patogenesi e nella regolazione di alcune condizioni cliniche. Con i significativi progressi nella tecnologia dei microarray per i miR ad oggi, numerosi set di miRNA sono stati riscontrati essere elevati o specificatamente espressi nei tessuti aortici con particolari date funzioni.

Numerosi sono i miRNA descritti in letteratura correlabili ad AAA in letteratura. Recentemente, il gruppo greco di Tasopoulou et al.<sup>47</sup> ha effettuato una review sulla letteratura in inglese dei miRNA attualmente studiati ed implicati in AAA: nello studio sono stati inclusi 25 report (dal 2012 al 2022) per un totale di 1259 pazienti con AAA. Al termine della review sono stati presi in considerazione i miRNA presenti in più di due articoli: miR-15, miR-24, miR-29, miR-33, miR-125, miR-133, miR-145, miR-191 e let-7. Questi miR sono implicati in noti meccanismi patogenetici di AAA come l'aterosclerosi, switch fenotipico ed apoptosi delle cellule muscolari lisce, infiammazione vascolare, degradazione della ECM, metabolismo lipidico.

#### miR-15

Quando si prende in considerazione miR-15, si prende in considerazione in realtà una famiglia di miRNA composta da 6 mi-R (miR-15a, miR-15b, miR-16-1, miR-16-2, miR-195, miR-497) dislocati su 3 separati cromosomi. Questo gruppo di miR è implicato del remodelling del collagene e del silenziamento postnatale dell'elastina.<sup>48</sup> Per studiare quale sia l'effettivo ruolo del cluster miR-15 sono stati costruiti dei modelli murini di AAA ed è risultato essere significativo l'effetto di miR-195. Per studiare poi l'effettivo contributo di questo miR in AAA, sono stati somministrati degli antagomiRs sempre in modelli animali: la soppressione di miR-195 ha portato ad elevate espressioni di elastina e collagene, senza però andare ad impattare su quello che è il diametro aortico del modello.

48

È stato quindi successivamente studiato il modello in vivo di miR-195, mettendo a confronto il siero di 22 pazienti con AAA vs 22 controlli sani, trovando un'associazione inversa significativa tra livelli di mi-R-195 e la presenza di AAA e col diametro aortico.<sup>48</sup> Tutto questo può essere spiegato dal fatto

che la soppressione di miR-195 va ad indurre una overespressione delle MMPs (soprattutto MMP-2 e MMP-9), portando ad uno squilibrio dell'omeostasi della ECM.

Uno studio più recente ha rilevato anche l'overespressione di miR-15a nei pazienti con AAA rispetto ai controlli sani, ipotizzando che questo vada ad impattare sulla patogenesi di AAA: il gruppo di studio ha riscontrato che uno dei geni target di questo miR è CDKN2B, un inibitore delle chinasi ciclina-dipendente, regolatore dei processi apoptotici. L'overespressione di miR-15a è stata correlata alla soppressione dell'mRNA di CDKN2B, causando l'aumento dei processi apoptotici nelle cellule muscolari lisce vascolari, favorendo quindi il processo patogenetico di AAA.<sup>49</sup>

Tra i membri di miR-15, miR-195 sembra essere un candidabile biomarker per AAA, mentre miR-15a oltre ad essere un biomarker può anche essere un futuro target terapeutico.

#### miR-24

miR-24 fa parte del cluster miR-23b-24-27b e ne rappresenta il membro che maggiormente ha regolazione inversa sui suoi target.<sup>50</sup> miR-24 in AAA come downregolato in vari gruppi di studio nel plasma preoperatorio dei pazienti a confronto col plasma raccolto postoperatorio<sup>50,51</sup> Questo dato è stato anche confermato nel tessuto di AAA in due studi, mentre vi è anche uno studio che presenta up-regolazione di miR-24 nel tessuto aortico<sup>52</sup>. La spiegazione del meccanismo d'azione di miR-24 è stata proposta da Maegdefessel et al.<sup>50</sup>, dimostrando che miR-24 abbia come target la chitinasi 3 like-1 (CHI3L1), una proteina associata con varie patologie vascolari. In questo studio è stato dimostrato come un aumento dell'espressione di miR-24, causi una diminuzione dell'espressione di CHI3L1 e diminuisca lo sviluppo di AAA. Inoltre, questo miR interagisce con numerosi geni, incluso quello della MMP-14, come spiegato sopra, enzima coinvolto nella degradazione della ECM: miR-24 quando downregolato va ad aumentare l'espressione di MMP-14, innescando quindi la degradazione della ECM e favorendo quindi la formazione di AAA.<sup>50,52,53</sup>

#### miR-29

Anche miR-29 al pari di miR-15 rappresenta una famiglia di 3 miR: miR-29a, miR-29b, miR-29c. Questo cluster di miR è upregolato in AAA sia nel siero che nel tessuto.<sup>52,53</sup> Nei topi con AAA trattati

con antagomiR-29b è stata osservata una diminuzione del diametro aortico.<sup>48</sup> Dal punto di vista del meccanismo d'azione, è stato osservato che l'inibizione di miR-29b porta alla upregolazione della produzione di elastina, aumenta la deposizione del collagene e sopprime l'attività di MMP, andando quindi presumibilmente a ridurre la dilatazione aortica.<sup>48</sup>

### miR-33

Quando ci si riferisce a miR-33, ci si riferisce ad una famiglia di precursori di miRNA, processati successivamente dall'enzima dicer in forma matura. Di questa famiglia nell'uomo fanno parte miR-33a e miR-33b. Negli esosomi plasmatici di pazienti con AAA miR-33 appare upregolato, mentre per quanto riguarda la sua regolazione nel tessuto aortico, è stato osservato un aumento statisticamente significativo nella regolazione rispetto ai soggetti sani ( $P < 0.01$ ).<sup>53</sup> E' stato riscontrato inoltre che l'espressione di miR-33 è stata identificata nella parete del corpo di AAA e non nel colletto.<sup>54</sup> A conferma della correlazione tra miR-33 e formazione di AAA ci vengono ancora una volta in aiuto i modelli murini: Yamasaki et al.<sup>55</sup> hanno rilevato che la formazione di AAA è soppressa in topi con deficit di miR-33 a confronto con i soggetti wild type e i loro dati ci dicono anche che miR-33a e miR-33b possono essere dei target terapeutici per il trattamento di AAA (su modelli in vitro).<sup>55</sup> miR-33 va ad agire sulla regolazione dei monociti e dei macrofagi: i modelli knockout per miR-33 è stato associato a minor accumulo di macrofagi e minor espressione della proteina chemotattica dei monociti a livello della parete aortica, in associazione a minor espressione dei livelli sierici di MMP-9. Come dato accessorio, miR-33 ha anche effetto pro-aterosclerotico, inibendo l'espressione di ABCA1, una proteina regolatrice dell'omeostasi dei fosfolipidi e del colesterolo cellulare: questo limita l'efflusso di colesterolo a apolipoproteina A1 e riducendo il livello circolante di HDL.<sup>55</sup>

### miR-125

La famiglia di miR-125 è composta da miR-125a e miR-125b ed è coinvolta nella differenziazione cellulare, nella proliferazione e nell'apoptosi, andando a regolare gli mRNA delle proteine correlate a queste funzioni. Unico dato interessante in letteratura riguardante questo miR è che la upregolazione

di miR-125 favorisce la rapida crescita di AAA, soprattutto in modelli dove miR è correlato a fumo attivo e alla presenza di miR-335 ( $P < 0.001$ ).<sup>56</sup>

### miR-133

La famiglia di miR-133 è composta da miR-133a-1, miR-133a-2, miR-133b. E' espresso nel tessuto muscolare e la sua espressione è repressa nei geni non muscolari.

Nei tessuti di AAA, miR-133a e miR-133b sono downregolati, così come nel siero-plasma di questi pazienti, rispetto ai controlli sani e, inoltre, miR-133 è downregolato nel siero di campioni prelevati preoperatoriamente, con una differenza significativa rispetto a campioni prelevati dopo intervento chirurgico. Dal punto di vista patogenetico, è stato osservato che questo gruppo di miR è coinvolto nei processi apoptotici delle cellule muscolari lisce vascolari.<sup>57</sup> E' anche coinvolto nella regolazione dell'omeostasi della matrice cellulare in quanto presenta come geni target quelli che regolano il collagene e va anche a regolare MMP-14.<sup>52</sup>

### miR-145

miR-145 è un singolo miRNA che ha un ruolo significativo nel destino delle cellule vascolari progenitrici multipotenti, dirigendo la differenziazione verso cellule muscolari lisce cardiache e vascolari. Questo miR si ritrova abbondantemente nella parete vascolare arteriosa; tuttavia, in condizioni patologiche quali AAA, è stato notato un calo nella concentrazione di parete di miRNA-145. La downregolazione di miR-145 è stata riscontrata in altre patologie vascolari inclusa la dissezione dell'aorta toracica e l'aneurisma dell'aorta toracica. Dal punto di vista della funzione biologica di questo miR, i dati in letteratura non ci danno un meccanismo meglio precisato, anche se è stato ormai visto che vada a regolare e ad accendere la differenziazione delle cellule muscolari lisce e ad inibirne la proliferazione. Potrebbe anche andare a contribuire alla disfunzione della ECM andando ad indebolire la parete vasale, con probabile azione su MMP-2.<sup>58</sup>

miR-145 pertanto può essere utilizzato come marker per AAA ma occorrono ulteriori studi per meglio comprenderne il meccanismo d'azione.

### miR-191

Per quanto concerne questo miR, non vi sono molti dati in letteratura sui loro meccanismi patogenetici; tuttavia, vi sono vari studi che hanno mostrato come miR-191 sia effettivamente coinvolto in AAA. In particolare, da vari gruppi è stata riscontrata un'overespressione di questo miR nei pazienti con AAA a confronto con soggetti sani. In un modello in vitro un gruppo è andato a replicare quelli che possono essere gli effetti di miR-191 sulle cellule vascolari endoteliali: è stato rilevato un possibile ruolo sull'omeostasi della matrice extracellulare e sulla stimolazione delle MMP. L' aneurisma è una dilatazione segmentale, che comprende l'intera parete del vaso, con un aumento di almeno il 50% del diametro originale.<sup>59,60</sup>

Il processo fisiopatologico responsabile dello sviluppo dell' aneurisma è caratterizzato dal coinvolgimento dell'intera parete arteriosa (tonaca intima, media ed avventizia).

La regione addominale è il più comune sito di sviluppo degli aneurismi aortici. In base all'interessamento dei vasi renali e splancnici da parte dell'aneurisma, questo può essere definito<sup>61</sup>:

- **Infrarenale o sottorenale**  
origina sotto l'emergenza delle arterie renali.
- **Iuxtarenale**  
l'aneurisma è caratterizzato da un colletto prossimale <5 mm dall'emergenza delle arterie renali.
- **Pararenale**  
coinvolge nella sua origine e sviluppo almeno una delle arterie renali
- **Soprarenale o viscerale**  
coinvolgere i vasi del circolo celiaco-mesenterico

Nonostante la patologia aneurismatica possa interessare ciascun vaso del sistema arterioso, circa l'80%<sup>3</sup> degli aneurismi interessa il segmento sottorenale dell'aorta addominale. La prevalenza e l'incidenza dell' AAA sono diminuite negli ultimi 20 anni<sup>62-63</sup>, e questo sembra essere attribuito parzialmente al declino della abitudine tabagica. Nel 1990 la prevalenza globale nei soggetti

di 75-79 anni era di 2423 casi per 100,000 abitanti, mentre nel 2010 i casi erano 2275 ogni 1000,000 e l'incidenza è calata sia nei paesi in via di sviluppo che nei paesi industrializzati<sup>17</sup>. La prevalenza odierna varia dal 4 % all'8% negli studi di screening per oggetti tra i 65 e 80 anni<sup>64,65</sup>.

La formazione di aneurismi può essere conseguenza di processi degenerativi, di difetti congeniti e/o genetici, di patologie infiammatorie (di origine infettiva e non) o di fattori meccanici\traumatici che coinvolgono le tonache dell'aorta.

Sebbene i processi alla base della patologia possano differire tra di loro, il risultato finale è lo stesso progressiva dilatazione fino alla possibile rottura.

La crescita di un aneurisma è dipendente dalle dimensioni dell'aneurisma stesso, come descritto dalla legge di Laplace, per cui maggiore è il diametro maggiore sarà il tasso di crescita<sup>61</sup>.

L'approccio al trattamento dell'AAA varia sensibilmente a seconda delle caratteristiche del paziente e dell'aneurisma. È da valutare un approccio conservativo attraverso terapia medica e comportamentale, o un trattamento chirurgico attraverso due metodiche differenti: la sostituzione del tratto aneurismatico con una protesi attraverso l'approccio *chirurgico open*, oppure l'esclusione della sacca aneurismatica mediante l'approccio endovascolare *EVAR*.

La procedura EVAR offre anche ai pazienti non candidabili alla chirurgia open per via delle loro comorbidità una valida alternativa<sup>66,67</sup>.

È stato visto che la mortalità perioperatoria negli studi equivale all'1,3% nel gruppo endovascolare e 4,7% nel gruppo chirurgico, secondo una recente metanalisi. Questa differenza tuttavia non si mantiene durante il follow-up e, oltre i due anni, non vi è un significativo dislivello tra le due tecniche in termini di mortalità complessiva e mortalità aneurisma-correlata. I pazienti trattati con l'approccio endovascolare mostrano un più alto tasso di reintervento e di rottura aneurismatica nel corso del follow-up<sup>68</sup>.

## TECNICA CHIRURGICA OPEN

Esistono due tipi di accessi chirurgici per esporre l'aorta addominale:

- Transperitoneale

Al paziente posto supino sul letto operatorio si effettua una incisione laparotomica longitudinale *mediana* (o paramediana) o, più raramente, *trasversa*.

L'incisione mediana xifo-pubica, attraverso la linea alba, è quella più praticata perché consente una maggior flessibilità e un rapido accesso alla cavità peritoneale, con una miglior esposizione dei visceri e una buona visione dei vasi pelvici<sup>69</sup>. Eseguita l'incisione e superate le strutture della parete addominale, l'omento ed il colon trasverso vengono spostati cranialmente, mentre la matassa intestinale del tenue viene spostata lateralmente. Il peritoneo parietale una volta individuato viene inciso e si espone l'aorta in tutta la sua lunghezza dalla origine delle arterie renali fino alla biforcazione.

- Retroperitoneale

Si esegue posizionando il paziente in decubito laterale destro consentendo un *accesso lombotomico* sinistro. L'incisione viene effettuata dal margine laterale del muscolo retto addominale a livello ombelicale fino al margine costale della XI-XII costa<sup>70</sup>, e successivamente vengono separati i vari strati della muscolatura addominale fino ad arrivare al peritoneo, il quale, viene scollato dalle fasce muscolari e dislocato verso destra. L'esposizione dell'aorta addominale è più agevole a livello prossimale, per questo l'approccio retroperitoneale è preferito soprattutto per aneurismi pararenali e soprarenali. Tuttavia, il controllo delle arterie iliaca comune destra e renale destra sembra più difficoltoso.

## TECNICA CHIRURGICA ENDOVASCOLARE – EVAR

La terapia chirurgica endovascolare (EVAR) è un approccio mini-invasivo che costituisce un importante passo in avanti nel trattamento degli AAA. Si esegue inserendo la protesi piegata e compressa con delle guide attraverso degli accessi arteriosi, che più frequentemente sono le arterie femorali comuni. Una volta rilasciata, l'endoprotesi si espande, contrae rapporto con la parete aortica

prossimalmente e la parete dei vasi iliaci distalmente, al fine di escludere la sacca aneurismatica dal circolo sanguigno.

L'endoleak è definito come un rifornimento residuo della sacca aneurismatica dopo il posizionamento di una endoprotesi ed indica che non è avvenuta con successo l'esclusione completa della sacca dal circolo. L'endoleak è la complicanza più frequente nell'intervento EVAR e si presenta nel 20-50% dei pazienti<sup>71</sup>. La loro presenza è associata ad un aumento del rischio di espansione e rottura dell'aneurisma.

I tipi di endoleak possono essere diversi a seconda della loro origine e si distinguono in:

- Endoleak tipo I
  - Ia: inadeguato sealing prossimale
  - Ib: inadeguato sealing distale
  - Ic: occlusore iliaco

- Endoleak tipo II

Flusso retrogrado da collaterali aorto-iliaci

- IIa: Semplici, formati da un singolo vaso
- IIb: Complessi, formati da multipli vasi

Endoleak tipo III

- IIIa: da disconnessioni modulari
- IIIb: da discontinuità della parete protesica

- Endoleak tipo IV

Porosità della protesi. Si manifesta entro 30 giorni dalla procedura ed è molto raro nei device di nuova generazione.

- Endoleak tipo V o Endotension

La crescita dell'AAA è accertata ma non c'è evidenza di endoleak.

## **OBIETTIVO DELLO STUDIO**

L'obiettivo del presente studio è investigare le variazioni quantitative e qualitative degli miRNA circolanti dopo trattamento chirurgico o endovascolare degli aneurismi dell'aorta addominale sottorenale. Tale indagine ipotizza il loro coinvolgimento potenziale come predittori e bersagli terapeutici per prevenire la progressione della patologia aneurismatica in particolare dopo trattamento degli aneurismi dell'aorta addominale.

## **MATERIALI E METODI**

Lo studio si attiene ai principi etici per la ricerca medica che coinvolge i soggetti umani secondo quanto richiesto dalla revisione del 2013 della Dichiarazione di Helsinki - WMA Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects.

### **Disegno dello studio**

Studio spontaneo osservazionale prospettico di pazienti ricoverati in ospedale con diagnosi di aneurisma dell'aorta addominale candidati a trattamento endovascolare mediante posizionamento di endoprotesi o trattamento chirurgico open.

### **Soggetti**

Sono stati arruolati tutti i pazienti ricoverati e candidati ad intervento chirurgico endovascolare e trattamento chirurgico open per Aneurisma dell'aorta addominale sottorenale asintomatico dal maggio 2023 fino a settembre 2023. Lo studio ha previsto il prelievo ematico prima dell'intervento chirurgico e a distanza di 3 mesi dall'intervento chirurgico.

### **Criteri di inclusione**

- Tutti i soggetti sottoposti consecutivamente ad intervento chirurgico endovascolare con diagnosi di aneurisma dell'aorta addominale sottorenale asintomatica presso l'Azienda Ospedaliero- Universitaria di Ferrara
- Tutti i soggetti sottoposti consecutivamente ad intervento chirurgico open con diagnosi di aneurisma dell'aorta addominale sottorenale asintomatica presso l'Azienda Ospedaliero- Universitaria di Ferrara

#### Criteri di esclusione

- Età inferiore a 18 anni
- Patologie neoplastiche con aspettativa di vita inferiore a 6 mesi
- Tutti i soggetti sottoposti consecutivamente ad intervento chirurgico endovascolare con diagnosi di rottura di aneurisma dell'aorta addominale sottorenale presso l'Azienda Ospedaliero- Universitaria di Ferrara
- Tutti i soggetti sottoposti consecutivamente ad intervento chirurgico endovascolare con diagnosi di aneurisma dell'aorta addominale soprarenale presso l'Azienda Ospedaliero- Universitaria di Ferrara
- Tutti i soggetti sottoposti consecutivamente ad intervento chirurgico endovascolare con diagnosi di aneurisma dell'aorta toracica presso l'Azienda Ospedaliero- Universitaria di Ferrara

#### MATERIALE BIOLOGICO

E' stato effettuato un prelievo di siero e plasma (2 vacutainer per siero e 2 vacutainer contenente EDTA per la raccolta di plasma e cellule del sangue)

I campioni raccolti sono stati utilizzati per:

- I campioni di siero e plasma saranno utilizzati per dosare proteine circolanti e microRNA

- Ricerca della presenza e quantificazione di esosomi, microRNA mediante tecniche di biologia molecolare (RT-qPCR).
- Ricerca della presenza e quantificazione di biomarcatori mediante tecniche di biologia molecolare (RT-qPCR).
- Valutazione dell'espressione genica mediante real Time PCR di array relativi a miRNA, long non coding RNA, RNA circolanti, epigenetica

**MATERIALI BIOLOGICI** In tutti i casi è stato prelevato un campione di sangue da un accesso venoso e trasportato in due provette da 5 ml di EDTA. I campioni sono stati utilizzati per analizzare gli esosomi circolanti e i microRNA. Il campione di sangue è stato principalmente ottenuto sei ore prima dell'intervento chirurgico e dopo 3 mesi. I dati di laboratorio sono stati inseriti in un foglio Excel dedicato e le informazioni sono state associate al numero assegnato a ciascun paziente.

#### PROTOCOLLI PER LA SEPARAZIONE DEL PLASMA

- Successiva centrifugazione a 4°C:
- Centrifuga per 10 minuti a 3500 rpm
- Raccolta del plasma e trasferimento in un eppendorf da 2 ml
- Centrifuga per 10 minuti a 3500 rpm (rotore fisso)
- Raccolta del plasma e trasferimento in un secondo eppendorf da 2 ml (per eliminare il componente cellulare residuo)
- Conservazione/congelamento a -80°C SEM - Microscopio Elettronico a Scansione
- Miscela 10 µl di eluato contenente esosomi + 10 ml di agente fissante.
- Pipetta su un vetrino da 13 mm
- Asciugatura durante la notte sotto cappa aspirante
- Osservazione al microscopio elettronico

## SEQUENZA SPERIMENTALE:

- Separazione del plasma
- Separazione degli esosomi con il protocollo (Norgen's Plasma/Serum Exosome Purification and RNA Isolation Maxi Kit)
- Estrazione di RNA dagli esosomi (Norgen's Plasma/Serum Exosome Purification and RNA Isolation Maxi Kit)
- Quantificazione degli esosomi (Pierce BCA protein assay kit)
- Retrotrascrizione dell'RNA ottenuto dagli esosomi (Retrotrascrizione Sensifast SYBR No-Rox Kit)
- PCR in tempo reale (qPCR) dei miRNA selezionati (SensiFast cDNA Synthesis Kit)

**RACCOLTA DATI** I dati clinici di ciascun paziente incluso nello studio verranno ottenuti dalle cartelle cliniche e raccolti in un documento Excel specifico. A ciascun paziente verrà assegnato un ID alfanumerico. Solo l'esaminatore curante conosce il collegamento tra i dati demografici e l'ID numerico.

**ANALISI STATISTICA** Il software statistico SPSS 26.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) è stato utilizzato per l'analisi dei dati. Le variabili continue dei dati sono riassunte e presentate come media  $\pm$  deviazione standard (SD) o mediana. Le variabili categoriche sono state valutate mediante test del chi-quadro. L'analisi delle caratteristiche operative del ricevitore (ROC) è stata utilizzata per valutare le prestazioni diagnostiche dei potenziali microRNA.  $P < 0,05$  è stato considerato statisticamente significativo.

**GESTIONE DELLA PROCEDURA E DEL CONSENSO INFORMATO SCRITTO** Un consenso informato dedicato è stato ottenuto dai pazienti prima dell'intervento chirurgico e, con la loro approvazione, sono stati inclusi nello studio. Una copia del consenso informato è stata inclusa nella cartella clinica del paziente e un'altra è stata conservata dal principale investigatore.

**DICHIARAZIONE ETICA** Lo studio ha ottenuto l'approvazione dal Comitato Etico regionale (CE-AVEC) il 20.04.2023 ed è stato registrato con il codice CE: 310/2023/Oss/AOUFe. Questo studio è

stato condotto in conformità ai principi della Buona Pratica Clinica [Linee Guida Armonizzate ICH per la Buona Pratica Clinica 1996 Direttiva 91/507/CEE; D.M. 15.7.1997] e alla dichiarazione di Helsinki. Il consenso scritto è stato ottenuto dal paziente ed è disponibile su richiesta.

**RACCOLTA DATI CLINICI** I dati relativi ai pazienti sono stati ottenuti attraverso una raccolta retrospettiva consultando le cartelle cliniche ed i sistemi informatici di rete dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara: Ormaweb e SAP.

Sono stati estrapolati i seguenti dati:

- anagrafici: età al momento dell'intervento e genere;
- riguardanti i fattori di rischio preoperatori: BMI, ipertensione arteriosa, ipercolesterolemia, cardiopatia ischemica, fibrillazione atriale, BPCO, diabete, abitudine tabagica\storia di tabagismo, ICV (incidenti cerebro-vascolari), pregressa laparotomia, creatininemia preoperatoria, GFR (velocità di filtrazione glomerulare), classificazione della funzionalità renale, classe ASA (American Society of Anaesthesia score);
- relativi all'intervento: dimensioni dell'aneurisma (mm), tipo di riparazione eseguita (aorto-aortica, aorto-iliaca, aorto-bisiliaca), tipo di endoprotesi posizionata, accesso vascolare utilizzato per la procedura EVAR, eventuale embolizzazione della sacca aneurismatica, embolizzazione delle arterie ipogastriche, endoprotesi branched;
- postoperatori: unità di sangue trasfuse, complicanze postoperatorie secondo la classificazione di Clavien-Dindo<sup>236</sup>, tipo di complicanza, tipo di complicanza legata agli accessi, insufficienza renale acuta, creatininemia a 48h dall'intervento, GFR postoperatoria, eventuale ricovero in UTI (unità terapia intensiva) e durata media della degenza in UTI, durata media della degenza ospedaliera.

A 30 giorni le complicanze considerate sono:

- polmonari
- chirurgiche
- gastrointestinali
- cardiache.

Le complicanze legate agli accessi includono:

- infezione inguinale
- deiscenza della ferita
- linfocele\linforrea
- ematoma con deiscenza della ferita.

La classificazione di Clavien-Dindo utilizzata per raccogliere le complicanze postoperatorie prevede 7 gradi:

- I: qualsiasi deviazione dal normale decorso postoperatorio che non comporti alcun trattamento farmacologico, endoscopico e di radiologia interventistica. Sono permesse terapie con antiemetici, antipiretici, analgesici, diuretici ed elettroliti. È incluso in questo grado l'infezione di ferita aperta al letto del malato;
- II: complicanza che comporti l'attuazione trattamenti farmacologici esclusi nel grado I, emotrasfusione o nutrizione parenterale;
- III: complicanza che comporti la necessità di una procedura endoscopica, chirurgica o di radiologia interventistica;
  - IIIa: interventi non in narcosi, per esempio il posizionamento di un drenaggio percutaneo sotto guida radiologica o endoscopica;
  - IIIb: interventi in narcosi, per esempio in caso di necessità di reintervento chirurgico;
- IV: complicanza che minaccia la vita del paziente e che richiede il ricovero in UTI;
  - IVa: complicanza che determini un'insufficienza di un singolo organo;
  - IVb: complicanza che determini un'insufficienza multiorgano;
- V: decesso del paziente;

NUMEROSITÀ CAMPIONARIA E ANALISI STATISTICA Le variabili saranno espresse come media  $\pm$  deviazione standard (SD) o mediana (MD) e intervalli di confidenza al 95% (IC al 95%); le variabili categoriali saranno espresse come frequenze. Le variabili continue saranno prima analizzate per la distribuzione normale usando i test di Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Le differenze tra i gruppi e la variabile di interesse saranno analizzate con l'analisi della varianza (ANOVA), con Bonferroni per l'analisi post-hoc e il test chi-quadrato per le variabili categoriali; mentre le mediane saranno confrontate con test non parametrici (Kruskal Wallis). Le correlazioni tra variabili continue saranno testate con test di correlazione di Pearson per variabili con distribuzione normale, mentre le

variabili con distribuzione non normale saranno analizzate dopo la log-trasformazione o con test non parametri ci (test di Spearman). I dati saranno descritti con il coefficiente di correlazione (r) e con il livello di significatività rispetto all'ipotesi nulla (P value). Saranno seguite l'analisi di regressione e l'analisi di regressione lineare per verificare l'indipendenza delle associazioni semplici osservate. L'analisi statistica sarà eseguita utilizzando il software SPSS 26.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) e la significatività statistica sarà impostata su un valore <0.05. Quando significativo sarà descritto anche un effetto pratico.

## RISULTATI

Nella tabella 1 vengono riportati i dati anagrafici e clinici dei pazienti appartenenti ai due gruppi di studio. 10 pazienti sono stati sottoposti a correzione di aneurisma dell'aorta addominale mediante posizionamento di endoprotesi aortica (EVAR). 12 pazienti sono stati sottoposti a correzione chirurgica dell'aorta addominale mediante tecnica open (RP). La maggior parte dei pazienti presentavano un ASA score di III. Solo 1 paziente appartenente al gruppo EVAR presentava un ASA score di IV. Non sono state rilevate differenze significative per quanto riguarda le comorbidità fra i due gruppi esaminati. Pertanto i due gruppi di pazienti sottoposti a trattamento EVAR o chirurgico open RP si sono rivelati omogenei.

| <b>Variables</b>                                     | <b>EVAR<br/>(N = 10)</b> | <b>RP<br/>(N = 12)</b> | <b><i>p value</i></b> |
|------------------------------------------------------|--------------------------|------------------------|-----------------------|
| <b>Age (y) [Mean ± SD]</b>                           | 80.1 ± 4.9               | 73.8 ± 4.2             | .002                  |
| <b>Obesity (BMI ≥ 30 Kg/m<sup>2</sup>) [N (%)]</b>   | 4 (40.0%)                | 7 (58.3%)              | .392                  |
| <b>American Society of Anaesthesia score [N (%)]</b> |                          |                        | .235                  |
| I                                                    | 0 (0.0%)                 | 0 (0.0%)               |                       |
| II                                                   | 0 (0.0%)                 | 2 (16.7%)              |                       |
| III                                                  | 10 (100%)                | 9 (75.0%)              |                       |

|                                            |            |            |      |
|--------------------------------------------|------------|------------|------|
| IV                                         | 0 (0.0%)   | 1 (8.3%)   |      |
| <b>Diabetes [N (%)]</b>                    | 2 (20.0%)  | 3 (25.0%)  | .781 |
| <b>Hypertension [N (%)]</b>                | 8 (80.0%)  | 9 (75.0%)  | .781 |
| <b>Ischemic cardiomyopathy [N (%)]</b>     | 3 (30.0%)  | 5 (41.7%)  | .571 |
| <b>COPD[N (%)]</b>                         | 3 (30.0%)  | 3 (25.0%)  | .793 |
| <b>Neoplasia [N (%)]</b>                   | 2 (20.0%)  | 2 (16.7%)  | .840 |
| <b>Hypercholesterolemia [N (%)]</b>        | 4 (40.0%)  | 9 (75.0%)  | .096 |
| <b>Smoking (current or former) [N (%)]</b> |            |            | .083 |
| No                                         | 6 (60.0%)  | 3 (25.0%)  |      |
| Current                                    | 0 (0.0%)   | 4 (33.3%)  |      |
| Former                                     | 4 (40.0%)  | 5 (41.7%)  |      |
| <b>ICV [N (%)]</b>                         | 3 (30.0%)  | 2 (16.7%)  | .457 |
| <b>Atrial fibrillation [N (%)]</b>         | 1 (10.0%)  | 0 (0.0%)   |      |
| <b>Previous laparotomy [N (%)]</b>         | 0 (0.0%)   | 1 (8.3%)   | .350 |
| <b>Popliteal aneurysm [N (%)]</b>          | 0 (0.0%)   | 0 (0.0%)   | .    |
| <b>AAA size (mm) [median (IQR 25-75)]</b>  | 56 [51-59] | 59 [51-67] | .261 |

*Tabella 1: Dati clinici dei pazienti sottoposti a trattamento dell'AAA.*

| <b>Variables</b>                          | <b>EVAR<br/>(N = 10)</b> | <b>RP<br/>(N = 12)</b> |
|-------------------------------------------|--------------------------|------------------------|
| <b>Aorto-aortic Graft [N (%)]</b>         |                          | 8 (66.7%)              |
| <b>Aorto-bisiliac Graft [N (%)]</b>       |                          | 4 (33.3%)              |
| <b>Supra/Inter-Renal Clamping [N (%)]</b> |                          | 1 (8.3%)               |
| <b>Type od Endoprosthesis [N (%)]</b>     |                          |                        |
| Gore C3                                   | 5 (50.0%)                |                        |

|                                 |           |
|---------------------------------|-----------|
| Gore Conformable                | 2 (20.0%) |
| Endurant II                     | 2 (20.0%) |
| Cook Zenith Alpha               | 1 (10.0%) |
| <b>Femoral Accesses [N (%)]</b> |           |
| Bilateral Percutaneous          | 7 (70.0%) |
| Bilateral Surgical Cutdown      | 1 (10.0%) |
| Percutaneous + Surg Cutdown     | 2 (20.0%) |
| <b>Iliac Branch [N (%)]</b>     | 0 (0.0%)  |

*Tabella 2: Dati operatori dei pazienti sottoposti a trattamento dell'AAA*

| Variable                                                               | EVAR      | RP        | <i>p value</i> |
|------------------------------------------------------------------------|-----------|-----------|----------------|
| <b>ICU admission [N (%)]</b>                                           | 0 (0.0%)  | 4 (33.3%) | .044           |
| <b>Technical Success [N (%)]</b>                                       | 10 (100%) | 12 (100%) | .              |
| <b>30 days Survival [N (%)]</b>                                        | 10 (100%) | 12 (100%) | .              |
| <b>Postoperative blood transfusion [N (%)]</b>                         | 1 (10.0%) | 4 (33.3%) | .193           |
| <b>Postoperative complications (Clavien-Dindo) &lt;30 days [N (%)]</b> |           |           | .302           |
| No complications                                                       | 1 (10.0%) | 2 (16.7%) |                |
| I                                                                      | 7 (70.0%) | 5 (41.7%) |                |
| II                                                                     | 0 (0.0%)  | 2 (16.7%) |                |
| IIIa                                                                   | 0 (0.0%)  | 0 (0.0%)  |                |
| IIIb                                                                   | 2 (20.0%) | 1 (8.3%)  |                |
| IVa                                                                    | 0 (0.0%)  | 2 (16.7%) |                |
| IVb                                                                    | 0 (0.0%)  | 0 (0.0%)  |                |
| V                                                                      | 0 (0.0%)  | 0 (0.0%)  |                |
| <b>Type of complication &lt;30 days [N (%)]</b>                        |           |           |                |
| Surgical                                                               | 2 (20.0%) | 3 (25.0%) | .781           |

|                                                 |           |             |      |
|-------------------------------------------------|-----------|-------------|------|
| Cardiac                                         | 0 (0.0%)  | 1 (8.3%)    | .350 |
| Pulmonary                                       | 0 (0.0%)  | 1 (8.3%)    | .350 |
| Gastrointestinal                                | 0 (0.0%)  | 0 (0.0%)    | .    |
| <b>AKIN stage [N (%)]</b>                       |           |             | .793 |
| 0                                               | 7 (70.0%) | 9 (75.0%)   |      |
| I                                               | 3 (30.0%) | 3 (25.0%)   |      |
| II                                              | 0 (0.0%)  | 0 (0.0%)    |      |
| III                                             | 0 (0.0%)  | 0 (0.0%)    |      |
| <b>Hospital LOS (days) [median (IQR 25-75)]</b> | 3 [2-4]   | 6.5 [5-9.5] | .003 |
| <b>30 days Survival [N (%)]</b>                 | 10 (100%) | 12 (100%)   | .    |
| <b>EL [N (%)]</b>                               |           |             |      |
| I                                               | 0 (0.0%)  |             |      |
| II                                              | 6 (66.7%) |             |      |
| III                                             | 0 (0.0%)  |             |      |
| <b>Need for early re-do [N (%)]</b>             | 0 (0.0%)  | 0 (0.0%)    | .    |
| <b>Need for late re-do [N (%)]</b>              | 0 (0.0%)  | 0 (0.0%)    | .    |
| <b>PseudoAneurysm [N (%)]</b>                   |           | 0 (0.0%)    |      |

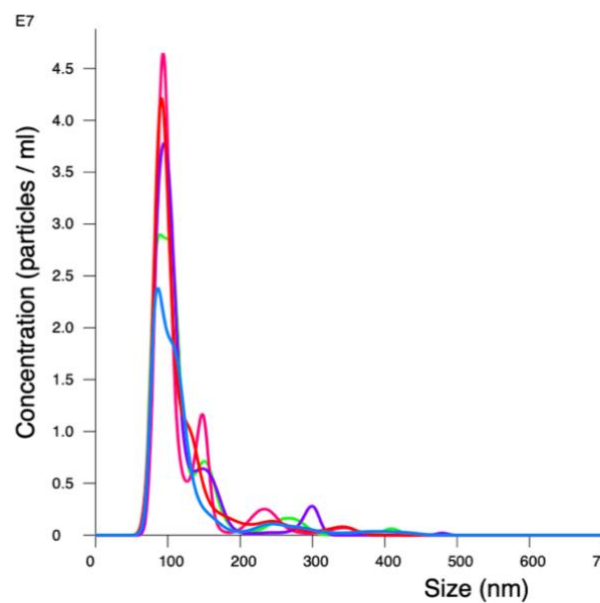
*Tabella 3: Outcome postoperatori dei pazienti sottoposti a trattamento dell'aneurisma dell'AAA.*

Si è avuto un successo tecnico in tutti i pazienti trattati. Non vi sono state differenze significative nei due gruppi per quanto riguarda complicanze postoperatorie secondo la classificazione di Clavien Dindo.

Per quanto riguarda i campioni di sangue, a tutti i pazienti è stato eseguito un prelievo ematico prima dell'intervento chirurgico e a tre mesi dallo stesso. Gli esosomi sono stati separati dal plasma e la quantificazione è stata eseguita utilizzando il protocollo descritto dal kit per il dosaggio delle proteine BCA (Pierce BCA protein assay kit).

Purtroppo, due pazienti hanno abbandonato lo studio ed un paziente appartenente al gruppo EVAR è deceduto.

La presenza degli esosomi è stata confermata dalla scansione al microscopio elettronico (SEM) . Su questi esosomi è stata eseguita l'analisi dei miRNA stabili.



*Fig 1: Analisi delle dimensioni degli esosomi circolanti isolati.*

Dalla Fig 1 si evince un'analisi delle dimensioni degli Esosomi circolanti isolati da sangue raccolti nei due tempi. Come si vede la distribuzione è omogenea confermando una dimensione media tra gli 80 e i 120 nm.

miRNA  
 hsa-let-7b-5p  
 hsa-let-7c-5p  
 hsa-let-7d-5p  
 hsa-let-7f-5p  
 hsa-let-7g-5p  
 hsa-let-7i-5p  
 hsa-miR-101-3p  
 hsa-miR-103a-3p  
 hsa-miR-10a-5p  
 hsa-miR-125a-5p  
 hsa-miR-125b-5p  
 hsa-miR-1268a  
 hsa-miR-128-3p  
 hsa-miR-130a-3p  
 hsa-miR-148a-3p  
 hsa-miR-148b-3p  
 hsa-miR-151a-3p  
 hsa-miR-152-3p  
 hsa-miR-16-5p  
 hsa-miR-181a-5p  
 hsa-miR-181b-5p

hsa-miR-191-5p  
 hsa-miR-196b-5p  
 hsa-miR-20a-5p  
 hsa-miR-23a-3p  
 hsa-miR-24-3p  
 hsa-miR-25-3p  
 hsa-miR-26a-5p  
 hsa-miR-296-3p  
 hsa-miR-29a-3p  
 hsa-miR-301a-3p  
 hsa-miR-335-5p  
 hsa-miR-342-3p  
 hsa-miR-34a-5p  
 hsa-miR-361-5p  
 hsa-miR-378a-3p  
 hsa-miR-423-3p  
 hsa-miR-424-5p  
 hsa-miR-532-5p  
 hsa-miR-744-5p  
 hsa-miR-92a-3p  
 hsa-miR-93-5p  
 hsa-miR-9-3p  
 hsa-miR-9-5p  
 hsa-miR-99a-5p  
 hsa-miR-99b-5p

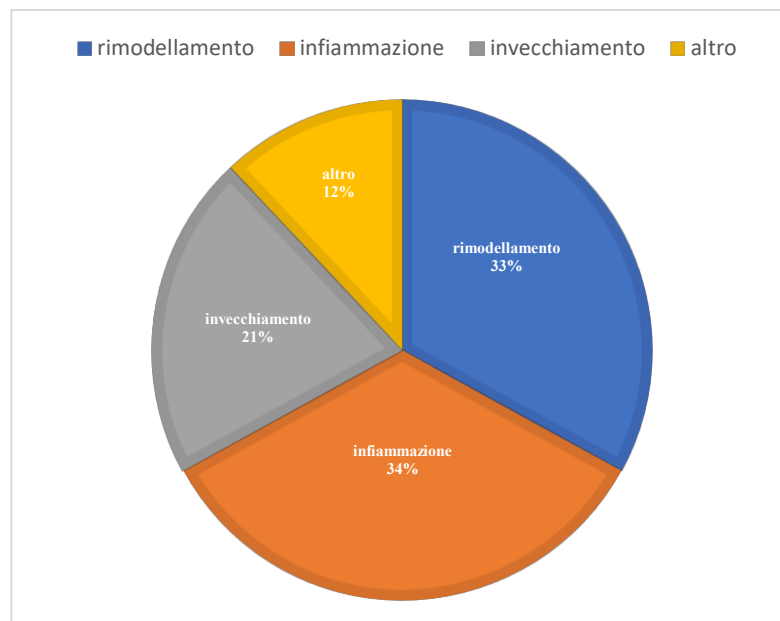


Figure 2. Funzione dei miRNA caratterizzate con miRNet software.

Gli esosomi sono stati analizzati per il loro contenuto in miRNA. I dati hanno evidenziato una grandissima variabilità sia tra campioni dello stesso gruppo che tra campioni diversi. Si è proceduto ad effettuare una analisi raggruppandoli per macro aree di funzione evidenziando come le principali aree in cui i miRNA vanno ad agire sono il rimodellamento (33%), l'infiammazione (34%) e i processi di invecchiamento cellulare (21%). Non si è avuta una variazione significativa dei miRNA valutati nei campioni ematici pre e postoperatori.

Probabilmente il secondo tempo di prelievo scelto è ancora troppo a ridosso dell'intervento e dunque i processi di rigenerazione tissutale sono ancora nel pieno della fase infiammatoria .

## **DISCUSSIONE:**

Il rimodellamento aortico rappresenta un processo cruciale nell'insorgenza e nella progressione degli aneurismi dell'aorta addominale (AAA). Questo fenomeno comporta modificazioni strutturali significative nella parete aortica, che a loro volta influenzano la composizione della matrice extracellulare e innescano risposte infiammatorie locali. In questo contesto, i microRNA (miRNA) emergono come regolatori fondamentali di tali processi.

La matrice extracellulare (ECM) svolge un ruolo essenziale nell'integrità strutturale e nella funzione della parete aortica. Le molecole della matrice, come elastina e collagene, forniscono supporto strutturale e contribuiscono alla resistenza della parete vascolare. Nel corso degli AAA, si verificano alterazioni nella composizione della matrice extracellulare, con una diminuzione del collagene e la perdita di elastina. Questi cambiamenti possono portare a un indebolimento della parete aortica e alla formazione dell'aneurisma.

I microRNA (miRNA) sono una classe di molecole di RNA di piccole dimensioni, composte da circa 22 nucleotidi, che svolgono un ruolo chiave nella regolazione dell'espressione genica a livello post-trascrizionale. La loro principale funzione è legarsi a specifici mRNA, interferendo con la loro traduzione o accelerandone il degrado. I miRNA possono influenzare una vasta gamma di processi biologici, inclusi quelli coinvolti nelle malattie cardiovascolari come gli AAA.

Il legame tra esosomi e microRNA (miRNA) rappresenta un intricato meccanismo di comunicazione intercellulare che riveste un ruolo fondamentale nei processi biologici e patologici. Gli esosomi sono piccole vescicole extracellulari rilasciate dalle cellule e contengono una varietà di molecole biologicamente attive, tra cui miRNA.

I miRNA sono molecole di RNA non codificante che regolano l'espressione genica post-trascrizionale. Gli esosomi, veicoli di trasporto intercellulare, possono trasferire miRNA da una

cellula all'altra, influenzando così la fisiologia e la patologia dell'organismo. Questo processo è coinvolto in diversi aspetti della biologia cellulare, tra cui lo sviluppo, la risposta immunitaria, e la progressione di malattie.

Il trasferimento di miRNA tramite gli esosomi può avvenire in modo selettivo e regolare. Le cellule possono rilasciare esosomi contenenti specifici miRNA che, una volta assorbiti da cellule bersaglio, influenzano la loro espressione genica. Questo meccanismo di comunicazione mediato da esosomi è coinvolto in molteplici processi fisiologici, inclusa la regolazione dell'omeostasi cellulare e la risposta a stimoli ambientali.

Negli ambiti patologici, l'interazione tra esosomi e miRNA gioca un ruolo rilevante. Ad esempio, nei tumori, gli esosomi possono trasferire miRNA che favoriscono la proliferazione cellulare, l'angiogenesi e la metastasi. Questo fenomeno può contribuire alla diffusione della malattia e alla sua resistenza alle terapie convenzionali.

Negli AAA, il rimodellamento aortico è un processo complesso che coinvolge cambiamenti nella struttura e nella composizione della parete aortica. Questo rimodellamento può portare alla progressiva dilatazione dell'aorta, mettendo a rischio la sua integrità strutturale e aumentando il rischio di rottura. I miRNA sono stati identificati come modulatori critici di diversi aspetti di questo processo.

Ad esempio, il miR-29 è stato identificato come un miRNA chiave nel controllo della sintesi del collagene. La sua riduzione può contribuire all'abbassamento dei livelli di collagene, facilitando così il processo di degradazione della matrice extracellulare. Altri miRNA, come il miR-21 e il miR-155, sono stati associati all'infiammazione e possono influenzare la risposta infiammatoria locale nella parete aortica.

L'identificazione dei miRNA coinvolti nei processi di rimodellamento aortico negli AAA fornisce un'importante prospettiva per comprendere la patogenesi di queste patologie vascolari. L'analisi dei profili di espressione dei miRNA potrebbe aprire nuove vie diagnostiche e terapeutiche, consentendo la progettazione di strategie mirate per intervenire nei processi di rimodellamento e infiammazione, con l'obiettivo di rallentare o prevenire la progressione degli AAA.

In questo studio, abbiamo eseguito una mappatura degli miRNA prima e dopo il trattamento di aneurismi dell'aorta addominale mediante tecnica endovascolare e chirurgica open tradizionale. Questi sono miRNA circolanti che possono essere facilmente quantificati e potrebbero essere candidati promettenti per la prossima generazione di biomarcatori che potrebbero essere utilizzati per l'identificazione precoce e non invasiva dei pazienti di sviluppare un aneurisma dell'aorta addominale. Come dimostrato nei nostri modelli di arricchimento delle vie, gli miRNA testati sono correlati alle vie dell'invecchiamento, del rimodellamento vascolare e dell'infiammazione. In particolare, la via dell'invecchiamento è principalmente influenzata dallo stress ossidativo e dall'infiammazione, che portano le cellule alla senescenza e promuovono così molte malattie cardiovascolari.

Inoltre, sono necessari ulteriori sforzi prima che gli miRNA circolanti possano essere efficacemente misurati come biomarcatori di malattie nell'ambito clinico e nel monitoraggio post trattamento della patologia aneurismatica aortica. Il nostro studio suggerisce che specifici miRNA potrebbero essere considerati come biomarcatori predittivi per lo sviluppo della patologia aneurismatica aortica. Nonostante ciò, sono necessari ulteriori progressi prima che gli miRNA circolanti possano essere efficacemente misurati come biomarcatori e molte questioni sono legate alla logistica e ai metodi di rilevazione strumentale affidabili.

Inoltre Probabilmente il secondo tempo di prelievo post operatorio scelto è ancora troppo a ridosso dell'intervento e dunque i processi di rigenerazione tissutale sono ancora nel pieno della fase

infiammatoria. In considerazione di ciò, dovremmo valutare l'espressione di specifici miRNA in un periodo di tempo più esteso rispetto ai tre mesi post-operatori per comprenderne appieno il significato nella modulazione dei processi di rimodellamento tissutale. Sebbene i tre mesi possano offrire un'istantanea informativa sulla fase infiammatoria, potrebbe essere vantaggioso estendere l'analisi a un periodo più lungo, consentendo così di cogliere le sfumature più sottili dei processi di rimodellamento tissutale nel contesto delle patologie aneurismatiche aortiche. Pertanto per individuare specifici marcatori utili alla diagnosi e al controllo evolutivo della patologia aneurismatica sono necessari studi condotti su un numero più elevato di pazienti e con un periodo di valutazione più prolungato.

## **CONCLUSIONI**

La regolazione dei miRNA potrebbe rappresentare un'efficace strategia per prevenire lo sviluppo e la progressione della patologia aneurismatica. Sono necessari ulteriori studi per comprendere i meccanismi coinvolti e sviluppare strategie terapeutiche mirate che possano tradursi in benefici clinici significativi. Pertanto dovremmo valutare l'espressione di specifici miRNA post operatori in un periodo di tempo più esteso per comprenderne appieno il significato nella modulazione dei processi di rimodellamento vascolare



## BIBLIOGRAFIA

- 1- Anders Wanhainen a,y,\*, Fabio Verzini a,y, Isabelle Van Herzele a, Eric Allaire a, Matthew Bown a, Tina Cohnert a, Florian Dick a,Joost van Herwaarden a, Christos Karkos a, Mark Koelemay a, Tilo Kölbel a, Ian Loftus a, Kevin Mani a, Germano Melissano a,Janet Powell a, Zoltán Szeberin a. Editor's Choice e European Society for Vascular Surgery (ESVS) 2019 Clinical Practice Guidelines on the Management of Abdominal Aorto-iliac Artery Aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg* (2019) 57, 8e93
- 2- Johnston KW, Rutherford RB, Tilson MD, Shah DM, Hollier L, Stanley JC. Suggested standards for reporting on arterial aneurysms. Subcommittee on Reporting Standards for Arterial Aneurysms, Ad Hoc Committee on Reporting Standards, Society for Vascular Surgery and North American Chapter, International Society for Cardiovascular Surgery. *J Vasc Surg*. 1991 Mar;13(3):452-8.
- 3- Femke A M V I Hellenthal I, Willem A Buurman, Will K W H Wodzig, Geert Willem H Schurink. Biomarkers of AAA progression. Part 1: extracellular matrix degeneration. *Nat Rev Cardiol*. 2009 Jul;6(7):464-74. doi: 10.1038/nrcardio.2009.80. Epub 2009 May 26.
- 4- Daugherty, A. & Cassis, L. A. Mouse models of abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 24, 429–434 (2004).
- 5- Mark A. Deeg, C. Arnoud Meijer, Lai Shan Chan, Lei Shen & Jan H. N. Lindeman (2016) Prognostic and predictive biomarkers of abdominal aortic aneurysm growth rate, *Current Medical Research and Opinion*, 32:3, 509-517, DOI: 10.1185/03007995.2015.1128406
- 6- Lindholt JS, Jørgensen B, Fasting H, Henneberg EW. Plasma levels of plasmin-antiplasmin-complexes are predictive for small abdominal aortic aneurysms expanding to operation-recommendable sizes. *J Vasc Surg*. 2001;34:611–615.
- 7- Groeneveld ME, Meekel JP, Rubinstein SM, Merkestein LR, Tangelder GJ, Wisselink W, Truijers M, Yeung KK. Systematic review of circulating, biomechanical, and genetic markers for the prediction of abdominal aortic aneurysm growth and rupture. *J Am Heart Assoc*. 2018;7:e007791. DOI: 10.1161/JAHA.117.007791.
- 8- Satta J, Haukipuro K, Kairaluoma MI, Juvonen T. Aminoterminal propeptide of type III procollagen in the follow-up of patients with abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 1997;25:909–915.
- 9- Abdul-Hussien, H. et al. Collagen degradation in the abdominal aneurysm: a conspiracy of matrix metalloproteinase and cysteine collagenases. *Am. J. Pathol*. 170, 809–817 (2007).
- 10- D N Moris I, S E Georgopoulos. Circulating biomarkers for abdominal aortic aneurysm: what did we learn in the last decade?. *Int Angiol*. 2013 Jun;32(3):266-80.
- 11- J S Lindholt I, B Jørgensen, N A Klitgaard, E W Henneberg. Systemic levels of cotinine and elastase, but not pulmonary function, are associated with the progression of small abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2003 Oct;26(4):418-22. doi: 10.1016/s1078-5884(03)00177
- 12- Lindholt, J. s., Jorgensen, B., Fasting, H. & Henneberg, e. w. Plasma levels of plasmin-antiplasmin-complexes are predictive for small abdominal aortic aneurysms expanding to operation-recommendable sizes. *J. Vasc. Surg*. 34, 611–615 (2001)
- 13- MemonAA,ZarroukM,A gren-WitteschusS,SundquistJ,GottsäterA, Sundquist K. Identification of novel diagnostic and prognostic bio- markers for abdominal aortic aneurysm. *Eur J Prev Cardiol* 2020;27:132–42
- 14- Lindholt JS, Jørgensen B, Shi GP, Henneberg EW. Relationships between activators and inhibitors of plasminogen, and the progression of small abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2003;25:546–551
- 15- J M Reilly I, G A Sicard, C L Lucore. Abnormal expression of plasminogen activators in aortic aneurysmal and occlusive disease. *J Vasc Surg*. 1994 May;19(5):865-72. doi: 10.1016/s0741-5214(94)70012-5
- 16- Adam DJ, Haggart PC, Ludlam CA, Bradbury AW. Hemostatic markers before operation in patients with acutely symptomatic nonruptured and ruptured infrarenal abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg*. 2002;35:661–665.
- 17- Hobbs SD, Haggart P, Fegan C, Bradbury AW, Adam DJ. The role of tissue factor in patients undergoing open repair of ruptured and nonruptured abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 2007;46:682–686.
- 18- Skagius E, Siegbahn A, Bergqvist D, Henriksson AE. Fibrinolysis in patients with an abdominal aortic aneurysm with special emphasis on rupture and shock. *J Thromb Haemost*. 2008;6:147–150.
- 19- Jiusong Sun I, Galina K Sukhova, Jie Zhang, Han Chen, Sara Sjöberg, Peter Libby, Mingcan Xia, Na Xiong, Bruce D Gelb, Guo-Ping Shi. Cathepsin K deficiency reduces elastase perfusion-induced abdominal aortic aneurysms in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 Jan;32(1):15-23. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.235002. Epub 2011 Aug 4.
- 20- Jiusong Sun I, Galina K Sukhova, Jie Zhang, Han Chen, Sara Sjöberg, Peter Libby, Meixiang Xiang, Jianan Wang, Christoph Peters, Thomas Reinheckel, Guo-Ping Shi. Cathepsin L activity is essential to elastase perfusion-induced abdominal aortic aneurysms in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011 Nov;31(11):2500-8. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.230201.
- 21- Abisi S, Burnand KG, Waltham M, et al. Cysteine pro- tease activity in the wall of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 2007; 46: 1260–1266.

- 22- sukhova, G. K. et al. Cystatin C deficiency increases elastic lamina degradation and aortic dilatation in apolipoprotein e-null mice. *Circ. Res.* 96, 368–375 (2005).
- 23- sakalihasan, N., Limet, r. & Defawe, O. D. Abdominal aortic aneurysm. *Lancet* 365,1577–1589 (2005).
- 24- Lindholt, J. s., erlandsen, e. J. & Henneberg, e. w. Cystatin C deficiency is associated with the progression of small abdominal aortic aneurysms. *Br. J. Surg.* 88, 1472–1475 (2001).
- 25- Wang Y, Liu CL, Lindholt JS, et al. Plasma cystatin B association with abdominal aortic aneurysms and need for later surgical repair: A sub-study of the VIVA trial. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2018; 56: 826–832
- 26- akalihasan, N., Delvenne, P., Nusgens, B. v., Limet, r. & Lapiere, C. M. Activated forms of MMP2 and MMP9 in abdominal aortic aneurysms. *J. Vasc. Surg.* 24, 127–133 (1996).
- 27- T Eugster 1, A Huber, T Obeid, I Schwegler, L Gürke, P Stierli. Aminoterminal propeptide of type III procollagen and matrix metalloproteinases-2 and -9 failed to serve as serum markers for abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2005 Apr;29(4):378-82. doi: 10.1016/j.ejvs.2004.12.007. Epub 2005 Jan 12.
- 28- Lindholt, J. s., vammen, s., Fasting, H., Henneberg, e. w. & Heickendorff, L. The plasma level of matrix metalloproteinase 9 may predict the natural history of small abdominal aortic aneurysms. A preliminary study. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 20, 281–285 (2000).
- 29- Pyo R, Lee JK, Shipley JM, Curci JA, Mao D, Ziporin SJ, Ennis TL, Shapiro SD, Senior RM, and Thompson RW. Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest* 105: 1641– 1649, 2000.
- 30- D M Hovsepian 1, S J Ziporin, M K Sakurai, J K Lee, J A Curci, R W Thompson. Elevated plasma levels of matrix metalloproteinase-9 in patients with abdominal aortic aneurysms: a circulating marker of degenerative aneurysm disease. *J Vasc Interv Radiol.* 2000 Nov-Dec;11(10):1345-52. doi: 10.1016/s1051-0443(07)61315-3.
- 31- Flondell-Sitè eD,LindbladB,KolbelT,Gotts aterA.Markersofproteolysis, fibrinolysis, and coagulation in relation to size and growth rate of abdominal aortic aneurysms. *Vasc Endovascular Surg.* 2010;44:262–268.
- 32- W R W Wilson 1, M Anderton, E C Choke, J Dawson, I M Loftus, M M Thompson. Elevated plasma MMP1 and MMP9 are associated with abdominal aortic aneurysm rupture. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2008 May;35(5):580-4. doi: 10.1016/j.ejvs.2007.12.004. Epub 2008 Jan 15.
- 33- Didangelos A, Yin X, Mandal K, et al. Extracellular matrix composi- tion and remodeling in human abdominal aortic aneurysms: a proteomics approach. *Mol Cell Proteomics.* 2011;10(8): M111.008128.
- 34- Femke A M V I Hellenthal 1, Willem A Buurman, Will K W H Wodzig, Geert Willem H Schurink. Biomarkers of abdominal aortic aneurysm progression. Part 2: inflammation. *Nat Rev Cardiol.* 2009 Aug;6(8):543-52. doi: 10.1038/nrcardio.2009.102. Epub 2009 Jun 23.
- 35- Christoph Knappich 1, Joshua M Spin 2, Hans-Henning Eckstein 1, Philip S Tsao 2, Lars Maegdefessel 1 3. Involvement of Myeloid Cells and Noncoding RNA in Abdominal Aortic Aneurysm Disease. *Antioxid Redox Signal.* 2020 Sep 20;33(9):602-620. doi: 10.1089/ars.2020.8035. Epub 2020 Apr 16.
- 36- Treska, v., Topolcan, O. & Pecen, L. Cytokines as plasma markers of abdominal aortic aneurysm. *Clin. Chem. Lab. Med.* 38, 1161–1164 (2000).
- 37- Anna M Witkowska 1, Maria H Borawska, Marek Gacko. Relationship among TNF-alpha, sICAM-1, and selenium in presurgical patients with abdominal aortic aneurysms. *Biol Trace Elem Res.* 2006 Winter;114(1-3):31-40. doi: 10.1385/BTER:114:1:31.
- 38- Juvonen, J. et al. elevated circulating levels of inflammatory cytokines in patients with abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 2843–2847 (1997).
- 39- rohde, L. e. et al. Plasma concentrations of interleukin-6 and abdominal aortic diameter among subjects without aortic dilatation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 1695–1699 (1999).
- 40- Middleton RK, Lloyd GM, Bown MJ, Cooper NJ, London NJ, Sayers RD. The pro-inflammatory and chemotactic cytokine microenvironment of the abdominal aortic aneurysm wall: a protein array study. *J Vasc Surg* 2007; 45: 574 – 580.
- 41- Lindeman JH, Abdul-Hussien H, Schaapherder AF, Van Bockel JH, Von der Thüsen JH, Roelen DL et al. Enhanced expression and activation of pro-inflammatory transcription factors distinguish aneurysmal from atherosclerotic aorta: IL-6- and IL-8-dominated inflammatory responses prevail in the human aneurysm. *Clin Sci (Lond)* 2008; 114:
- 42- Shi, G. P. et al. Cystatin C deficiency in human atherosclerosis and aortic aneurysms.*J. Clin. Invest.* 104, 1191– 1197 (1999).
- 43- sun, J. et al. Mast cells modulate the pathogenesis of elastase-induced abdominal aortic aneurysms in mice. *J. Clin. Invest.* 117, 3359–3368 (2007)
- 44- Joe Dawson 1, Gillian Cockerill, Edward Choke, Ian Loftus, Matt M Thompson. Aortic aneurysms as a source of circulating interleukin-6. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Nov;1085:320-3. doi: 10.1196/annals.1383.009.
- 45- Joe Dawson 1, Gillian W Cockerill, Edward Choke, Anne-Maria Belli, Ian Loftus, Matt M Thompson. Aortic aneurysms secrete interleukin-6 into the circulation. *J Vasc Surg.* 2007 Feb;45(2):350-6. doi: 10.1016/j.jvs.2006.09.049.
- 46- Jones KG, Brull DJ, Brown LC, Sian M, Greenhalgh RM, Humphries SE, Powell JT. Interleukin-6 (IL-6) and the prognosis of abdominal aortic aneurysms. *Circulation.* 2001;103:2260–2265.

- 47- Kalliopi-Maria Tasopoulou 1, Christos Argiriou 2, Alexandra K Tsaroucha 3, George S Georgiadis 2. Circulating miRNAs as Biomarkers for Diagnosis, Surveillance, and Postoperative Follow-Up of Abdominal Aortic Aneurysms. *Ann Vasc Surg.* 2023 Jul;93:387-404. doi: 10.1016/j.avsg.2023.02.029. Epub 2023 Mar 13.
- 48- Anna Zampetaki 1, Rizwan Attia 2, Ursula Mayr 2, Renata S M Gomes 2, Alkystis Phinikaridou 2, Xiaoke Yin 2, Sarah R Langley 2, Peter Willeit 2, Ruifang Lu 2, Bruce Fanshawe 2, Marika Fava 2, Javier Barallobre-Barreiro 2, Chris Molenaar 2, Po-Wah So 2, Abeera Abbas 2, Marjan Jahangiri 2, Matthew Waltham 2, Rene Botnar 2, Alberto Smith 2, Manuel Mayr 1. Role of miR-195 in aortic aneurysmal disease. *Circ Res.* 2014 Oct 24;115(10):857-66. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.304361. Epub 2014 Sep 8.
- 49- Peng Gao 1, Jiyuan Si 1, Bin Yang 1, Jixiang Yu 1. Upregulation of MicroRNA-15a Contributes to Pathogenesis of Abdominal Aortic Aneurysm (AAA) by Modulating the Expression of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2B (CDKN2B). *Med Sci Monit.* 2017 Feb 18;23:881-888. doi: 10.12659/msm.898233.
- 50- Maegdefessel, L., et al., 2014. miR-24 limits aortic vascular inflammation and murine abdominal aneurysm development. *Nature communications*, 5, 5214.
- 51- Zhang, W., et al., 2015. Plasma microRNAs serve as potential biomarkers for abdominal aortic aneurysm. *Clinical biochemistry*, 48 (15), 988–992.
- 52- Areti Moushi 1, Kyriaki Michailidou 2, Marinos Soteriou 3, Marios Cariolou 1 4, Evy Bashiardes 1 4. MicroRNAs as possible biomarkers for screening of aortic aneurysms: a systematic review and validation study. *Biomarkers.* 2018 May;23(3):253-264. doi: 10.1080/1354750X.2018.1423704. Epub 2018 Jan 15.
- 53- Z-L Han 1, H-Q Wang, T-S Zhang, Y-X He, H Zhou. Up-regulation of exosomal miR-106a may play a significant role in abdominal aortic aneurysm by inducing vascular smooth muscle cell apoptosis and targeting TIMP-2, an inhibitor of metalloproteinases that suppresses extracellular matrix degradation. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020 Aug;24(15):8087-8095. doi: 10.26355/eurrev\_202008\_22493
- 54- Erik Biros 1, Corey S Moran 1, Yutang Wang 1, Philip J Walker 2, John Cardinal 3, Jonathan Golledge. microRNA profiling in patients with abdominal aortic aneurysms: the significance of miR-155. *Clin Sci (Lond).* 2014 Jun;126(11):795-803. doi: 10.1042/CS20130599.
- 55- Tomohiro Yamasaki 1, Takahiro Horie 2, Satoshi Koyama 1, Tetsushi Nakao 1, Osamu Baba 1, Masahiro Kimura 1, Naoya Sowa 3, Kazuhisa Sakamoto 4, Kazuhiro Yamazaki 4, Satoshi Obika 5 6, Yuuya Kasahara 5 6, Jun Kotera 7, Kozo Oka 7, Ryo Fujita 7, Takashi Sasaki 7, Akihiro Takemiya 7, Koji Hasegawa 3, Kenji Minatoya 4, Takeshi Kimura 1, Koh Ono 8. Inhibition of microRNA-33b specifically ameliorates abdominal aortic aneurysm formation via suppression of inflammatory pathways. *Sci Rep.* 2022 Jul 14;12(1):11984. doi: 10.1038/s41598-022-16017-5.
- 56- Anders Wanhainen 1, Kevin Mani 1, Emina Vorkapic 2, Rachel De Basso 3, Martin Björck 1, Toste Länne 4, Dick Wågsäter 5. Screening of circulating microRNA biomarkers for prevalence of abdominal aortic aneurysm and aneurysm growth. *Atherosclerosis.* 2017 Jan;256:82-88. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.11.007. Epub 2016 Nov 9.
- 57- Emma Plana 1 2 3, Laura Gálvez 1, Pilar Medina 2, Silvia Navarro 2, Victoria Fornés-Ferrer 3, Joaquín Panadero 4, Manuel Miralles 1 2 5. Identification of Novel microRNA Profiles Dysregulated in Plasma and Tissue of Abdominal Aortic Aneurysm Patients. *Int J Mol Sci.* 2020 Jun 28;21(13):4600. doi: 10.3390/ijms21134600.
- 58- Natasha Hasemaki 1, Nikolaos-Panagiotis Andreou 2, Evangelia Legaki 2, Athanasios Katsargyris 1 3, Maria Gazouli 4, Christos Klonaris 1. Association of miRNA-145 Single Nucleotide Polymorphisms in Abdominal Aortic Aneurysms. *In Vivo.* 2022 May-Jun;36(3):1120-1125. doi: 10.21873/in vivo.12810.
- 59- Johnston, K. W. *et al.* Suggested standards for reporting on arterial aneurysms. *J. Vasc. Surg.* (1991) doi:10.1067/mva.1991.26737.
- 60- Chaikof, E. L. *et al.* The care of patients with an abdominal aortic aneurysm: The Society for Vascular Surgery practice guidelines. *J. Vasc. Surg.* (2009) doi:10.1016/j.jvs.2009.07.002.
- 61- Dionigi. *Chirurgia - Basi teoriche e chirurgia generale.* in *Elsevier* (2011). doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- 62- Svensjö, S. *et al.* Low prevalence of abdominal aortic aneurysm among 65-year-old Swedish men indicates a change in the epidemiology of the disease. *Circulation* (2011) doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.030379.
- 63- Sampson, U. K. A. *et al.* Estimation of global and regional incidence and prevalence of abdominal aortic aneurysms 1990 to 2010. *Global Heart* (2014) doi:10.1016/j.gheart.2013.12.009.
- 64- Forsdahl, S. H., Singh, K., Solberg, S. & Jacobsen, B. K. Risk factors for abdominal aortic aneurysms: a 7-year prospective study: the tromsø study, 1994–2001. *Circulation* (2009) doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.817619.
- 65- Lederle, F. A. *et al.* Yield of repeated screening for abdominal aortic aneurysm after a 4-year interval. *Arch. Intern. Med.* (2000) doi:10.1001/archinte.160.8.1117.
- 66- Giles, K. A. *et al.* Decrease in total aneurysm-related deaths in the era of endovascular aneurysm repair. *J. Vasc. Surg.* (2009) doi:10.1016/j.jvs.2008.09.067.
- 67- Dillavou, E. D., Muluk, S. C. & Makaroun, M. S. Improving aneurysm-related outcomes: Nationwide benefits of endovascular repair. *J. Vasc. Surg.* (2006) doi:10.1016/j.jvs.2005.11.017.
- 68- tather, P. W. *et al.* Systematic review and meta-analysis of the early and late outcomes of open and endovascular repair of abdominal aortic aneurysm. *The British journal of surgery* (2013) doi:10.1002/bjs.9101.

- 69- Endo, M. *et al.* Advantages of using the midline incision right retroperitoneal approach for abdominal aortic aneurysm repair. *Surg. Today* (1996) doi:10.1007/BF00311983.
- 70- Twine, C. P., Humphreys, A. K. & Williams, I. M. Systematic review and meta-analysis of the retroperitoneal versus the transperitoneal approach to the abdominal aorta. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* (2013) doi:10.1016/j.ejvs.2013.03.018.
- 71- Buth, J., Harris, P. L., Van Marrewijk, C. & Fransen, G. The significance and management of different types of endoleaks. *Seminars in Vascular Surgery* (2003) doi:10.1016/S0895-7967(03)00007-3.