

Tesi di Laurea: “Combined physiological and biochemical approach for the prediction of abdominal aortic aneurysm growth in humans” (Sintesi)

Autore: P. Lapolla

Relatore: A. Mingoli

Correlatore: R. Lee

Introduzione

Gli aneurismi dell'aorta addominale (AAA) sono dilatazioni segmentali anormali permanenti dell'aorta addominale che coinvolgono tutti e tre gli strati della parete aortica in modo tale che il diametro del vaso sia >30 mm o più del 50% più grande della dimensione normale (14-30 mm)^{1, 2, 3}. AAA è una patologia comune circa tre volte più negli uomini che nelle donne ed è stimato che la prevalenza di pazienti asintomatici di età >60 anni sia del 4-8% negli uomini e dello 0,5-1,5% nelle donne e che il fattore di rischio aumenta con l'età⁴. La mortalità dell'AAA aumenta proporzionalmente all'aumento dell'aspettativa di vita osservato nei paesi sviluppati. Se non si interviene, gli AAA crescono progressivamente con una conseguente rottura degli stessi. Questo è associato ad un'elevata mortalità e ad un'elevata morbilità. La rottura dell'AAA provoca 6.000 decessi ogni anno nel Regno Unito e circa 200.000 casi in tutto il mondo. I fattori di rischio includono il fumo di sigaretta, il sesso maschile e la storia familiare di AAA⁵. In genere, gli AAA sono una condizione altamente letale (mortalità 85-90%), sono asintomatici e precedono la rottura (RAAA). Infatti, dei pazienti che raggiungono l'ospedale, solo il 50-70% sopravvive. Gli AAA si trovano tra il diaframma e la biforcazione aortica. Se gli AAA coinvolgono l'origine delle arterie viscerali, sono classificati come surrenali, se coinvolgono le origini delle arterie renali

come iuxtarenali e infrarenali se iniziano al di sotto delle arterie renali. Più cefalico è l'aneurisma, più complessa è la riparazione. Circa l'85% degli AAA sono infrarenali, e spesso coinvolgono le arterie iliache comuni¹.

Patofisiologia

La formazione dell'AAA è caratterizzata dall'indebolimento dello strato mediale in una grande arteria di conduttanza ricca di matrice come l'aorta, che coinvolge progressivamente tutti gli strati della parete del vaso. Questo distinto processo degenerativo include lo stato di infiammazione cronica e la degradazione della matrice extracellulare (ECM) da parte del processo mediato dalla proteasi (Fig. 1)^{6, 7}. È stato osservato che il processo infiammatorio dell'AAA comporta l'infiltrazione di macrofagi⁸⁻¹⁰, linfociti^{11, 12}, neutrofili¹³⁻¹⁷, e mastociti¹⁸ che svolgono un ruolo critico nella formazione e crescita dell'AAA. È stato dimostrato che l'aumento dell'attività delle proteasi come le metalloproteinasi della matrice (MMP) e le catepsine, che sono tipicamente inattive in uno stato fisiologico, è associato all'infiammazione aortica cronica, al rimodellamento del tessuto aortico e alla progressione dell'AAA. Questo processo degenerativo porta a un ridotto turnover della nuova ECM a causa dell'apoptosi delle cellule muscolari lisce vascolari (VSMC), della degenerazione della ECM, della perdita di elastina e della disregolazione nella sintesi del collagene (Fig. 1)^{6, 7}. Inoltre, componenti del

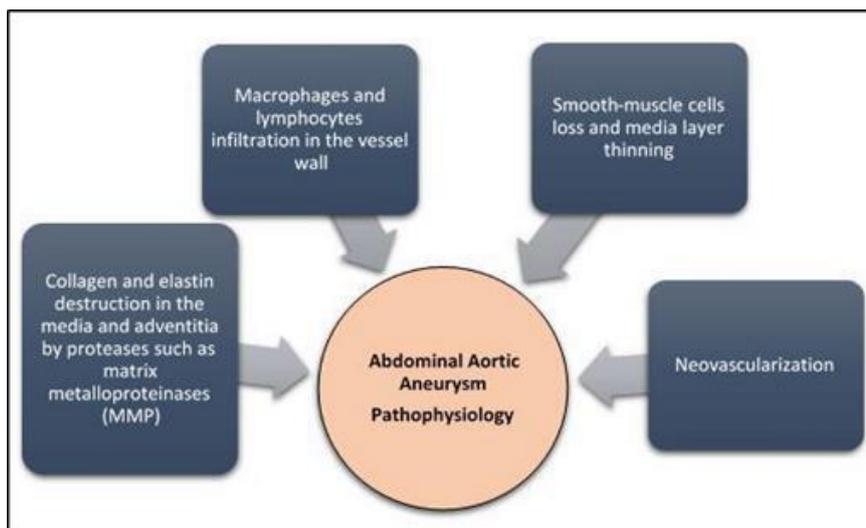


Fig. 1. Rappresentazione schematica della Fisiopatologia dell'AAA e del relativo processo infiammatorio.

sangue come piastrine, neutrofilii, plasmina e proteasi della trombina contribuiscono allo stato infiammatorio nella formazione di AAA. Tuttavia, i meccanismi fisiopatologici a livello molecolare devono essere chiariti per comprendere appieno la patogenesi della formazione di AAA, che è un processo multifattoriale¹⁹⁻²². I fattori di rischio non modificabili dell'AAA comprendono il sesso maschile, l'età avanzata e una storia familiare di AAA²³. L'incidenza dell'AAA aumenta significativamente ogni decennio per gli uomini di età superiore ai 50 anni e per le donne di età compresa tra 60 e 70 anni²⁴. Il rapporto di rischio è stimato quattro volte superiore negli uomini rispetto alle donne e quattro volte superiore nei soggetti con storia familiare di AAA rispetto a quelli privi di rischio²³. Per quanto riguarda i fattori di rischio modificabili, il fumo è il più significativo^{23, 25, 26}. Altri fattori di rischio includono preesistente malattia occlusiva aterosclerotica, ipercolesterolemia, obesità e ipertensione²³. L'etnia caucasica è la più colpita, seguita da neri, asiatici e ispanici^{23, 27}. La riduzione del rischio di AAA è associata al diabete mellito di tipo II e allo stile di vita, che consiste in un regolare esercizio fisico e una dieta sana^{23, 28}. Lo sviluppo di AAA è associato ad altri fattori di rischio per malattie cardiovascolari, come la malattia coronarica (CAD), la malattia cerebrovascolare e arteriosa periferica (PAD)²⁹.

Trattamento

A seconda di diversi fattori, tra cui la dimensione dell'aneurisma, che ha una soglia di 55 mm negli uomini e 50 mm nelle donne, la posizione e le comorbidità, l'intervento di riparazione dell'aneurisma comprende due approcci: la Riparazione chirurgica aperta (Open Surgical Repair, OSR) eseguita dal 1950 o la Riparazione endovascolare (Endovascular aneurysm repair, EVAR), eseguita dal 1987, i quali risultano essere gli interventi attualmente raccomandati (Fig. 2)^{30, 31}. Per quanto riguarda il primo approccio di intervento (OSR), la durata media della degenza negli ospedali è di nove giorni e il completo recupero richiede settimane o mesi. La procedura OSR consiste in un'incisione addominale o sul fianco, il monitoraggio dei



Fig. 2. Procedura di riparazione chirurgica dell'AAA con approccio aperto (Open Surgical Repair OSR).

vasi sopra e sotto l'AAA, l'incisione del sacco dell'aneurisma e il posizionamento di un innesto sintetico (Fig. 2)¹. La mortalità a 30 giorni dell'OSR è stimata tra il 4% e il 5% e riportata fino al 2%.

La riparazione endovascolare (EVAR) può essere eseguita per via percutanea in anestesia locale. In questo caso la durata media della degenza negli ospedali è di tre giorni e la completa guarigione può variare da giorni a settimane. La mortalità a 30 giorni si riduce all'1%. EVAR è una procedura meno invasiva, ossia uno stent coperto viene inserito come un manicotto nello spazio intraluminale attraverso le arterie femorale e iliaca; dunque passa attraverso il sacco dell'aneurisma e si colloca nel vero lume dell'aorta. È ancorato al tessuto

aortico sano sopra l'aneurisma e nelle arterie iliache sotto (Fig. 3, B)¹.

L'approccio EVAR richiede che il paziente abbia la morfologia anatomica appropriata dei vasi (Fig. 4 A, B). Ciò comprende una dimensione adeguata e sufficiente dei vasi iliaci per consentire l'inserimento dell'innesto e un collo aortico adeguato tale da permettere l'ancoraggio dell'innesto prossimale risparmiando le arterie renali. Pertanto, si evita questo approccio in caso di aneurisma infrarenale dovuto a limitazioni anatomiche¹.

A causa della natura non invasiva dello stent, il mercato degli innesti stent aortici dovrebbe superare i 3,7 miliardi di dollari entro il 2024³².

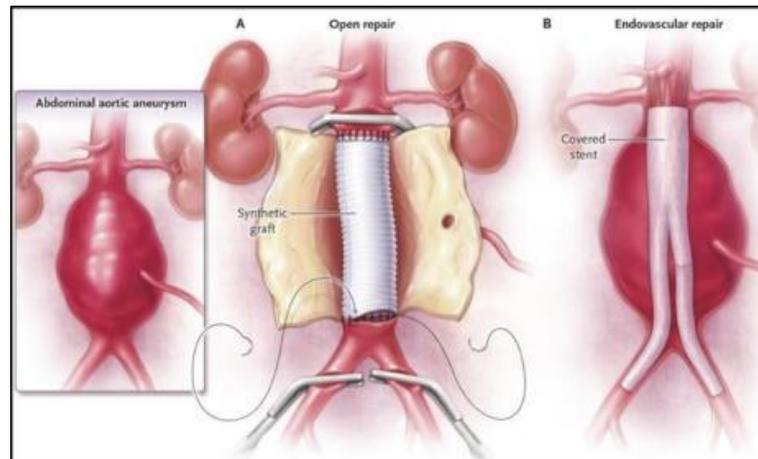


Fig. 3. Interventi per AAA; 3A. Riparazione chirurgica approccio aperto (Open Surgical Repair OSR); 3B. Riparazione Endovascolare (EVAR). Kent KC. Clinical practice. Abdominal aortic aneurysms. N Engl J Med 2014; 371: 22.

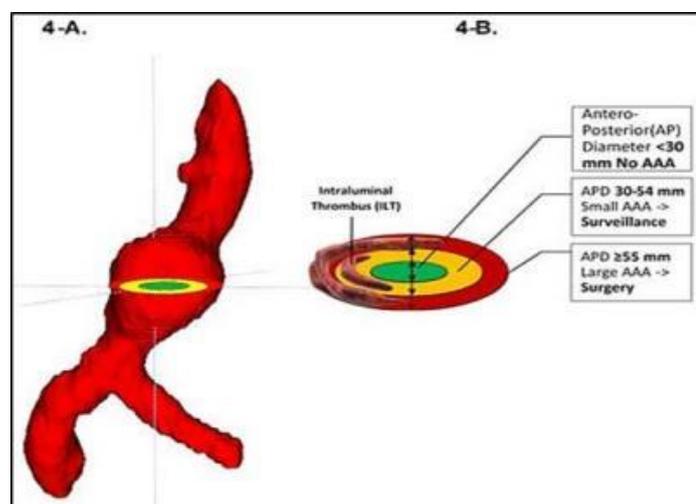


Fig. 4. Rappresentazione 3D acquisita da scansione TAC addominale di paziente affetto da AAA (il software ITK-Snap è stato utilizzato per la segmentazione ed elaborazione dell'immagine); 4B Rappresentazione grafica del trombo intraluminale (ILT) e delle soglie di dimensione AAA per l'intervento di riparazione chirurgica dell'aneurisma.

Screening e follow-up

Sono state osservate variazioni significative nella gestione dell'AAA tra i paesi che possono essere guidate da incentivi finanziari (Fig. 5)⁶. Piccoli AAA (< 55 mm, da 3,0 a 5,4 cm di diametro) devono essere monitorati e richiedono un'ecografia regolare per il follow up sulla crescita. Secondo la legge di Laplace, ad un diametro di AAA maggiore corrisponde una maggiore velocità di espansione. Le linee guida per la frequenza di sorveglianza dell'AAA raccomandano di monitorare ogni 3 anni aneurismi con un diametro da 3,0 a 3,4 cm; ogni anno per aneurismi da 3,5 a 4,4 cm; e ogni sei mesi per aneurismi da 4,5 a 5,4 cm³³.

programma di screening dell'aneurisma aortico addominale del NHS (il "NAAASP"), nello specifico un programma di screening introdotto nel Regno Unito nel 2009 che invita gli uomini a sottoporsi a un'ecografia addominale (U/S) durante l'anno in cui compiono 65 anni e includendo gli Stati Uniti regolari una volta diagnosticata l'AAA³⁵, non è coerente con le linee guida internazionali in quanto raccomandano scansioni più frequenti per la sorveglianza dell'AAA. Di conseguenza, molte di queste scansioni non sono necessarie e aumentano l'onere dei costi sui sistemi sanitari (~2.500 nuove diagnosi di AAA ogni anno nel SSN)^{36, 37}.

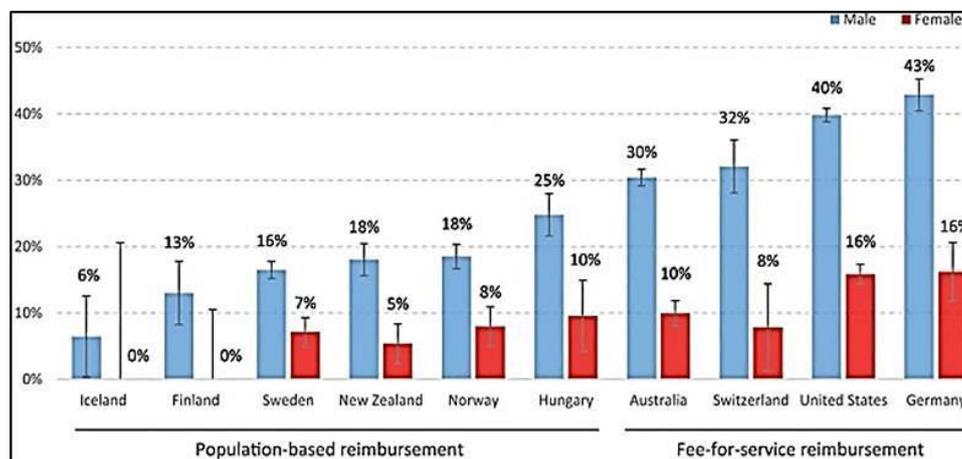


Fig. 5. Nei paesi con un sistema di assistenza sanitaria a pagamento, la percentuale di riparazione di AAA (33%) e gli ottogenari sottoposti a riparazione AAA (25%) sono più elevati rispetto ai paesi con un modello di assistenza sanitaria gratuita o rimborso (intervento riparazione piccoli AAA 16%; ottogenari 18%; $P < 0,01$) (Beck AW et al., *Circulation* 2016).

Una meta-analisi che ha valutato il tasso di crescita e rottura eseguita su 15.000 pazienti affetti da AAA suggerisce che potrebbe essere sicuro avere un follow-up più lungo (anni) in un piccolo aneurisma, con un diametro inferiore a 4,0 cm³⁴.

Tuttavia, gli AAA con la stessa dimensione iniziale progrediscono a un tasso di crescita diverso tra gli individui e i pazienti con AAA a crescita lenta richiedono una sorveglianza ecografica meno frequente rispetto agli AAA a crescita rapida (Fig. 6) e un approccio personalizzato per la valutazione dei singoli casi. Inoltre, il

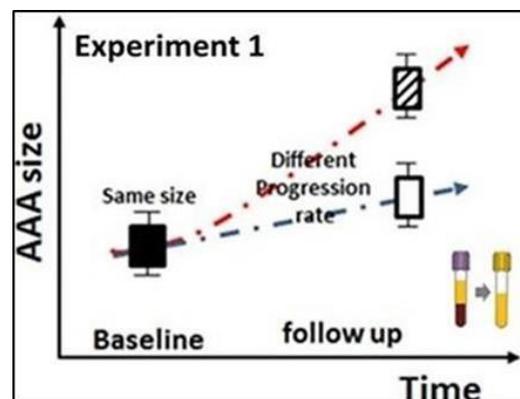


Fig. 6. Tassi di progressione di AAA differenti al controllo follow-up in pazienti con la stessa dimensione iniziale (baseline). Lee R et al., *Ann Surg* 2020.

Intervalli di follow-up

SVS, ESVS, AHA, EHJ guidelines:

- 3.5 - 4.4 cm – yearly scan
- 4.5 - 5.5 cm – biannual scan

NHS AAA screening program:

- 3.5 - 4.4 cm – yearly scan
- 4.5 - 5.5 cm – quarterly scan

Le evidenze suggeriscono che la maggior parte dei pazienti (~70%) con piccoli AAA (40-49 mm) svilupperanno una progressione della dimensione del diametro dell'AAA che alla fine richiederà un trattamento chirurgico entro 5 anni. Questo gruppo di pazienti che affrontano un ritardo nell'intervento hanno un rischio aumentato di eventi cardiovascolari e comportano comunque un rischio di rottura dell'1% all'anno, sebbene presentino un piccolo diametro dell'aneurisma³⁸.

L'AAA può non presentare rotture nonostante raggiunga un diametro > 70 mm. Ciò suggerisce che la crescita dell'AAA non è lineare e progredisce a ritmi temporali diversi e rapporti diversi. Da una parte l'AAA può espandersi rapidamente o ad intervalli; dall'altra, l'AAA può rimanere stabile, mantenendo la stessa dimensione iniziale per molti anni durante i quali i pazienti possono decedere per diverse cause legate all'età³⁹. Le attuali indicazioni possono portare a ritardi inutili in alcuni pazienti e ritardi indesiderati in altri⁴⁰. Pertanto, vi è la necessità di migliorare la comprensione del meccanismo fisiopatologico che governa la formazione di AAA. Ciò aiuterà a trovare gli strumenti per predire la crescita dell'aneurisma che andranno a beneficio dei pazienti e della gestione clinica fornendo una stratificazione accurata, obiettiva e personalizzata dei pazienti per la frequenza di sorveglianza dell'AAA e la tempistica dell'intervento. Di conseguenza, può anche portare alla scoperta di nuovi bersagli terapeutici per la terapia medica definitiva.

Oxford Abdominal Aortic Aneurysm (OxAAA) Study. Introduzione e contesto

Diversi studi di ricerca sono stati condotti su modelli animali cercando di chiarire i processi che governano la formazione dell'AAA. Tuttavia, rimane la necessità di comprendere i meccanismi fisiopatologici della progressione dell'AAA nell'uomo. L'AAA è una patologia comune che provoca la rottura dell'aneurisma e un'elevata mortalità correlata ed è un'importante causa di morte in tutto il mondo. Secondo le attuali linee guida, la dimensione dell'aneurisma rimane il miglior criterio per valutare l'AAA per l'indicazione chirurgica. Questa è una chiara limitazione poiché il diametro dell'AAA non può predire un livello assoluto di crescita dell'AAA e il relativo rischio di rottura.

Pertanto, vi è la necessità di trovare nuovi metodi per la valutazione del rischio e la stratificazione dei pazienti. Gli esperimenti che ho condotto fanno parte dello studio OxAAA in corso (approvazione normativa; protocollo 4.0, 03.10.2020, Rif. etica 13/SC/0250). Questo progetto mira a chiarire la fisiopatologia alla base della progressione dell'aneurisma identificando nuovi biomarcatori della crescita dell'AAA. Lo studio OxAAA combina le informazioni dal profilo molecolare completo del sangue e dei tessuti AAA e dalla valutazione biomeccanica dell'albero vascolare centrale e periferico mediante imaging funzionale. L'obiettivo è identificare nuovi strumenti per predire la crescita dell'aneurisma e la stratificazione del rischio dei pazienti. Lo studio OxAAA è uno studio osservazionale prospettico di coorte a centro singolo su pazienti con diagnosi confermata di AAA.

Nel 2017 lo studio OxAAA ha condotto un'indagine in cui è stato chiesto alla comunità vascolare di esprimere la loro opinione in merito alla priorità della ricerca per l'aneurisma dell'aorta addominale di piccole dimensioni. "Lo sviluppo di nuovi test per prevedere la crescita dell'aneurisma" è emersa come una delle massime priorità di questa indagine e il gruppo di studio OxAAA è stato istituito specificamente per affrontare questo problema (Fig. 7)⁴¹.

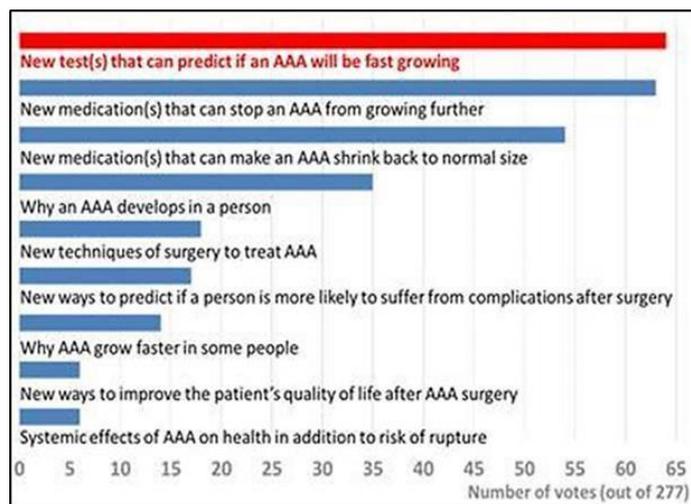


Fig. 7. Indagine dello studio OxAAA nel 2017 sulle priorità della ricerca riguardante l'AAA. Lee R et al. Patients' opinions regarding research and management of abdominal aortic aneurysms. *Int Angiol* 2017; 36: 526-30.

I campioni di tessuto per la valutazione dei biomarcatori tissutali sono ottenuti da pazienti con AAA di grande dimensione sottoposti a intervento chirurgico, consentendo il confronto delle variazioni presenti e in assenza di biomarcatori ematici, rispettivamente, prima e dopo l'intervento chirurgico.

Ciò consente la valutazione multiparametrica di diversi pazienti affetti da AAA in base al tasso di progressione, dimensione e assenza di crescita, oltre al profilo biomolecolare dei campioni di pazienti con AAA. Questi dati sono combinati con informazioni cliniche per scoprire nuovi biomarcatori della progressione dell'AAA. Volontari sani sono anche reclutati per fornire il gruppo di controllo per lo studio.

Obiettivi dell'OxAAA Study

Identificazione di un modello di valutazione multimodale per migliorare la stratificazione del rischio di progressione dell'AAA.

Partecipanti allo studio

I partecipanti allo studio sono divisi in tre categorie di assunzione:

1. Pazienti con diagnosi di AAA confermata sottoposti a controllo follow-up AAA.

2. Pazienti appena inviati all'ospedale con una diagnosi recente di AAA sottoposti ad intervento chirurgico a causa di AAA di grandi dimensioni alla presentazione o che rientrano nel programma di controllo, entrando quindi nella categoria 1.

3. Volontari sani.

Criteri di inclusione

- Maschio o Femmina con diagnosi confermata di AAA
- Pazienti di età ≥ 16 anni
- Volontari sani senza AAA che accettano di prendere parte all'indagine.

Criteri di esclusione

- Pazienti con noti problemi clinici relativi allo studio
- Fobia dell'ago per impedire il prelievo di sangue per il campionamento o l'incannulamento venoso periferico.

Preparazione del progetto, reclutamento e consenso informato

Ho fornito un contributo sostanziale alla preparazione del mio progetto, inclusa l'analisi di biomarcatori circolanti selezionati da un flusso di lavoro di identificazione della proteomica per l'algoritmo di predizione, il recupero e l'anonimizzazione di ~1500 set di dati TAC di scansioni in questi timepoint: "molto prima dell'intervento chirurgico" (CT-

"long before surgery" LBS) e "appena prima dell'intervento chirurgico" (CT- "just before surgery" JBS), ecografie e analisi dei dati U/S, coordinamento della fase di reclutamento dei partecipanti, cura del database e raccolta di tutti i moduli di consenso per ~1000 pazienti che erano stati sottoposti a Chirurgia AAA presso gli Ospedali dell'Università di Oxford, inclusa la selezione e l'analisi dei dati ecografici (Fig. 14). Questa è la base fondamentale per consentire l'accesso al set di dati clinici e di imaging completo e necessario per le analisi in corso di questo progetto.

Combinazione di approccio fisiologico e biochimico per la previsione della crescita AAA. Introduzione

L'AAA è un processo infiammatorio multifattoriale che coinvolge diverse vie interconnesse. Pertanto vi è la necessità di indagare questa malattia utilizzando un approccio multimodale comprendente le analisi biochimiche, genetiche e biomeccaniche⁷. A differenza delle precedenti tecniche di analisi dei marcatori, che erano in grado di valutare solo un basso numero di bersagli come biomarcatori proteici, espressione genica e polimorfismi ecc., la nuova tecnologia consente un'ampia valutazione di un insieme completo di substrati da analizzare senza ipotesi a priori.

Questi includono analisi come metaboloma, proteoma, genoma (ad esempio nel caso di GWAS). I meccanismi biologici possono ora essere studiati utilizzando strumenti moderni (piattaforme KEGGTM, Ingenuity Pathway AnalysisTM, ecc.), che consentono l'analisi di un ampio set di dati e selezionano le informazioni rilevanti coinvolte nel percorso della specifica malattia di interesse.

Tecniche e strumenti ad alto rendimento (piattaforme come la piattaforma ELISA ELLA ProteinSimpleTM, ecc.) e analisi di biologia dei sistemi consentono la valutazione completa dei cambiamenti nel "profilo molecolare" del plasma o del campione di

tessuto legati al meccanismo biologico specifico della malattia⁴².

Oltre all'infiammazione locale dell'AAA, è stato osservato che i pazienti con AAA non solo mostrano una disfunzione vascolare nel segmento dell'AAA, ma presentano un'infiammazione sistemica e una relativa anomalia nell'albero vascolare e in altri distretti vascolari. Ciò ha indirizzato l'interesse per la ricerca sui biomarcatori circolanti AAA. È stato dimostrato che i livelli di citochine pro-infiammatorie, come IL-6, IL- β e CRP sono aumentati nei pazienti con AAA⁴³.

È stato scoperto che diversi gruppi di citochine pro-infiammatorie associate alla degradazione della matrice extracellulare (ECM) del trombo intraluminale (ILT, intraluminal thrombus) e AAA sono coinvolti nella fisiopatologia dell'AAA. L'ILT è un componente altamente biologicamente attivo dell'AAA che è coinvolto nella risposta immuno-infiammatoria ed è uno degli elementi chiave per lo studio della fisiopatologia dell'AAA. L'evento di intrappolamento dei neutrofili nell'ILT è legato a uno squilibrio di α -defensina, mieloperossidasi e altri biomarcatori circolanti implicati nell'attivazione dei neutrofili⁴⁴. Inoltre, è stato osservato che lo sviluppo di AAA è correlato con anomalie nei sottoprodotti della degradazione del collagene, attivazione di enzimi proteolitici come complessi plasma-antiplasma e livelli aumentati di peptidi di elastina sierica⁶. Precedenti indagini sulle implicazioni di questi marcatori in AAA hanno evidenziato che la progressione è stata inconcludente e, in alcuni casi, ha dato luogo a una bassa significatività (bassa specificità o sensibilità). Pertanto vi è la necessità di chiarire l'aspetto della scoperta dei biomarcatori nella progressione dell'AAA.

Scopo del mio progetto nell'OxAAA

Lo scopo del mio progetto era identificare nuovi biomarcatori individuali per l'algoritmo di previsione AAA per la

stratificazione del rischio. Questi sono biomarcatori del sangue misurabili nel plasma dei pazienti con AAA. Questa indagine fa parte del più ampio studio in corso sull'aneurisma dell'aorta addominale di Oxford (OxAAA). Sono stato finanziato da molteplici prestigiose borse di studio da schemi di finanziamento europei e dall'Università La Sapienza di Roma per lavorare allo studio OxAAA e condurre questi esperimenti per la mia tesi di ricerca.

Ipotesi dello studio

L'ipotesi è che le caratteristiche di base dell'AAA possano essere utilizzate per predire la futura crescita dell'aneurisma nei singoli pazienti.

Materiali e metodi

I pazienti sottoposti al programma di sorveglianza AAA da parte del SSN sono stati reclutati in modo prospettico (consenso individuale IRB: SC/0250/13). Il SSN offre screening e un programma di controllo follow-up, durante il quale i pazienti sono stati reclutati nel corso della storia naturale del percorso assistenziale del SSN. Quando i pazienti sono invitati per le misurazioni delle dimensioni dell'aneurisma, possono essere arruolati nello studio e vengono eseguite misurazioni aggiuntive a scopo di ricerca. Queste erano la misurazione della dilatazione flusso-mediata (FMD) riconosciuta come marker di disfunzione endoteliale e contemporaneamente i campioni di sangue raccolti da questi pazienti.

Analisi biochimiche

L'obiettivo è migliorare l'algoritmo di predizione, costituito dalla dimensione dell'aneurisma, FMD e ora introducendo biomarcatori circolanti mediante analisi biochimiche delle proteine circolanti. Sono state eseguite misurazioni del diametro antero-posteriore dell'AAA e FMD. Inoltre, allo stesso appuntamento di base per il controllo, sono stati prelevati campioni di sangue a digiuno. È stato applicato il precedente protocollo per ottenere il plasma

povero di piastrine (PPP). Si tratta di un metodo di centrifugazione a 2 stadi per preparare campioni di PPP. Sono stati quindi conservati a -80°C per la successiva analisi. Sulla base del diametro dell'AAA anteroposteriore misurato nelle successive scansioni ecografiche dell'AAA di sorveglianza, sono stati calcolati i tassi di crescita annuale dell'AAA prospettici. I dati sulla crescita dell'AAA sono stati riportati per 12 mesi in 59 pazienti, con un diametro anteroposteriore medio dell'AA di 47 mm alle misurazioni basali. Quelli invece per 24 mesi sono stati documentati in 51 di questi pazienti, di cui i restanti 8 sono stati poi sottoposti a chirurgia elettiva. Per le analisi biochimiche, ho applicato un metodo proteomico per scoprire nuovi biomarcatori circolanti con l'obiettivo di migliorare l'algoritmo di predizione. Derivato dai tassi di crescita AAA valutati durante i successivi 12 e 24 mesi, è stato selezionato un insieme di pazienti per la parte iniziale dell'analisi proteomica. Dieci pazienti con tasso di crescita AAA più veloce e dieci più lenti sono stati raggruppati e quindi analizzati da array di anticorpi proteici Proteome Profiler Antibody Arrays (sistemi di ricerca e sviluppo, n. ARY022B, n. ARY017) con il pannello Adipokine (57 target) e il pannello Cytokine XXL (105 target).

I dati dell'array sono stati analizzati utilizzando il software HImage++ (Western Vision Software, versione PCM 18.0.7). Questo passaggio critico è stato applicato per identificare nove potenziali proteine bersaglio di importanza biologica, che hanno mostrato una differenza di variazione di almeno il 20% tra il gruppo a crescita rapida e quello a crescita lenta. Le nove proteine identificate erano le seguenti: MIP1- α e MIP1- β (proteina infiammatoria dei macrofagi 1-alfa e -beta), RAGE, Interleuchina 6 (IL-6), Trombospondina-1, IL-8, C-X-C motivo chemochine ligando 10 (CXCL10), ICAM-1 (molecola di adesione intercellulare 1) e leptina (Fig. 8).

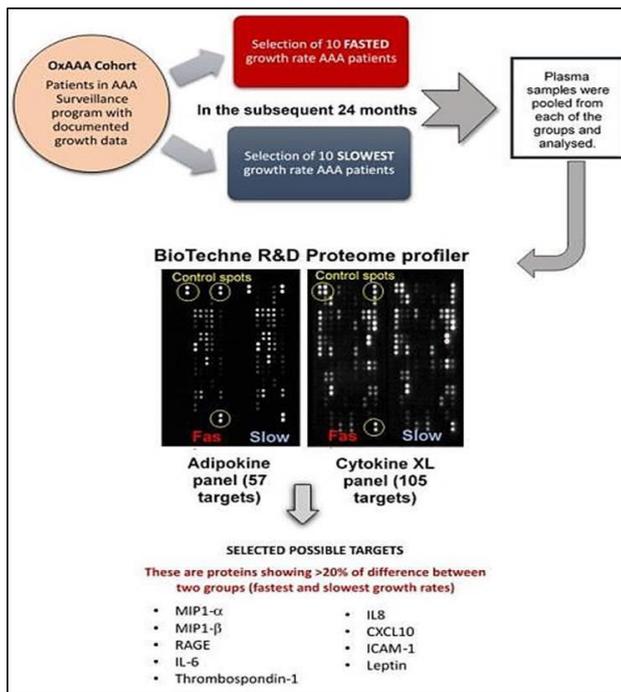


Fig. 8. Rappresentazione del flusso di lavoro dell'analisi biochimica.

Quindi, ho proceduto con le misurazioni del pannello di proteine nei singoli pazienti utilizzando la piattaforma ELLATM Simple Plex (ELISA) ad alto rendimento. Questa è stata utilizzata per la convalida tecnica dei biomarcatori proteici scoperti con la precedente analisi. Le analisi sono state eseguite utilizzando campioni di plasma privi

di cellule seguendo un protocollo di centrifugazione a due stadi che consente la purificazione rimuovendo i residui piastrinici per ottenere campioni più puliti (Fig. 9).

Misurazione delle proteine nell'intera coorte con ELLA Protein Simple™

La piattaforma Ella Simple Plex tende a eseguire analisi meno soggette a errori rispetto alla tradizionale tecnica Elisa, che necessita di diverse aggiunte di reagenti e lavaggi manuali. Inizialmente, è necessario aggiungere i campioni specifici e il buffer del test, quindi eseguire la scansione della cartuccia per importare le curve standard precaricate (curva standard interna incorporata) e inserirla in "Ella" per eseguire l'analisi.

"Ella" necessita solo di 25 microlitri di campione; non ci sono lavaggi manuali o aggiunte di reagenti perché "Ella" automatizza ogni passaggio dell'Elisa sulla cartuccia. I risultati completamente analizzati da bassi volumi di campione richiedono meno di 2 ore. Questi risultati comprendono queste misurazioni: Unità di fluorescenza relativa (RFU), concentrazione e coefficiente di variazione % (CV), altamente riproducibile al 7% o meno.

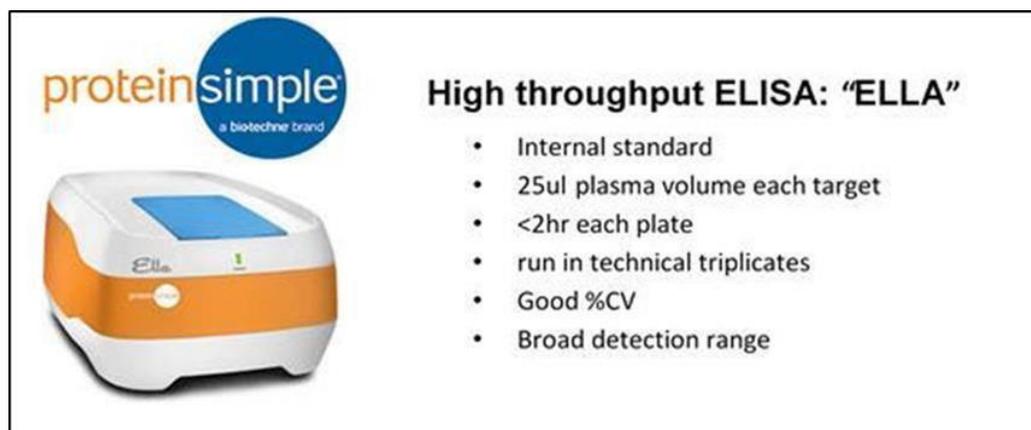


Fig. 9. Caratteristiche della macchina Ella ProteinSimple per analisi ELISA ad alto rendimento Biotechne. <https://www.proteinsimple.com/>.

$$cv = \frac{\sigma}{\mu}$$

CV = population *Coefficient of Variation*; **σ** = population *Standard Deviation*
μ = population *Mean*

$$\% cv = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

CV for samples:

S = standard deviation for samples; **̄x** = x-bar average mean in the sample

Ella Simple Plex utilizza fluorescenti per il rilevamento fornendo una migliore sensibilità rispetto al colorimetrico e un'ampia gamma dinamica rispetto allo standard Elisa. Le curve standard vengono generate automaticamente. Meccanismi Ella Simple Plex; il test plex semplice si basa sulla cartuccia microfluidica, che automatizza tutte le fasi del test; all'interno della cartuccia, il nanoreattore di vetro o GNR è al centro dell'Elisa.

I GNR sono specifici dell'analita e ottimizzati per un legame elevato con il campione; con 3GNR in ciascun canale, si ottengono automaticamente risultati triplicati incorporati per ogni campione. Ciò si traduce in una riproducibilità più precisa, il che significa che è possibile ottenere una bassa % CV per ogni campione come una singola replica, quindi non è necessario sprecare campioni preziosi eseguendo duplicati o triplicati extra. Ho usato la cartuccia 72 x 1.

La piastra ha curve standard integrate, che lasciano più spazio per i campioni e non è stato necessario eseguire più di un campione replicato (Figg. 10 e 11).

Ella ProteinSimple passaggi procedurali per l'analisi ELISA

- Scansione del codice a barre della cartuccia.
- Aggiunta di campioni e buffer.
- Caricamento della cartuccia in Ella Simple Plex.
- Esegue più analiti su un campione e contemporaneamente su più campioni, divide ciascun campione in canali isolati, ciascuno contenente un nanoreattore di vetro specifico per l'analita (GNR).
- Quindi sposta il campione avanti e indietro all'interno del GNR in modo che il campione si leghi all'anticorpo di cattura.

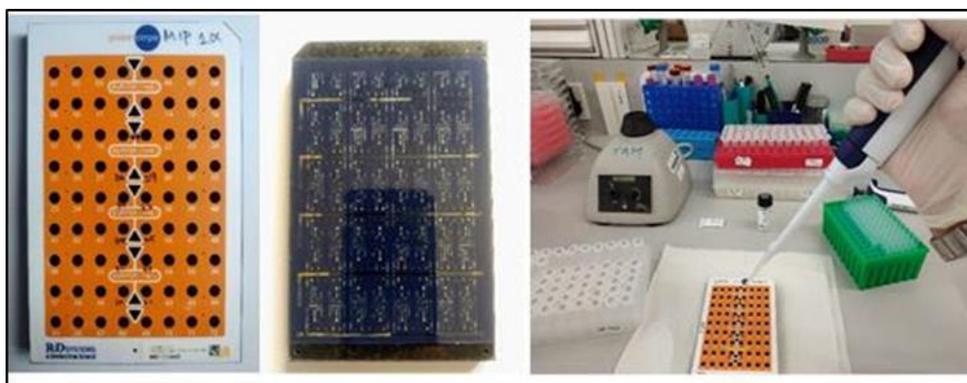


Fig. 10. 72x1 cartuccia Ella simple plex basata sulla tecnologia microfluidica (posteriore e frontale) per l'analisi ELISA. All'interno della cartuccia il nanoreattore di vetro o GNR è il punto centrale per l'analisi dell'ELISA.

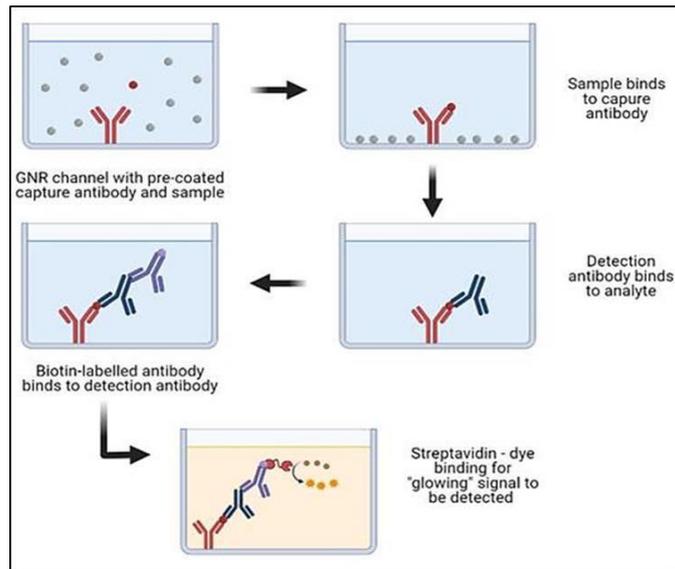


Fig. 11. Rappresentazione schematica delle fasi procedurali della tecnica ELISA. (Immagine creata utilizzando il programma BioRender).

- “Ella” aggiunge un anticorpo di rilevamento che si lega al campione, creando un “sandwich”.
- Viene quindi aggiunto un colorante fluorescente coniugato con streptavidina che fa brillare il complesso quando viene stimolato.
- “Ella” rileva il segnale che viene prodotto, in 60 minuti.
- Fornisce risultati completamente analizzati per tutti gli analiti in ciascuno dei campioni che eseguono test immunologici (Fig. 12).

Risultati

La validazione tecnica dell'array di anticorpi proteici eseguita con la macchina Elisa per il dosaggio immunologico ad alto rendimento Ella Simple Plex™ ha mostrato che le misurazioni di ciascun campione di pazienti nella coorte di studio hanno confermato i risultati precedentemente osservati dal Proteome Profiler Array per ciascuno dei biomarcatori proteici con almeno una differenza del 20% tra i due gruppi (tasso di crescita più veloce e più lento) (Fig. 13).

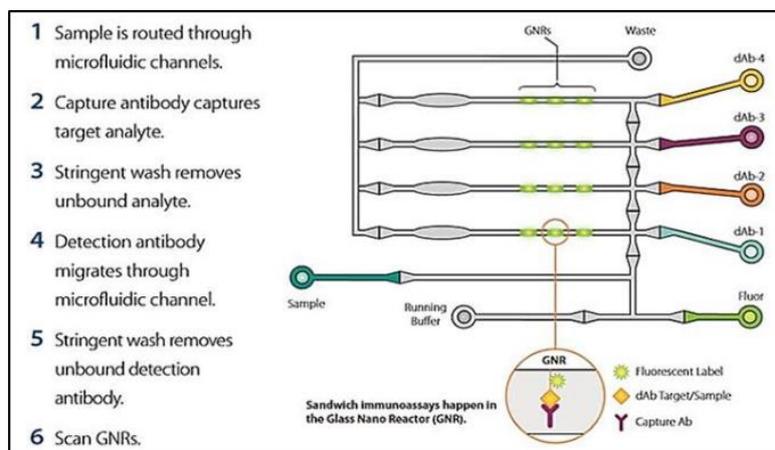


Fig. 12. Tecnologia Simple Plex; il campione scorre attraverso un canale microfluidico che lega la proteina di interesse. Successivamente, “Ella” lava via l'analita non legato e aggiunge un reagente di rilevamento. I dati vengono quindi generati dalla curva standard calibrata di fabbrica fornita con ogni cartuccia. Poiché ogni canale ha tre Glass Nano Reactor (GNR) rivestiti con un anticorpo di cattura, fornisce risultati triplicati per ciascun campione. <https://www.proteinsimple.com/>.

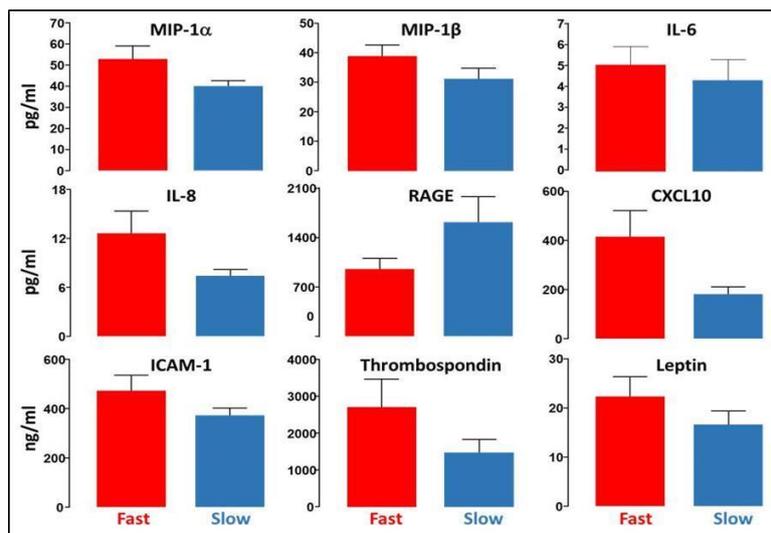


Fig. 13. Tecnica di convalida dell'array del profilo proteomico: ciascuno dei biomarcatori mostra una differenza > 20% tra il gruppo a tasso di crescita **veloce** e quello **lento**. Lee R, Charles PD, Lapolla P, et al. *Integrated Physiological and Biochemical Assessments for the Prediction of Growth of Abdominal Aortic Aneurysms in Humans. Annals of Surgery, 2019.*

Abbiamo combinato le misurazioni dei biomarcatori proteici con le misurazioni fisiologiche dell'arteria epizootica e il diametro AP della dimensione dell'aneurisma al basale, quindi, testando un modello lineare generalizzato per predire la crescita nella coorte OxAAA di pazienti con dimensioni del diametro AP AAA comprese tra 40 e 55 mm, l'intervallo di pazienti più inclini allo sviluppo di AAA (frequenza di sorveglianza) e sottoposti a riparazione chirurgica. Utilizzando la regressione logistica, abbiamo definito la crescita "Lenta/No" indicando i valori 0%, la crescita "Alcuni" si riferisce a valori di crescita > 0% comunque rimanenti nei due terzi inferiori della crescita e, infine, nel gruppo di crescita "Veloce" corrispondente alla fascia di tasso di crescita del terzile superiore. Questi sono stati calcolati per eventi in due punti temporali; 12 mesi e 24 mesi.

Analisi statistica

Per l'analisi statistica è stato utilizzato un modello logistico multinomiale con regressione di cresta. L'intervallo di regolazione dei parametri è stato impostato per differire da 0 a 3 con incrementi di 0,1. È stata eseguita una convalida incrociata di 10 volte con 3 ripetizioni al fine di rafforzare la stima dell'accuratezza utilizzando la versione del

software R 3.5.1, il pacchetto Python-Glmnet e le librerie Caret (Classification And REgression Training).

La classificazione a 3 vie del modello ha mostrato una buona precisione con il 73% per 12 mesi e il 58% per 24 mesi. Il potere predittivo elevato è risultato dopo la combinazione del confronto binario costituito da crescita lenta vs. non lenta e veloce vs. non veloce.

Le caratteristiche operative dell'area sotto ricevitore (AUROC) sono 0,92 e 0,82 per la previsione di crescita "Crescita lenta/assenza" rispettivamente a 12 e 24 mesi e 0,83 e 0,80 per "Crescita rapida" a 12 e 24 mesi, rispettivamente (Fig. 14)⁴⁵.

Discussione

La previsione della crescita dell'AAA è fondamentale per la valutazione clinica vascolare e attualmente non esistono metodi definiti per prevedere e stratificare in modo obiettivo e accurato i pazienti con AAA per il rischio di progressione o rottura dell'AAA. Ciò crea incongruenze nelle diverse raccomandazioni e linee guida delle società vascolari (ESVS in Europa e SVS negli USA) in merito alla frequenza della sorveglianza dell'AAA mediante scansioni ecografiche seriali

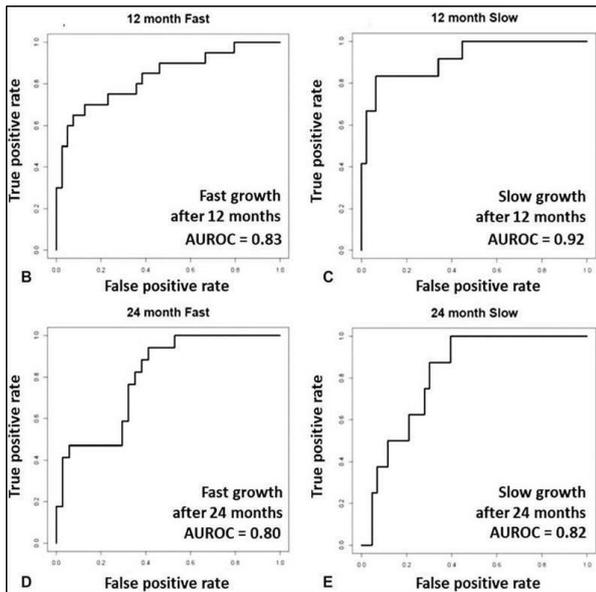


Fig. 14. Modello di regressione logistica multinomiale. I modelli hanno mostrato un eccellente potere predittivo se combinati con confronti binari di crescita veloce e non veloce, e crescita lenta rispetto a crescita non lenta. L'area sotto le caratteristiche operative del ricevitore (AUROC) riporta rispettivamente 0,83 (crescita rapida a 12 mesi, B), 0,92 (crescita lenta a 12 mesi, C), 0,80 (crescita rapida a 24 mesi, D) e 0,82 (crescita lenta/nessuna a 24 mesi, E). Lee R, Charles PD, Lapolla P, et al. *Integrated Physiological and Biochemical Assessments for the Prediction of Growth of Abdominal Aortic Aneurysms in Humans. Annals of Surgery, 2019.*

e ai tempi della riparazione chirurgica. Sebbene la fisiopatologia dello sviluppo e della progressione dell'AAA sia un meccanismo multifattoriale complesso, l'indicazione chirurgica per la riparazione dell'AAA si basa esclusivamente sulla dimensione dell'AAA. Con l'obiettivo di migliorare il modello di previsione, sono stati identificati e raggruppati dieci campioni di pazienti con tasso di crescita AAA più veloce e dieci più lento (rispettivamente barre rosse e blu) di pazienti della coorte di studio OxAAA. Questi provengono da pazienti seguiti durante i loro 12 e 24 mesi di sorveglianza AAA reclutati nello studio. Sono stati ottenuti campioni di sangue e campioni di plasma povero di piastrine (PPP) sono stati preparati con un protocollo di elaborazione specifico e conservati a -80°C .

Si è proceduto con l'analisi di questi 2 set ($n=10$ più veloci e $n=10$ più lenti) con array di anticorpi proteici e la successiva identificazione di nove proteine Trombospondina, RAGE, CXCL10, IL6, IL8, leptina e ICAM1, MIP1a e MIP1b, che ha mostrato una differenza di almeno il 20% tra i gruppi a crescita rapida e lenta. Le analisi per la convalida tecnica sono state eseguite utilizzando la piattaforma ELLA SimplePlexTM (ELISA) ad alto rendimento che corrispondeva alle precedenti osservazioni dell'array di anticorpi proteici per ciascuna

delle proteine con almeno il 20% di variazione della differenza tra i due gruppi. Successivamente, abbiamo combinato la misurazione dei biomarcatori proteici con le misurazioni fisiologiche dell'afte epizootica e la dimensione dell'aneurisma al basale, utilizzando la regressione logistica che abbiamo definito come crescita lenta/nessuna o crescita rapida; AUROC = 0,92 e 0,82 per la previsione di crescita "lenta/nessuna" dello 0% rispettivamente a 12 e 24 mesi e 0,83 e 0,80 per "Crescita rapida" rispettivamente a 12 e 24 mesi. Ciò dimostra che il nostro modello è eccellente e fornisce risultati promettenti nel prevedere una crescita lenta e una crescita rapida anche a 24 mesi con grande precisione.

Oltre alle precedenti analisi delle proteine biomarcatori, abbiamo testato il modello di regressione per valutare l'effetto della storia di fumo di un soggetto utilizzando come variabile continua l'anno di fumo. Il fumo di sigaretta è un noto fattore di rischio modificabile per la fisiopatologia della formazione di AAA. Pack-year è una quantificazione clinica del fumo di sigaretta; viene utilizzato per misurare l'esposizione del soggetto al fumo di tabacco e la valutazione del rischio delle patologie correlate.

$$\text{Number of pack – years} = \left(\frac{\text{N of cigarettes smoked per day}}{20} \right) \times \text{number of years smoked}$$

- 1 pack has 20 cigarettes in most of the countries, hence:

$$\begin{aligned} 1 \text{ pack – year} &= \left(\frac{1 \text{ pack}}{\text{day}} \right) \times 1 \text{ year} \\ &= 365.24 \times \left(\frac{20 \text{ cigarettes}}{\text{pack}} \right) \times 1 \text{ year} \\ &= 7305 \text{ cigarettes} \end{aligned}$$

Pregresso uso di sigaretta come unità di misura “Pack-year” è stato quindi incorporato come variabile aggiuntiva nel modello di regressione. Ciò ha portato a miglioramenti nel punteggio AUROC; a 12 mesi, la crescita Lenta/Nessuna è risultata a 0,95 e la crescita rapida a 0,88, mentre a 24 mesi, la crescita Lenta/Nessuna è risultata a 0,82 e la crescita Veloce a 0,81.

Limitazioni

Questi risultati possono, tuttavia, essere soggetti a bias a causa del fatto che “Pack-year” è un'unità di quantificazione auto-riferita ed è, quindi, una misurazione soggettiva riferita dal paziente. Di conseguenza, il presente studio è stato diretto su misure sostanziali e oggettive imparziali come quelle studiate in questa ricerca; FMD, diametro AP AAA e proteine biomarcatori del sangue.

Conclusioni

Per la prima volta è stato seguito l'uso del flusso di lavoro di scoperta biochimica applicato ai biomarcatori proteici circolanti in combinazione con misurazioni fisiologiche come l'FMD e la dimensione AP AAA. Abbiamo utilizzato questo approccio integrativo per sviluppare e testare un algoritmo per la previsione dell'AAA in una coorte prospettica di pazienti con AAA, che era in grado di esibirsi con un'eccellente capacità predittiva. La preparazione del campione è stata scrupolosamente eseguita utilizzando un protocollo specifico per elaborare

il PPP per evitare residui piastrinici rimanenti nel campione, che possono agire come un potenziale confondente del segnale rilasciando proteine al momento dello scongelamento e della successiva lisi cellulare.

Le osservazioni sono state validate in modo solido e la scoperta dei biomarcatori è stata massimizzata applicando uno specifico flusso di lavoro di proteomica e utilizzando l'accurata macchina ad alto rendimento per migliorare l'accuratezza.

Gli algoritmi di predizione che abbiamo sviluppato sulla base del modello biologico eseguito con una superba capacità di predizione sono stati descritti nello studio pubblicato su *Annals of Surgery* (Lee R, Charles PD, Lapolla P, et al.)⁴⁵. Questi risultati promettenti possono stimolare l'interesse della comunità vascolare e indurre altri centri ad effettuare una validazione esterna del modello predittivo. Ciò contenebbe su una potenziale coorte reclutata da AAA per la ricerca oltre a richiedere un lavoro sostanziale per la preparazione delle misurazioni PPP e FMD. Oltre alle misurazioni fisiologiche e biochimiche, sarebbe interessante incorporare nell'algoritmo di predizione ulteriori valori derivati dalla caratteristica di stress biomeccanico di AAA utilizzando l'analisi agli elementi finiti (finite element analysis FEA) per la previsione accurata del rischio di rottura^{46, 47}. Un multifattoriale approccio di valutazione, considerando le componenti genetiche in termini di polimorfismi genici,

sarebbe ideale per identificare potenziali marker di predisposizioni individuali alla rapida crescita di AAA⁴⁸.

È importante che le coorti esterne replichino l'efficacia del nostro pannello di biomarcatori. Questo richiederà sforzi dedicati per misurare l'FMD oltre al fatto di raccogliere campioni di plasma poveri di piastrine in coorti AAA reclutate in modo prospettico, poiché questi non possono essere estratti da studi retrospettivi. Ci auguriamo che questo lavoro serva da primer per generare interessi nella comunità chirurgica vascolare e stimoli gli sforzi futuri per convalidare l'algoritmo di previsione.

I metodi di previsione della crescita dell'AAA consentiranno infine una stratificazione personalizzata della frequenza di sorveglianza dell'AAA e proteggeranno i pazienti da interventi chirurgici non necessari che potrebbero essere parzialmente guidati da incentivi finanziari. Uno strumento per prevedere la crescita degli AAA consente quindi di assicurare i pazienti e di informare meglio sulla frequenza del controllo dell'aneurisma. Questa ricerca fornirà uno strumento importante per la comunità vascolare di tutto il mondo.

BIBLIOGRAFIA

1. Kent KC. Clinical practice. Abdominal aortic aneurysms. *N Engl J Med* 2014; 371: 22.
2. Abdul-Hussien H, Hanemaaijer R, Klemann R, et al., The pathophysiology of abdominal aortic aneurysm growth: corresponding and discordant inflammatory and proteolytic processes in abdominal aortic and popliteal artery aneurysms. *J Vasc Surg* 2010; 51: 1479-87.
3. Erbel R, Eggebrecht H. Aortic dimensions and the risk of dissection. *Heart* 2006; 92: 137-42.
4. Klink A, Hyafil F, Rudd J, et al. Diagnostic and therapeutic strategies for small abdominal aortic aneurysms. *Nat Rev Cardiol* 2011; 8: 338-47.
5. NIHR. Abdominal aortic aneurysm screening for women is unlikely to be a fair use of NHS resources. 2018. doi: 10.3310/signal-000676.
6. Hellenthal FA, Buurman WA, Wodzig WK, Schurink GW. Biomarkers of AAA progression. Part 1: extracellular matrix degeneration. *Nat Rev Cardiol* 2009; 6: 464-74.
7. Hellenthal FA, Buurman WA, Wodzig WK, Schurink GW. Biomarkers of abdominal aortic aneurysm progression. Part 2: inflammation. *Nat Rev Cardiol* 2009; 6: 543-52.
8. Michel JB. Contrasting outcomes of atheroma evolution: intimal accumulation versus medial destruction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1389-92.
9. Wang Y, Aitt-Houfella H, Herbin O, et al. TGF- β activity protects against inflammatory aortic aneurysm progression and complications in angiotensin II-infused mice. *J Clin Invest* 2010; 120: 422-32.
10. Tieu BC, Lee C, Sun H, et al. An adventitial IL-6/MCP1 amplification loop accelerates macrophage-mediated vascular inflammation leading to aortic dissection in mice. *J Clin Invest* 2009; 119: 3637-51.
11. Gräbner R, Lötzer K, Döpping S, et al. Lymphotoxin beta receptor signaling promotes tertiary lymphoid organogenesis in the aorta adventitia of aged ApoE^{-/-} mice. *J Exp Med* 2009; 206: 233-48.
12. Thaunat O, Nicoletti A. Lymphoid neogenesis in chronic rejection. *Curr Opin Organ Transplant* 2008; 13: 16-9.
13. Folkesson M, Kazi M, Zhu C, et al. Presence of NGAL/MMP-9 complexes in human abdominal aortic aneurysms. *Thromb. Haemost* 2007; 98: 427-33.
14. Fontaine V, Touat Z, Mtairag EM, et al. Role of leukocyte elastase in preventing cellular re-colonisation of the mural thrombus. *Am J Pathol* 2004; 164: 2077-87.
15. Houard X, Ollivier V, Louedec L, Michel JB, Bäck M. Differential inflammatory activity across human abdominal aortic aneurysms reveals neutrophil-derived leukotriene B4 as a major chemotactic factor released from the intraluminal thrombus. *FASEB J* 2009; 23: 1376-83.
16. Eliason JL, Hannawa KK, Ailawadi G, et al. Neutrophil depletion inhibits experimental abdominal aortic aneurysm formation. *Circulation* 2005; 112: 232-40.
17. Pagano MB, Bartoli MA, Ennis TL, et al. Critical role of dipeptidyl peptidase I in

- neutrophil recruitment during the development of experimental abdominal aortic aneurysms. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 2855-60.
18. Sun J, Sukhova GK, Yang M, et al. Mast cells modulate the pathogenesis of elastase-induced abdominal aortic aneurysms in mice. *J Clin Invest* 2007; 117: 3359-68.
 19. Norman PE, Davis TM, Le MT, Golledge J. Matrix biology of abdominal aortic aneurysms in diabetes: mechanisms underlying the negative association. *Connect Tissue Res* 2007; 48: 125-31.
 20. Fontaine V, Jacob MP, Houard X, et al. Involvement of the mural thrombus as a site of protease release and activation in human aortic aneurysms. *Am J Pathol* 2002; 161: 1701-10.
 21. Lederle FA, Wilson SE, Johnson GR, et al. Immediate repair compared with surveillance of small abdominal aortic aneurysms. *N Engl J Med* 2002; 346: 1437-44.
 22. Houard X, Rouzet F, Touat Z, et al. Topology of the fibrinolytic system within the mural thrombus of human abdominal aortic aneurysms. *J Pathol* 2007; 212: 20-8.
 23. Kent KC, Zwolak RM, Egorova NN, et al. Analysis of risk factors for abdominal aortic aneurysm in a cohort of more than 3 million individuals. *J Vasc Surg* 2010; 52: 539-48.
 24. Bengtsson H, Bergqvist D, Sternby NH. Increasing prevalence of abdominal aortic aneurysms: a necropsy study. *Eur J Surg* 1992; 158: 19-23.
 25. Forsdahl SH, Singh K, Solberg S, Jacobsen BK. Risk factors for abdominal aortic aneurysms: a 7-year prospective study: the Tromsø Study, 1994-2001. *Circulation* 2009; 119: 2202-8.
 26. Brady AR, Thompson SG, Fowkes FGR, Greenhalgh RM, Powell JT. Abdominal aortic aneurysm expansion: risk factors and time intervals for surveillance. *Circulation* 2004; 110: 16-21.
 27. Blanchard JF. Epidemiology of abdominal aortic aneurysms. *Epidemiol Rev* 1999; 21: 207-21.
 28. Reddy HK, Koshy SKG, Wasson S, et al. Adaptive-outward and maladaptive-inward arterial remodeling measured by intravascular ultrasound in hyperhomocysteinemia and diabetes. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2006; 11: 65-76.
 29. Vänni V, Turtiainem G, Hakala T, et al. Vascular comorbidities and demographics of patients with ruptured abdominal aortic aneurysms. *Surgery* 2015; 159: 1191.
 30. Parodi JC, Palmaz JC, Barone HD. Transfemoral intraluminal graft implantation for abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg* 1991; 5: 491-9.
 31. Volodos NL, Karpovich IP, Shekhanin VE, Troian VI, Iakovenko LF. A case of distant transfemoral endoprosthesis of the thoracic artery using a self-fixing synthetic prosthesis in traumatic aneurysm. *Grud Khir* 1988; 6: 84-6.
 32. GlobeNewsWire. Aortic Stent Graft Market Set to Exceed \$3.7 Billion by 2024. 2019.
 33. Chaikof EL, Brewster DC, Dalman RL, et al. SVS practice guidelines for the care of patients with an abdominal aortic aneurysm: executive summary. *J Vasc Surg* 2009; 50: 880-96.
 34. The RESCAN Collaborators. Surveillance intervals for small abdominal aortic aneurysms: a meta-analysis. *JAMA* 2013; 309: 806-13.
 35. Public Health England. NHS Abdominal Aortic Aneurysm Screening Programme. 2016.
 36. Wanhainen A, Verzini F, Van Herzelee I, et al. ESVS Clinical Practice Guidelines on the Management of Abdominal Aorto-iliac Artery Aneurysms. *EJVES* 2019; 57: 8-93.
 37. GOV.UK. Official Statistics Abdominal aortic aneurysm screening: 2018 to 2019 data.
 38. Moxon JV, Parr A, Emeto T, Walker P, Norman PE, Golledge J. Diagnosis and monitoring of abdominal aortic aneurysm: current status and future prospects. *Curr Probl Cardiol* 2010; 35: 512-48.
 39. Kurvers H, Veit FJ, Lipsitz EC, et al. Discontinuous, staccato growth of abdominal aortic aneurysms. *J Am Coll Surg* 2004; 199: 709-15.
 40. Hellenthal FAMVI, Buurman WA, Wodzig WKWh, Shurink GWH. Biomarkers of abdominal aortic aneurysm progression. Part 2: inflammation. *Nat Rev Cardiol* 2009; 6: 543-52.
 41. Lee R, Jones A, Cassimjee I, Handa A. Patients' opinions regarding research and management of abdominal aortic aneurysms. *Int Angiol* 2017; 36: 526-30.

42. Tunon J, Martin-Ventura JL, Blanco-Colio ML, Lorenzo O, Lopez JA, Egido J. Proteomic strategies in the search of new biomarkers in atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55: 2009-16.
43. Golledge J, Tsao PS, Dalman RL, Norman PE. Circulating markers of abdominal aortic aneurysm presence and progression. *Circulation* 2008; 118: 2382-92.
44. Houard X, Touat Z, Ollivier V, et al., Mediators of neutrophil recruitment in human abdominal aortic aneurysms. *Cardiovasc Res* 2009; 82: 532-41.
45. Charles P, Lapolla P, Cassimjee I, et al. Integrated Physiological and Biochemical Assessments for the Prediction of Growth of Abdominal Aortic Aneurysms in Humans. *Ann Surg* 2019; 270: e1-e3.
46. Fillinger MF, Raghavan ML, Marra SP, et al. In vivo analysis of mechanical wall stress and abdominal aortic aneurysm rupture risk. *J Vasc Surg* 2002; 36: 589-97.
47. Raghavan ML, Vorp DA. Toward a biomechanical tool to evaluate rupture potential of abdominal aortic aneurysm: identification of a finite strain constitutive model and evaluation of its applicability. *J Biomech* 2000; 33: 475-82.
48. Duellman T, Warren CL, Matsumura J, et al. Analysis of multiple genetic polymorphisms in aggressive-growing and slow-growing abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 2014; 60: 613-21.e3.

Sintesi della Tesi di Laurea discussa il 28 aprile 2021

Dott. Pierfrancesco Lapolla, Facoltà di Farmacia e Medicina, Dipartimento di Chirurgia "Pietro Valdoni", "Sapienza" Università di Roma; Nuffield Department of Surgical Sciences, University of Oxford, John Radcliffe Hospital, Oxford, UK

Dott. Andrea Mingoli, Dipartimento di Chirurgia "Pietro Valdoni", "Sapienza" Università di Roma

Prof. Lee Regent, Nuffield Department of Surgical Sciences, University of Oxford, John Radcliffe Hospital, Oxford, UK

Per la corrispondenza:
lapollalosasso.1526391@studenti.uniroma1.it