

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELL'INSUBRIA

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

Dottorato di Ricerca in Chirurgia e Biotecnologie chirurgiche

Direttore: Prof. Lorenzo DOMINIONI



**Vasospasmo cerebrale post-emorragico.  
Studio farmacologico dei meccanismi di  
vasodilatazione a livello del poligono di Willis.  
Studio morfologico della microcircolazione corticale  
e sue relazioni con eventi ischemici tardivi.**

Relatore:

Chiar.mo Prof. Giustino TOMEI

Tesi di Dottorato di:

Stefano PERON

Anno Accademico 2012-2013



## Indice

1. Introduzione
2. Il vasospasmo post-emorragico:
  - Fisiopatologia e meccanismi patogenetici
3. Vasospasmo post-emorragico sperimentale:
  1. Modello sperimentale: materiali e metodi
  2. Studio farmacologico: gli endocannabinoidi
    - a. Studio recettoriale
    - b. Studio flussimetrico
  3. Discussione
4. La microcircolazione cerebrale:
  1. Studio morfologico: materiali e metodi
  2. Studio morfologico-morfometrico
    - a. Risultati
    - b. Discussione
  3. Studio morfologico-ultrastrutturale
    - a. Risultati
    - b. Discussione
5. Conclusioni
6. Bibliografia

## 1. Introduzione

La principale conseguenza di un'emorragia subaracnoidea (ESA), per coloro che sopravvivono al sanguinamento iniziale, è un tardivo e persistente vasospasmo delle arterie intracraniche che occorre generalmente tra la 3° e la 14° giornata dall'evento emorragico e che esita in un'ischemia cerebrale sintomatica in circa il 40% dei casi.

Il vasospasmo è ancora oggi considerato la principale causa di disabilità nei pazienti post-ESA. Nonostante numerose ed estese ricerche, sia sperimentali che cliniche, i meccanismi che portano allo sviluppo del vasospasmo non sono ancora stati pienamente compresi.

Una disfunzione dell'endotelio, che risulta in una aumentata produzione di elementi vasocostrittori, così come cambi fenotipici dei recettori nell'endotelio e nelle cellule muscolari lisce, un'aumentata sensibilità delle cellule muscolari lisce vascolari ai vasocostrittori, il rilascio di prodotti spasmogeni dal coagulo ematico lisato e una risposta infiammatoria della parete vascolare sono stati più volte dimostrati e discussi come meccanismi fondamentali nello sviluppo dello spasmo.

Nella fase acuta post-emorragica hanno inizio la maggior parte delle cascate di eventi e meccanismi patogenetici biomolecolari responsabili dello spasmo. Tali meccanismi rappresentano il bersaglio principale della maggior parte degli studi

sperimentali fino ad oggi eseguiti nel tentativo di trovare possibilità di prevenzione o trattamento del vasospasmo.

E' a tale livello che si può verosimilmente pensare di ottenere dei risultati, ovvero tentando di antagonizzare o bloccare da subito una o più delle vie biomolecolari che portano allo spasmo, rallentando le cascate di eventi che conducono, nei giorni successivi, alla comparsa di eventi ischemici tardivi, spesso clinicamente evidenti.

Tra le molecole con proprietà di vasodilatazione che sono state studiate a tale scopo, gli endocannabinoidi sembrano rappresentare un interessante e promettente approccio al "problema" vasospasmo, almeno da un punto di vista biomolecolare.

Il progetto di ricerca si è dunque inizialmente proposto di effettuare indagini farmacologiche, basandosi su presupposti di tipo recettoriale e quindi su studi di tipo flussimetrico, allo scopo di analizzare le modificazioni a carico della circolazione cerebrale in un modello sperimentale di vasospasmo post-emorragico.

Negli anni recenti molta attenzione è stata attribuita ai cambi funzionali e strutturali che si verificano a livello della microcircolazione cerebrale, ovvero delle arterie e arteriole corticali e perforanti, e un nuovo concetto di spasmo microvascolare sta evolvendo.

Studi sperimentali su modelli di ESA nei ratti suggeriscono fortemente che le disfunzioni microcircolatorie e il vasospasmo sono correlati alla severità dell'evento ischemico acuto iniziale, causato da una riduzione critica, anche se transitoria, della pressione di perfusione cerebrale (PPC) e da un'attiva vasocostrizione immediatamente dopo il sanguinamento.

Sulla base dei risultati ottenuti dalle indagini farmacologiche, si è quindi deciso di rivolgere l'attenzione alle modificazioni a carico della microcircolazione corticale, in quanto verosimilmente la maggiore responsabile degli eventi ischemici tardivi. A tale scopo sono state eseguite, per il momento solo a livello preliminare, indagini morfologiche, sia in microscopia ottica che elettronica.

## 2. Il vasospasmo post-emorragico

Il vasospasmo cerebrale è definito come un patologico restringimento del lume vasale, in grado di coinvolgere sia le grosse arterie cerebrali extraparenchimali sia quelle più piccole intraparenchimali.

Frequentemente causato da un'ESA conseguente alla rottura di un aneurisma cerebrale, il vasospasmo può verificarsi anche in esiti di trauma cranico, resezione tumorale, meningite, o come complicanza di procedure diagnostiche<sup>87</sup>.

In circa il 70% dei pazienti che sopravvivono all'emorragia si sviluppa un vasospasmo delle arterie cerebrali extraparenchimali, in particolare nei successivi 4-7 giorni. Nel 40% dei casi il vasospasmo è asintomatico mentre il restante 30% soffre di un deficit ischemico tardivo (*DID, delayed ischemic deficit*) che rappresenta la causa principale di morbidità in questi pazienti<sup>38</sup>. Si stima che solo il 20-35% dei pazienti che hanno sperimentato la rottura di un aneurisma intracranico vada incontro a un recupero neurologico accettabile (Glasgow Outcome Score 4 o 5).

Nonostante recenti e interessanti progressi in terapia intensiva e nei trattamenti medici e chirurgici, il vasospasmo cerebrale continua ad essere un fattore fondamentale nel determinare la mortalità e morbidità dei pazienti con ESA.

Dato l'impatto fino ad ora limitato delle misure preventive, interventi più aggressivi si sono spesso resi necessari. Esistono parecchie discussioni su il momento più indicato per intervenire, ma l'obiettivo resta sempre quello di migliorare il flusso

ematico cerebrale (cerebral blood flow – CBF), per far regredire o attenuare il DID con meno effetti avversi possibili<sup>8,37,60,76</sup>. Tra questi interventi ricordiamo in particolare:

- ✓ terapia medica emodinamica (HHT - hypervolemic hypertensive therapy):
- ✓ terapia endovascolare:
  - a. angioplastica transluminale con palloncino (TBA, transluminal balloon angioplasty):
  - b. vasodilatatori intra-arteriosi (nimodipina, papaverina):

Una serie numerosa di nuove terapie sono state oggetto o sono tuttora in fase di studio e di sviluppo<sup>25</sup>. Tra queste citiamo soltanto: il magnesio solfato, le statine, i donatori di ossido nitrico, gli ET-1 antagonisti.



## Fisiopatologia e meccanismi patogenetici

L'eziologia e la patogenesi del vasospasmo cerebrale sono state studiate per oltre 50 anni, con la prima descrizione clinica fatta da Ecker nel 1951.

Dalla prima dimostrazione angiografica del vasospasmo, avvenuta circa 55 anni fa, molti studi sperimentali e clinici sono stati intrapresi per cercare di comprendere i meccanismi responsabili di questa persistente vasocostrizione arteriosa al fine di trovare un adeguato ed efficace trattamento in termini di prevenzione o regressione. Nonostante tutti gli sforzi un trattamento farmacologico realmente efficace non è stato ancora trovato.

Gli studi sperimentali si sono a lungo spesi, almeno inizialmente, nel tentativo di bloccare i recettori possibilmente coinvolti nella patogenesi del vasospasmo<sup>1,2,63,68,77</sup>. Nonostante ciò, nessuno degli antagonisti ai recettori, da solo o in combinazione, si è dimostrato efficace nell'uomo. Ciò non è così sorprendente considerando il fatto che il vasospasmo è noto essere un processo multifattoriale che coinvolge differenti alterazioni patologiche in periodi differenti. In aggiunta all'eziologia multifattoriale dello spasmo, gli agenti causativi sembrano lavorare sinergicamente<sup>34,83</sup>. Hempelmann, per esempio, suggerì che l'endotelina-1 (ET-1) e il trombossano A2 potrebbero promuovere direttamente il vasospasmo non solo grazie al loro effetto contrattile intrinseco, ma anche tramite potenziamento delle risposte a diverse sostanze endogene, come per esempio la serotonina.

In condizioni fisiologiche, il tono muscolare dei vasi è regolato da fattori di rilasciamento e da fattori di contrazione, entrambe endotelio-derivati e dipendenti da pressione o stiramento a carico dell'endotelio stesso<sup>9,64,71</sup>.

Il più importante fattore miorilassante è rappresentato dall'*ossido nitrico* (NO), sintetizzato dalla NO-sintetasi (NOs) endoteliale, che incrementa i livelli di cGMP nelle cellule del muscolo liscio vascolare<sup>3,61,69</sup>. Ulteriori fattori miorilassanti sono rappresentati dalle prostaglandine e le prostacicline. Il fattore costrittore più potente è invece l'*endotelina* (ET) che attiva la fosfolipasi-C portando a un aumento del  $Ca^{2+}$  intracellulare<sup>51</sup>. L'evento centrale nella contrazione muscolare è comunque sempre rappresentato dall'aumento della concentrazione di  $Ca^{2+}$  intracellulare che attiva la calmodulina e quindi la chinasi della catena leggera della miosina (MLCK, myosin light chain kinase). Nelle arterie spastiche da vasospasmo tardivo dopo ESA, tuttavia, il livello a riposo del  $Ca^{2+}$  non è chiaramente elevato e l'omeostasi del  $Ca^{2+}$  è disturbata, suggerendo che la fase sostenuta di contrazione del muscolo liscio è  $Ca^{2+}$ -indipendente. Si può pertanto affermare che la contrazione del muscolo liscio è un processo di eventi molecolari sia  $Ca^{2+}$ -dipendenti sia  $Ca^{2+}$ -indipendenti. Le cascate di segnali intracellulari che portano a tale contrazione sono attivate da sostanze rilasciate durante l'ESA quali ossiemoglobina, ET, trombossano, ATP e serotonina<sup>44</sup>.

Anche i *canali del  $K^+$*  rappresentano un ulteriore possibile meccanismo di regolazione del tono vascolare cerebrale, in senso di un rilasciamento muscolare favorito da una iperpolarizzazione di membrana con chiusura dei canali del  $Ca^{2+}$  e riduzione del  $Ca^{2+}$  intracellulare<sup>43,82</sup>.

Un'altra fondamentale componente in grado di agire sulla contrazione della muscolatura vascolare è quella rappresentata dall'*innervazione dei vasi cerebrali* stessi. Esiste un consenso generale sulla partecipazione del sistema nervoso nella regolazione della circolazione cerebrale. Sono stati descritti nervi perivascolari di tipo simpatico, parasimpatico e sensoriale, con i rispettivi neurotrasmettitori.

Tale innervazione permette un fine meccanismo regolatorio del CBF, che ha la capacità di adattarsi alle molteplici condizioni fisiologiche e contrastare entro certi limiti le loro variazioni<sup>9,24</sup>.

Dal punto di vista topografico distinguiamo un sistema di innervazione perivascolare intrinseco, centrale, e uno estrinseco, periferico, che è quello più direttamente coinvolto nella regolazione dello spasmo arterioso. Le fibre del sistema estrinseco innervano le arterie extracerebrali (arterie carotidi e vertebrali, arteria basilare, circolo di Willis, arterie piali) e sono suddivise in tre componenti: simpatica e parasimpatica (efferenti), e sensoriale (afferenti).

Il sistema di innervazione simpatica agisce tramite neurotrasmettitori specifici quali la noradrenalina e il neuropeptide-Y (NPY), così come la serotonina, esercitando un effetto vasocostrittore.

Un'azione di neuromodulazione e vasodilatazione è invece esercitata dal sistema parasimpatico, in particolare attraverso il rilascio di acetilcolina e VIP (polipeptide intestinale vasoattivo), oltre che di ossido nitrico (NO), isolato quest'ultimo nei nervi cerebrovascolari che originano dal ganglio sfenopalatino.

Infine, le *fibre nervose sensitive*, anche chiamate "fibre vasomotorie", esprimono un importante effetto di vasodilatazione tramite il rilascio nella parete vascolare,

mediante riflesso assonale, di sostanze quali CGRP (calcitonin gene-related peptide), sostanza P, e neurochinina A<sup>33</sup>.

Negli anni più recenti, la ricerca sul vasospasmo cerebrale post-ESA ha concentrato le sue attenzioni sui processi fisiologici e patofisiologici che occorrono nell'*endotelio*<sup>16,22,45,57</sup>. Diversi lavori sostengono infatti la teoria per la quale l'integrità dell'*endotelio* è fondamentale per l'omeostasi cerebrale e una sua disfunzione potrebbe essere coinvolta in numerosi processi patologici, per esempio lo spasmo<sup>12,40</sup>.

Le cellule endoteliali sintetizzano ET, prostaglandine, NO, prostaciline, radicali dell'anione superossido e un fattore iperpolarizzante endotelio-derivato, dove i primi due hanno effetto vasocostrittore e i seguenti vasodilatatore. E' più volte suggerito che un disequilibrio tra questi due gruppi può portare al vasospasmo cerebrale<sup>13</sup>.

Su tutti l'ET è la sostanza più ampiamente studiata e in particolare l'ET-1 sembra avere un effetto più marcato sulle arterie cerebrali rispetto alle altre due forme (ET-2, ET-3)<sup>42,73</sup>. Elevati livelli di ET-1 sono stati infatti dimostrati nel plasma e nel liquor cerebro-spinale (cerebro spinal fluid - CSF) di pazienti dopo ESA e dopo DID. L'ET-1 agisce dal lato avventiziale e non da quello luminale delle arterie cerebrali e il suo effetto di vasocostrizione potrebbe essere contrastato da antagonisti selettivi al recettore<sup>11,41</sup>.

Un altro meccanismo frequentemente studiato è il sistema dell'NO<sup>31,32</sup>. L'emoglobina (Hb) gradualmente rilasciata dagli eritrociti nello spazio

subaracnoideo distrugge la NOs neuronale presente nell'avventizia dei vasi cerebrali privando le arterie di NO e quindi favorendo l'inizio dello spasmo tardivo. A questo contribuisce poi un danneggiamento diretto dell'endotelio con perdita delle giunzioni serrate intercellulari e, conseguentemente, della NOs endoteliale, con impossibilità alla sintesi di NO<sup>10</sup>.

### 3. Vasospasmo post-emorragico sperimentale

#### 1. Modello sperimentale: materiali e metodi

L'ESA può essere indotta negli animali da esperimento sia attraverso iniezione di sangue fresco autologo o emolisato nello spazio subaracnoideo (*single injection model*) a livello della cisterna magna o pre-chiasmatica, sia tramite perforazione endovascolare della porzione intracranica della arteria carotide interna (*perforation model*), sia tramite puntura dell'arteria basilare. Esiste poi una versione modificata del primo modello che prevede una doppia iniezione intracisternale di sangue a un intervallo di due giorni tra loro (*double injection model*).<sup>17,19,33,36,46,47,53,58,62,75</sup>

Ciascuno dei modelli differisce dagli altri in termini sia di severità dell'ischemia acuta sia di vasospasmo, così come di mortalità.

Il principale vantaggio del modello di iniezione intracisternale, da noi utilizzato, è che la mortalità è molto bassa: 0% nel modello a singola iniezione, 9% in quello a doppia iniezione<sup>19,62</sup>. Il principale svantaggio è invece rappresentato dal fatto che non si ha un danno vascolare che sappiamo essere importante per i processi patologici tanto nell'arteria di grosso calibro che viene perforata come nei microvasi più a valle.

Per la messa a punto del nostro modello sperimentale di vasospasmo cerebrale post-emorragico abbiamo utilizzato ratti Wistar del peso di circa 350 g ciascuno.

Gli animali sono stati inizialmente anestetizzati mediante somministrazione intraperitoneale di ketamina cloridrato (100 mg/kg) + xilazina cloridrato (10 mg/kg) a una dose peso-dipendente.

Una volta assicurata la totale assenza di vigilanza e sensibilità dell'animale, tramite incisione verticale dello scalpo si è provveduto a esporre la teca cranica fino alla squama dell'occipite potendosi così evidenziare le suture coronarica, sagittale e lambdoidea e, ancora più posteriormente, la membrana atlo-occipitale.

E' stata quindi posizionata a livello della squama dell'occipite una microsonda laser-Doppler a fibre ottiche collegata ad un computer per la registrazione del CBF distrettuale. Successivamente si è provveduto a prelevare 0,2 ml di sangue autologo dall'arteria femorale del ratto e con tecnica stereotassica si è proceduto all'iniezione del sangue in cisterna magna tramite puntura della membrana atlo-occipitale, con un tempo di iniezione di circa 15 secondi. Si è quindi registrato l'andamento del CBF per circa 30 minuti.

I controlli sono stati eseguiti mediante puntura stereotassica della membrana atlo-occipitale, prelievo e successiva re-iniezione di CSF.

## 2. Studio farmacologico: gli endocannabinoidi

Gli endocannabinoidi rappresentano una nuova classe di mediatori lipidici, eicosanoidi, isolati dal cervello e dai tessuti periferici nel corso dell'ultimo decennio. Essi hanno in comune la capacità di legarsi ai recettori cannabinoidi, gli stessi con cui interagiscono i fitocannabinoidi.

Il primo endocannabinoide ad essere stato identificato, nel 1992, è stato l'anandamide (AEA), seguito dal 2-arachidonoilglicerolo (2-AG). Più recentemente sono stati identificati almeno altri tre cannabinoidi endogeni: il 2-arachidonilgliceril-etero (noladin, 2-AGE), analogo strutturale del 2-AG, la virodamina e la N-arachidonoildopamina (NADA). Questi mediatori lipidici, insieme con i recettori dei cannabinoidi e i correlati processi di sintesi, trasporto e degradazione, costituiscono il cosiddetto sistema endocannabinoide<sup>26</sup>.

Quello degli endocannabinoidi costituisce un sistema di neuromodulazione in grado di regolare l'eccitabilità neuronale, mediante inibizione della comunicazione attraverso giunzioni serrate o mediante interazioni con le trasmissioni GABAergica, serotonergica, glutamatergica e dopaminergica.

Sulla base di ciò che è già noto si può ipotizzare un ruolo centrale da parte di queste molecole in numerose funzioni<sup>21</sup>. In particolare citiamo le proprietà antiemetiche, anticonvulsivanti, di modulazione dell'appetito, della spasticità, del dolore, della risposta immunitaria, dei processi riproduttivi.



L'azione vasodilatatoria e ipotensivante degli endocannabinoidi è stata chiamata in causa nella genesi dell'ipotensione associata a shock emorragico ed endotossinico, ma l'esatto ruolo fisiopatologico deve essere meglio approfondito.

I farmaci cannabinoidi hanno eccezionalmente potenti effetti ipotensivanti e vasodilatatori. Il loro meccanismo d'azione resta comunque controverso e i meccanismi fino ad ora proposti si focalizzano principalmente su effetti mediati dal recettore.

Due tipi principali di recettori cannabinoidi sono stati caratterizzati: il primo è stato isolato primariamente nel cervello (CB1), il secondo invece principalmente nelle cellule della linea mieloide (CB2). Entrambe i recettori hanno gli aspetti strutturali tipici dei recettori accoppiati alla proteina G, includendo i sette domini transmembrana<sup>29</sup>.

L'anandamide (*fig.1*), il primo cannabinoide endogeno a essere isolato, è stato ampiamente studiato e la maggior parte delle evidenze identifica i nervi sensitivi, l'endotelio, la modulazione di canali ionici e l'inibizione presinaptica del tono simpatico come fattori che contribuiscono ai suoi effetti di vasodilatazione<sup>17,24,27</sup>. In particolare, Herradon<sup>27</sup> mostrò un effetto vaso-rilasciante dell'anandamide endotelio-mediato specificando due possibili meccanismi: (a) l'azione su un recettore endoteliale non-CB1/non-CB2 che promuove la sintesi di NO e quindi la dilatazione del vaso; (b) il metabolismo da parte della FAAH (fatty acid amide hydrolase) che porta alla formazione di acido arachidonico, substrato della COX-2, e quindi alla formazione di una prostaglandina che legandosi al suo recettore (EP4) nel muscolo liscio vascolare causa vasodilatazione. Un lavoro di Dogulu<sup>17</sup> mostrò

invece, nell'arteria basilare di ratto, l'efficacia dell'anandamide nel superare l'effetto vasocostrittore indotto dall'ET-1 e nel prevenire il danno ultrastrutturale della parete vascolare ET-1 indotto.

Il *WIN 55,212-2* (*fig.2*), cannabinoide sintetico agonista al recettore CB1, produce vasodilatazione delle arterie mesenteriche di ratto sia attraverso un'attività CB1-mediata, sia con un'azione non mediata da stimolazione di CB1 o CB2 né dei recettori vanilloidi<sup>14,88</sup>.

Ciò indica che i meccanismi degli effetti vascolari dei cannabinoidi differiscono notevolmente tra loro nonostante abbiano tutti lo stesso endpoint. O'Sullivan<sup>56</sup> dimostrò, per esempio, che ci sono importanti differenze nei meccanismi d'azione a livello delle branche di 3° ordine dell'arteria mesenterica superiore e il ramo principale dell'arteria stessa, probabilmente in seguito alla non-espressione e/o al non-funzionamento del recettore cannabinoide endoteliale nelle arterie di grosso calibro oppure a una differente efficacia di ciascun cannabinoide sui diversi recettori. Inoltre, in tale lavoro mostrò che la prolungata esposizione al cannabinoide sintetico è accompagnata da una riduzione negli effetti vascolari tanto dei cannabinoidi endogeni come di quelli esogeni, questo verosimilmente attraverso meccanismi di down-regolazione e/o desensibilizzazione dei recettori o modificazioni nel segnale intracellulare.

Fig.1: anandamide

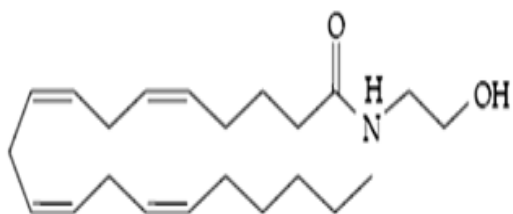
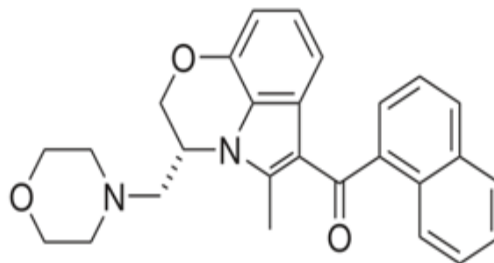


Fig.2: WIN 55,212-2



## a. Studio recettoriale

I meccanismi di tipo recettoriale CB1-mediati fino ad ora studiati sono numerosi e includono la regolazione del rilascio di noradrenalina dai nervi periferici, effetti sui canali del  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, azioni tardive sui canali del  $\text{K}^+$  nel muscolo liscio vascolare, e la regolazione dell'NO o del fattore iperpolarizzante endotelio-dipendente nell'endotelio vascolare<sup>4,18,23</sup>.

Esistono poi meccanismi non CB1-mediati che sembrano essere altrettanto implicati nell'effetto di vasodilatazione esercitato dagli endocannabinoidi. Herradon<sup>27</sup>, per esempio, nello suo studio sui meccanismi d'azione dell'anandamide, mediante l'utilizzo di antagonisti recettoriali e inibitori identificò un'azione mediata da un recettore non-CB1, localizzato a livello dell'endotelio, e che egli definì come recettore 'nonCB1-nonCB2'.

Altri autori, come per esempio Zygmunt<sup>88</sup>, proposero un ulteriore meccanismo d'azione mediato questa volta da un recettore vanilloide (transient potential vanilloid receptor-1 – TRPV1), la cui stimolazione a livello dei nervi sensitivi perivascolari determinerebbe il rilascio di CGRP, neurotrasmettitore con effetto vasodilatatorio.

Uno studio di Gebremedhin<sup>24</sup> del 1999 ha tentato di determinare l'espressione dei recettori cannabinoidi sulle cellule muscolari lisce vascolari per studiare le basi elettrofisiologiche della vasodilatazione cerebrale cannabinoide-indotta, in particolare determinando l'effetto degli agonisti sui canali del  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L e tentando

di verificare se il recettore CB1 media le azioni dei cannabinoidi sul tono vascolare cerebrale. Tale lavoro ha permesso di dimostrare che le cellule muscolari lisce dei vasi cerebrali di gatto esprimono il recettore CB1 e che l'applicazione di un agonista sintetico al CB1, il WIN-55,212-2, produce una potente e profonda inibizione della corrente del  $Ca^{2+}$ , in particolare agendo su canali tipo  $L^{23}$ . Fu poi dimostrato che agonisti al recettore CB1 mediano l'influsso di  $Ca^{2+}$  nelle cellule attraverso una via proteina-G-mediata, risultando nella diminuzione di  $Ca^{2+}$  intracellulare disponibile per la contrazione del muscolo liscio e quindi in un ridotto tono vascolare.

Il WIN-55,212-2 si è dimostrato essere il più efficace agonista al recettore CB1 nell'inibizione della corrente del  $Ca^{2+}$ ; altri endocannabinoidi, sia endogeni che esogeni, come l'anandamide o il THC (tetrahydrocannabinolo), hanno mostrato un'efficacia intrinseca inferiore.

Nonostante ciò, Dannert et al.<sup>14</sup> suggerirono che l'efficacia vasodilatante del WIN 55,212-2 fosse principalmente legata all'interazione di questo con i recettori vanilloidi, e che i classici recettori CB1 e CB2, così come il più nuovo recettore cannabinoide 'nonCB1-nonCB2', avessero una partecipazione minore in tale effetto. Quest'ultimo meccanismo d'azione che è stato ipotizzato per gli endocannabinoidi, oltre che per analoghi esogeni come il WIN 55,212-2, è infatti di tipo recettore CB1-indipendente e rappresentato dalla secrezione a livello dell'innervazione sensitiva perivascolare di neuropeptidi vasodilatatori, su tutti il CGRP, stimolata dall'interazione del cannabinoide con il recettore vanilloide.

La distribuzione immunoistochimica dei recettori cannabinoidi nel cervello di ratto fu studiata nel dettaglio da Tsou<sup>78</sup> nel 1998 usando specifici anticorpi purificati contro il terminale aminico del recettore CB1.

Immunoreattività al CB1 fu trovata negli assoni, nei corpi cellulari e nei dendriti in particolare a livello di strutture corticali, su tutte ippocampo e bulbo olfattorio, oltre a corpo striato, amigdala, cellule granulari del cervelletto, corteccia somatosensoriale, cingolata, peririnale, entorinale e piriforme, nel claustrum, nucleo accumbens e setto. Ancora fu trovata nel grigio periacqueduttale, nucleo del tratto solitario, nucleo e tratto trigeminale spinale e corna dorsali del midollo spinale.

In accordo alla loro morfologia e sede, le cellule contenenti immunoreattività per il CB1 sembrano essere identificabili con molti neuroni GABAergici, come per esempio molti interneuroni della formazione ippocampale, neuroni delle proiezioni striato-nigrali e striato-pallidali e le proiezioni alle cellule del Purkinje cerebellari<sup>4,78</sup>.

Tali osservazioni supportano precedenti lavori che già suggerivano una probabile funzione dei recettori CB1 a livello cerebrale nella modulazione dei neuroni GABAergici<sup>7</sup>.

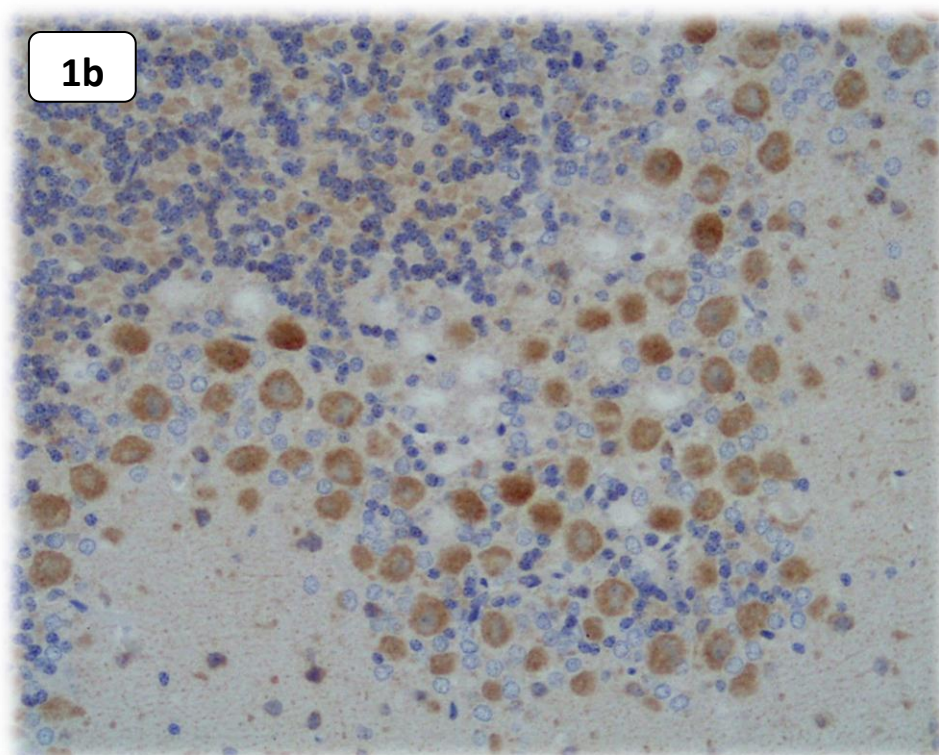
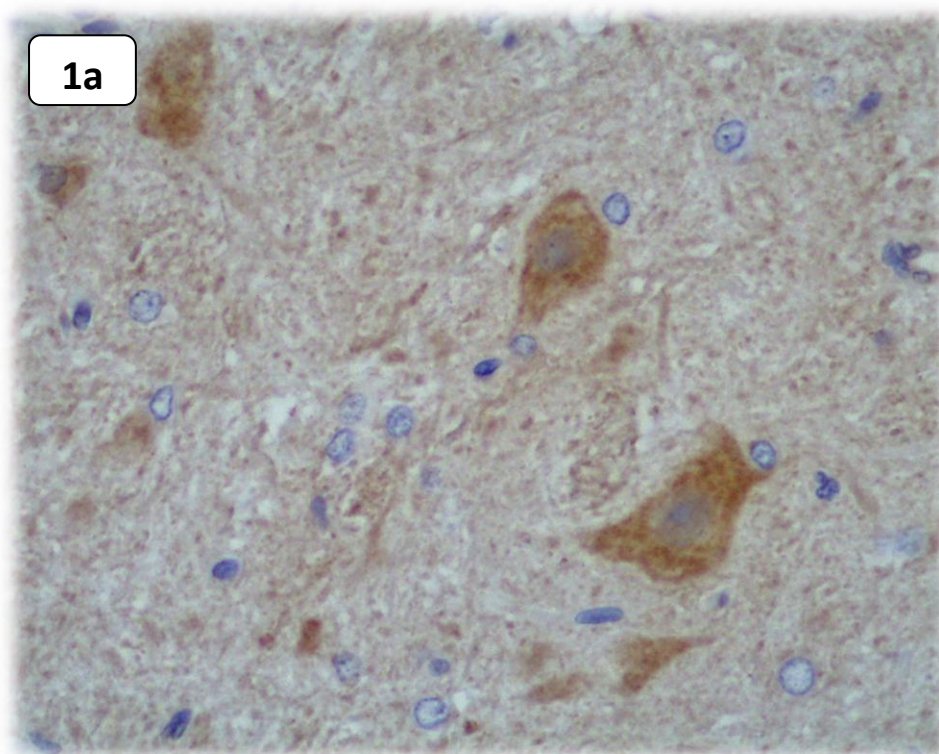
Sulla base dei dati presenti in letteratura, abbiamo eseguito un'**indagine immunoistochimica** della distribuzione del recettore CB1 sulle pareti delle arterie cerebrali di ratto, in particolare dell'arteria basilare. Per fare ciò abbiamo utilizzato un anticorpo specifico per il recettore CB1 degli endocannabinoidi (*anticorpo policlonale CB1-N15, Santa Cruz Biotechnology*).

La colorazione con diaminobenzidina ha permesso di dimostrare un'intensa espressione del recettore CB1 a livello neuronale, gangliare e delle cellule granulari

e del Purkinje del cervelletto (*Tav.1*), così come a livello della parete dell'arteria basilare. In particolare, una intensa immunoreattività, confermata da controlli a differente diluizione dell'anticorpo, è stata riscontrata su tutto lo spessore della parete del vaso, ma più fortemente in adiacenza della lamina elastica, ovvero a livello di intima e muscolo liscio. (*Tav.2*)

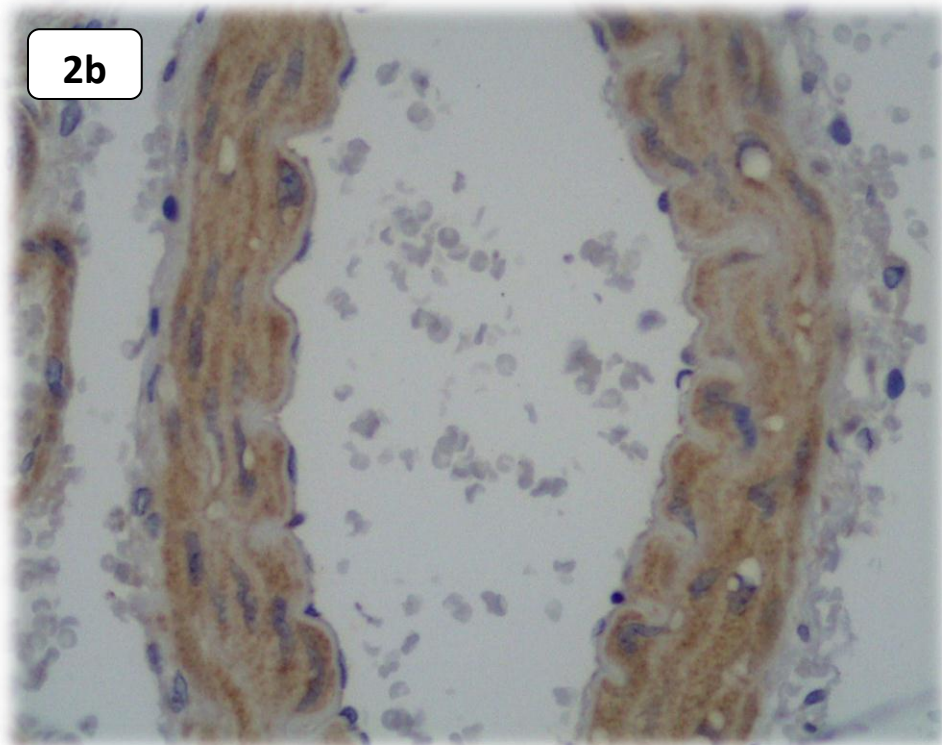
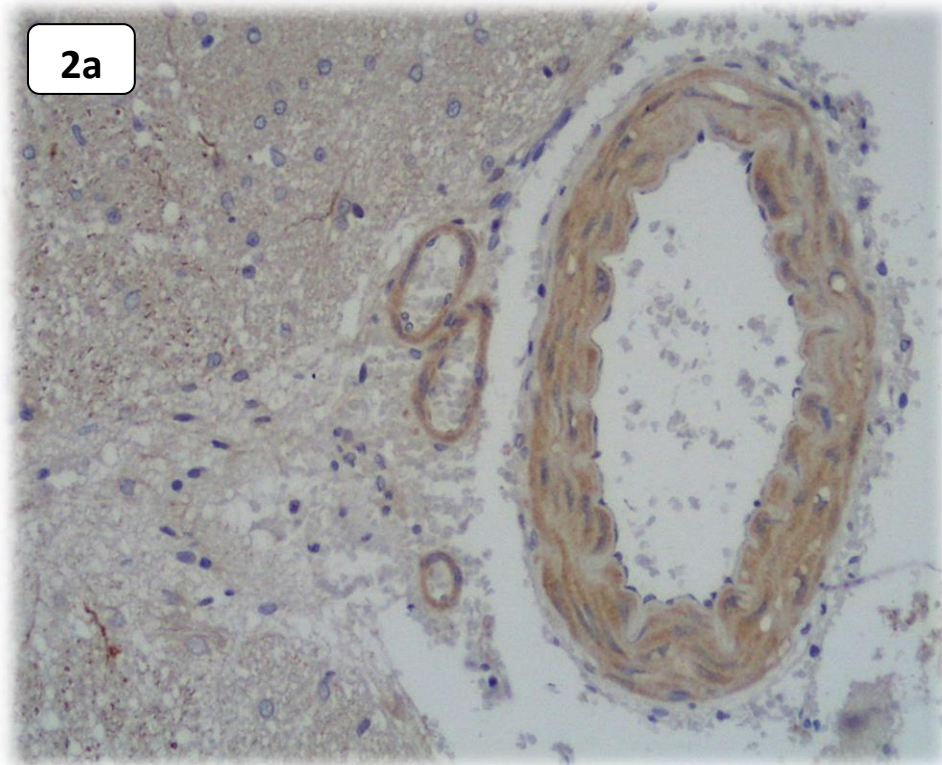
Grazie a tali risultati abbiamo ritenuto che i recettori CB1 potessero essere utilizzati come target per lo studio degli effetti e dei meccanismi d'azione di analoghi sintetici degli endocannabinoidi, in particolare il WIN 55,212-2, la cui azione di vasodilatazione CB1-mediata è stata più volte dimostrata.

Restava a questo punto da confermare se tali recettori fossero realmente gli agenti principali della vasodilatazione cannabinoide-correlata. E' infatti probabile che ciò possa accadere attraverso la modulazione dell'eccitabilità delle cellule muscolari, ovvero mediante l'effetto di secondi messaggeri sui canali ionici, similmente a quanto avviene con i recettori CB1 su altri tipi di cellule.



**Tav.1: identificazione del recettore CB1 (*marrone*) a livello neuronale (a) e delle cellule granulari del cervelletto (b).**





**Tav.2: identificazione del recettore CB1 (*marrone*) a livello della parete dell'arteria basilare di ratto (a), e dettaglio (b). Il recettore si localizza principalmente a livello dell'endotelio (intima) e della tonaca muscolare.**

## b. Studio flussimetrico

Studi flussimetrici del CBF nel vasospasmo post-emorragico sperimentale sono difficilmente recuperabili in letteratura<sup>74,80,84</sup>.

L'esatto meccanismo che soggiace alla riduzione del CBF non è ancora del tutto compreso e gli effetti deleteri sul CBF determinati dall'incremento acuto della PIC al momento dell'emorragia sono stati più volte ipotizzati e stressati, creando dubbi e perplessità sulla reale attendibilità di un'analisi flussimetrica in fase acuta<sup>35,36,66</sup>.

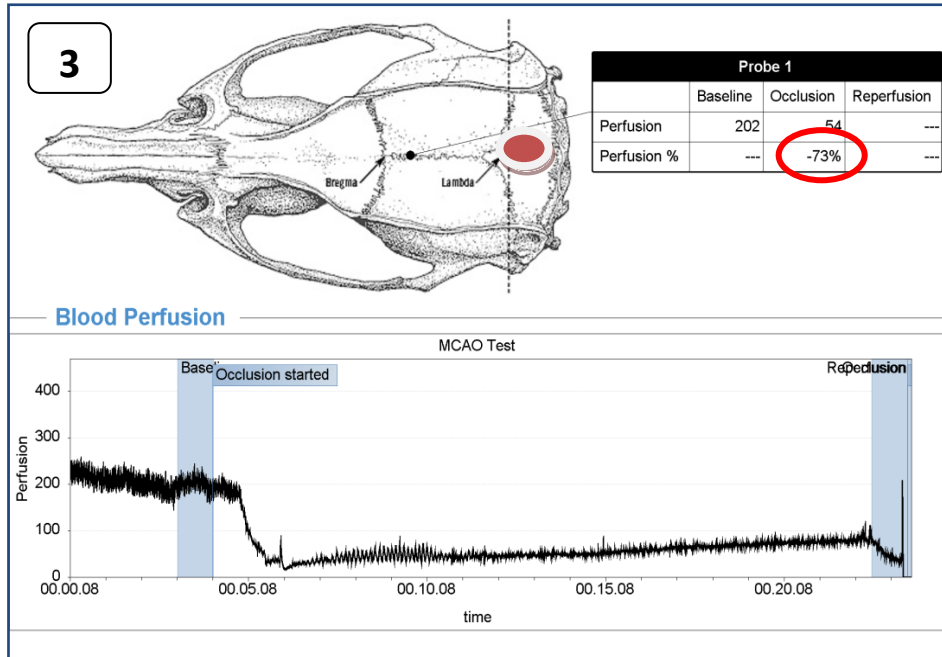
La flussimetria con sonda laser Doppler è l'unica tecnica che permette una registrazione in tempo reale delle modificazioni del CBF e sembra rappresentare uno strumento valido per lo studio dell'emodinamica cerebrale, sia sperimentale che clinica, dopo ESA. Le modificazioni del CBF rilevate sono infatti in accordo con le modificazioni assolute del CBF riscontrate utilizzando altre tecniche di indagine.

Come descritto da Prunell<sup>62</sup>, confrontando i differenti modelli sperimentali di vasospasmo, nel modello di perforazione del vaso il flusso ematico distrettuale si riduce fino al 10-15% del controllo e quindi torna ad aumentare lentamente fino al 60-70% del controllo dopo circa 60-90 minuti dall'emorragia. Nel modello di puntura dell'arteria basilare si dovrebbe verificare una riduzione acuta del flusso a circa il 30% del controllo, quindi il CBF ritorna lentamente fino al 60% del controllo nei successivi 60 minuti.

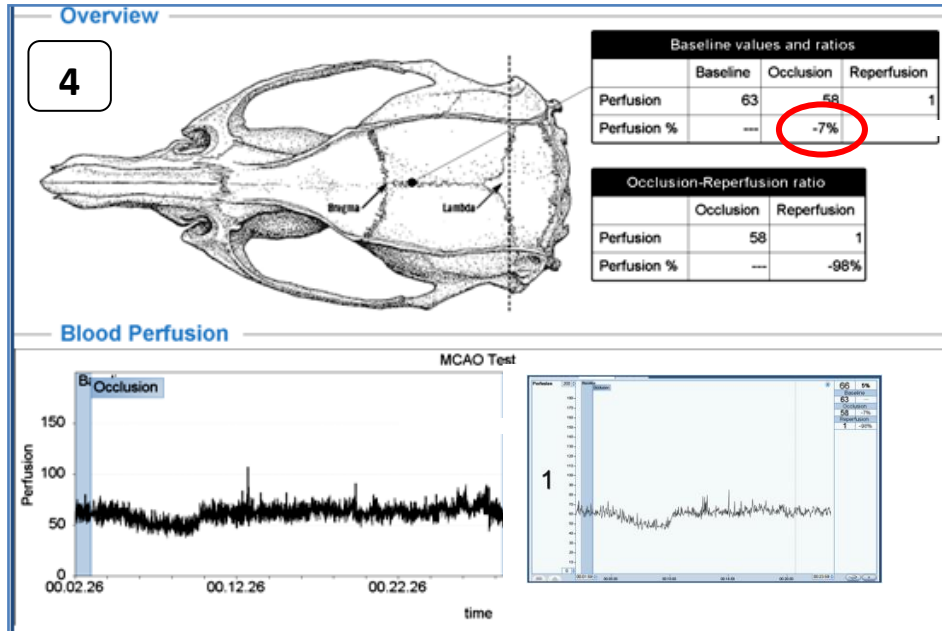
Il modello di *single injection* risulterebbe invece in una riduzione di breve durata del CBF fino al 35-40% rispetto al controllo; entro i successivi 15-20 minuti il CBF ritorna al 100%, o almeno all'80%, del valore controllo.

Le nostre registrazioni del CBF, eseguite tramite microsonda laser-Doppler posizionata sulla squama dell'occipite, ci hanno permesso di evidenziare una rapida riduzione del CBF pressoché immediatamente dopo l'iniezione del sangue autologo in cisterna magna. Tale riduzione è stata quantificata in circa il 30-35% rispetto a prima dell'iniezione, con un lento ma progressivo incremento del CBF nei successivi 30 minuti e fino a valori vicini all'85-90%. (*Tav.3*)

La registrazione del CBF eseguita sugli animali controllo, ovvero dopo iniezione in cisterna magna di CSF senza sangue, ha causato una rapida diminuzione del CBF nei primi 3-4 minuti con però un ritorno a valori pari al 95-100% del controllo nei successivi 5 minuti e con una riduzione mai superiore al 8-10%. (*Tav.4*)



Tav.3: riduzione del CBF dopo induzione dell'ESA (*pallino rosso*, sede di posizionamento della microsonda Doppler; *cerchio rosso*, entità della riduzione del CBF).



Tav.4: riduzione rapida del CBF dopo iniezione di CSF (*cerchio rosso*, entità della riduzione del CBF) e successivo rapido ritorno ai valori iniziali; tracciato completo della registrazione e dettaglio.

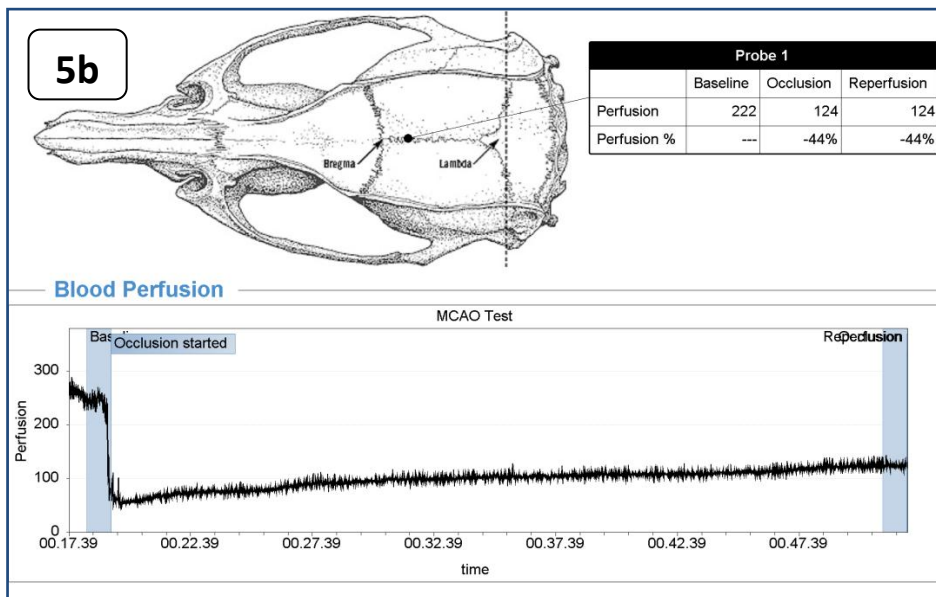
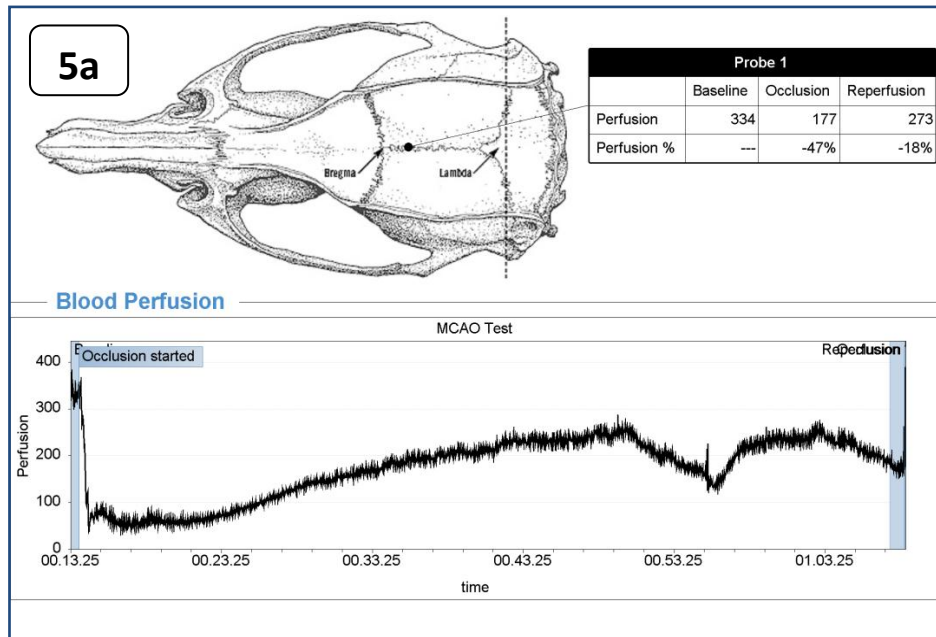
Alla luce di tali risultati, che oltre a confermare l'adeguatezza del nostro modello sperimentale sembrerebbero dimostrare la reale presenza di un vasospasmo acuto post-emorragico, si è dunque proceduto con la somministrazione del cannabinoide WIN 55,212-2. In particolare è stata valutata la sua azione sull'andamento del CBF.

Le indagini sono state eseguite tramite somministrazione intraperitoneale del WIN 55,212-22 e successiva induzione, a una distanza di 20 minuti e secondo modalità già descritte, dell'emorragia subaracnoidea. Si è quindi provveduto ad eseguire registrazione flussimetrica Doppler dell'andamento del CBF, rilevando e analizzando eventuali modificazioni indotte su di esso dal cannabinoide.

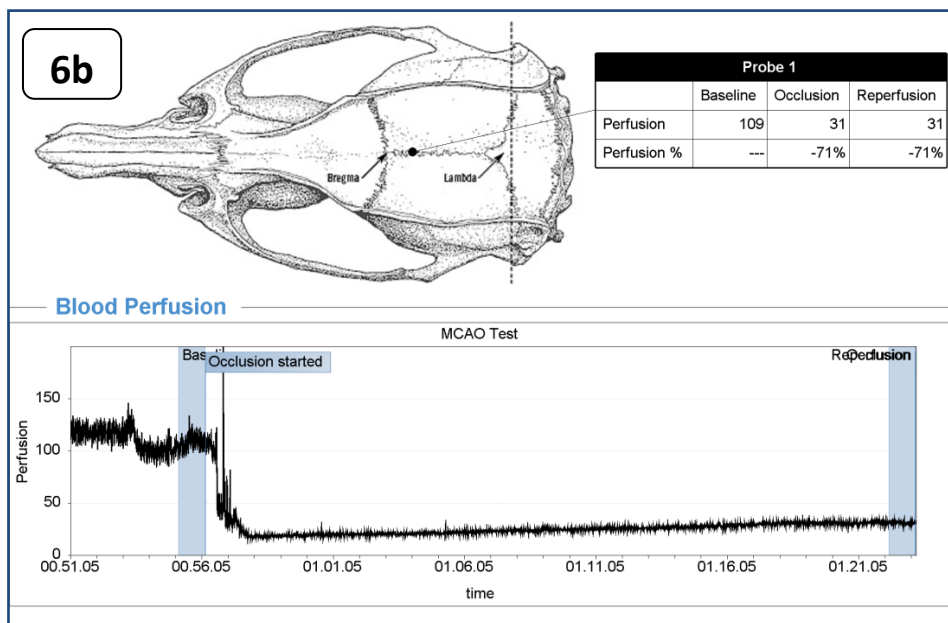
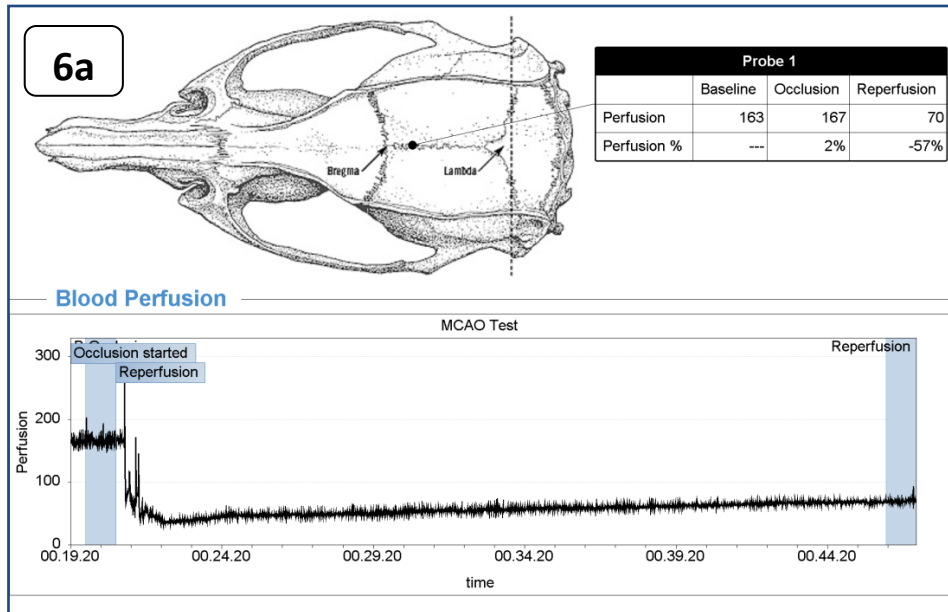
Le registrazioni effettuate hanno mostrato risultati contrastanti.

Sono stati infatti ottenuti tracciati da noi interpretati come 'positivi', nei quali si è assistito ad una buona ripresa del CBF, talvolta fino al 90% del valore iniziale, dopo somministrazione del WIN 55,212-22 (*Tav. 5a e 5b*). Queste registrazioni rappresentano un dato di sicuro interesse che, pur non statisticamente significativo, sembrerebbe confermare un reale effetto vasodilatatorio esercitato dal cannabinoide sui vasi cerebrali in spasmo.

Resta comunque da segnalare la presenza di registrazioni a esito 'negativo', dove, dopo la somministrazione del cannabinoide, il CBF non ha mostrato variazioni di rilievo rispetto all'andamento normale (*Tav. 6a e 6b*).



Tav. 5a e 5b: andamento del CBF dopo somministrazione del WIN 55,212-22; tracciati 'positivi'



Tav. 6a e 6b: andamento del CBF dopo somministrazione del WIN 55,212-22; traccianti 'negativi'

### 3. Discussione

Non è del tutto chiaro quanto l'incremento iniziale della PIC e la diminuzione della PPC influiscano sulla riduzione del CBF. A tale scopo è interessante il dato ottenuto sull'animale controllo dove l'iniezione in cisterna magna di CSF senza sangue ha causato una rapida diminuzione del CBF con però un ritorno a valori normali entro 3-4 minuti e con una riduzione non superiore al 8-10% rispetto a prima dell'iniezione.

Anche Prunell<sup>62</sup> utilizzò tale dato a dimostrazione della trascurabile influenza dei cambi di PIC e PPC dovuti all'evento emorragico acuto, affermando inoltre che l'aumento della PIC, in quanto di breve durata, è improbabile possa avere un effetto di lunga durata sul CBF e dimostrando come non vi fosse una buona correlazione ai diversi intervalli di tempo tra i valori di PIC e PPC e quelli di CBF durante la registrazione Doppler.

L'utilizzo del cannabinoide, con i successivi studi di flussimetria, ha però dato risposte non del tutto convincenti, o per lo meno piuttosto contrastanti.

Tali risultati ci portano a ritenere che l'effetto spastico dei vasi non si realizzi tanto, o almeno non soltanto, a livello delle grosse arterie del poligono di Willis, ma piuttosto a un livello più distale.

A supporto di questa considerazione abbiamo anche il dato clinico di un vasospasmo tardivo, evidente in termini di deficit neurologico su base ischemica,



che spesso non è supportato da un dato radiologico, specie angiografico, di spasmo delle grosse arterie principali.

Deve pertanto esistere, a livello corticale e sottocorticale, un meccanismo di spasmo non angiograficamente evidente, che probabilmente è il vero responsabile degli eventi ischemici tardivi, ovvero quelli visibili clinicamente e talvolta anche radiologicamente solo a livello parenchimale (TC o RM)<sup>20</sup>.

I risultati contrastanti ottenuti fino ad ora con le terapie endovascolari sembrano anch'essi suggerire che il target più appropriato per un efficace trattamento potrebbe non essere tanto, o soltanto, la grossa arteria extraparenchimale in spasmo, bensì la microcircolazione periferica.

Simili conclusioni possono essere ricavate anche dalla stessa terapia medica (HHT) o dall'infusione di boli endovenosi di ipertonica salina; entrambe i trattamenti sono benefici per i pazienti maggiormente compromessi molto probabilmente proprio in seguito a un miglioramento della meccanica vascolare che risulta in una migliore perfusione a livello della microcircolazione<sup>52</sup>.

E' partendo da tali considerazioni che abbiamo quindi deciso di concentrare maggiormente la nostra attenzione sulla microcircolazione corticale, cercando di comprendere cosa possa realmente avvenire a tale livello e quali possano essere i meccanismi coinvolti. A tale scopo, utilizzando il modello sperimentale descritto in precedenza, eseguendo studi di morfologia e morfometria in microscopia ottica ed elettronica.

## 4. Microcircolazione cerebrale e spasmo

Lo studio sul microcircolo e le sue modificazioni dopo ESA, in particolare in associazione con l'autoregolazione del CBF, ebbe inizio circa 30 anni fa in risposta alla questione se le arteriole che regolano il CBF a livello microcircolatorio periferico siano in spasmo similmente ai più grossi vasi extraparenchimali<sup>50,54,55</sup>. Herz, Wiernsperger e Ohkuma<sup>28,53</sup> riuscirono infatti a dimostrare che un'ESA acuta determina costrizione delle arteriole. In particolare quest'ultimo mostrò che, in modelli sperimentali di puntura intracisternale, 7 giorni dopo l'ESA la porzione intraparenchimale delle arterie perforanti era costretta, mentre i vasi extraparenchimali non mostravano cambi di nessun genere rispetto ai vasi controllo. Ciò sembra indicare che i vasi intraparenchimali siano più propensi alla costrizione, in risposta allo stravasamento di sangue, rispetto a quelli extraparenchimali, e che lo spasmo possa verificarsi nel microcircolo in dissociazione con lo stato dei vasi extraparenchimali<sup>15,86</sup>.

La debole risposta delle arteriole periferiche all'aumento della  $paCO_2$  o alla somministrazione di acetazolamide è stata in principio attribuita a una massimale dilatazione nel tentativo di mantenere un CBF sufficiente di fronte alla riduzione della PPC dovuta allo spasmo<sup>38</sup>. Contrariamente a ciò, comunque, recenti studi con PET (positron emission tomography) hanno mostrato una riduzione del volume ematico cerebrale (cerebral blood volume - CBV) durante il vasospasmo,

suggerendo che dopo ESA la capacità vasodilatatoria dei vasi distali in risposta alla riduzione locale della PPC è alterata<sup>6,39</sup>. Inoltre, studi istopatologici hanno rivelato che le piccole arterie o arteriole intraparenchimali mostrano un restringimento del lume, piuttosto che dilatazione, durante il vasospasmo dopo ESA sperimentale. Il CBV misurato attraverso PET è stato usato clinicamente per stimare le variazioni del CBV del microcircolo<sup>39</sup>; resta comunque difficile determinare quale tipo di vasi periferici (arteriole, capillari e venule) giochi un ruolo principale nei cambi del CBV<sup>5</sup>. Uno spasmo microvascolare dopo ESA è stato suggerito verificarsi anche nei pazienti. Analizzando immagini angiografiche di ESA con metodo di sottrazione digitale, Ohkuma<sup>53</sup> notò che in pazienti senza un evidente spasmo dei grossi vasi cerebrali, ma con riduzione del CBF regionale, il tempo di circolazione cerebrale era prolungato, il che suggerisce una costrizione del microcircolo. Anche Uhl<sup>79</sup>, utilizzando la tecnica di imaging per studio del microcircolo nota come polarizzazione ortogonale spettrale (OPS), trovò che in pazienti con ESA la densità capillare si riduceva in maniera significativa e che le piccole arterie e arteriole perforanti della superficie corticale mostravano un vasospasmo non diagnosticabile attraverso angiografia o Doppler trans-cranico (TCD). Allo stesso modo, durante la chirurgia in acuto in pazienti con ESA Pennings<sup>59</sup> osservò costrizioni multifocali tipo “corona di rosario” delle arteriole corticali in presenza di sangue subaracnoideo. E' stato inoltre dimostrato, in caso di ESA, un danneggiamento della regolazione endotelio-dipendente del microcircolo. Park<sup>70</sup> osservò che i piccoli vasi corticali avevano una ridotta risposta all'ADP, dilatatore endotelio-dipendente, e una aumentata risposta all'ET-1<sup>85</sup>.

In accordo allo studio di Kozniewska<sup>38</sup>, la risposta del microcircolo a un vasodilatatore endotelio-dipendente, come l'acetilcolina, e a un dilatatore diretto, come la papaverina, è alterata nella riperfusione dopo ESA. Si deduce che non solamente la regolazione endotelio-dipendente è compromessa, bensì anche la risposta del muscolo liscio.

Tre giorni dopo l'ESA, comunque, negli animali che non avevano avuto un'ischemia acuta severa fu osservato un lento, ma progressivo recupero della reattività vascolare, assente in quelli con ischemia severa. Il risultato interessante di ciò è che al tempo della comparsa del vasospasmo cronico, 3-4 giorni dopo il sanguinamento, negli animali con ischemia acuta severa al momento dell'ESA il CBF a livello della microcircolazione cerebrale aumentava in risposta alla somministrazione endovenosa di un antagonista per il recettore del trombossano.

Kozniewska<sup>38</sup> osservò anche cambi strutturali progressivi nelle arterie di maggior calibro, in particolare arteria cerebrale media e arteria basilare. Pertanto, sia l'alterazione funzionale del microcircolo che i cambi strutturali a carico delle arterie principali sembrano essere corresponsabili nel determinare la severità dell'ESA.

## 1. Studio morfologico: materiali e metodi

Nel tentativo di analizzare le modificazioni strutturali a carico della microcircolazione corticale abbiamo eseguito studi morfologici e morfometrici, tramite microscopia ottica ed elettronica a trasmissione, oltre a studi di tipo morfologico-ultrastrutturale, con microscopia elettronica a scansione.

Dopo l'induzione dell'ESA, secondo le modalità già descritte, i campioni destinati alla *microscopia ottica* sono stati immediatamente fissati in soluzione di Karnovsky 1% in tampone cacodilato di sodio 0.1 M per 6 ore a 4°C e successivamente sottoposti a lavaggio in tampone cacodilato 0.1M addizionato a saccarosio. I preparati sono stati quindi disidratati nella scala ascendente di etanolo, diafanizzati in xilolo e quindi inclusi in paraffina in modo tale da ottenere al taglio sezioni trasversali del campione che offrirono all'osservazione l'intero spessore del campione. Con un microtomo PFM Slide 2002 sono state ottenute sezioni di spessore variabile tra i 3 ed i 5  $\mu\text{m}$ , che sono state raccolte su vetrini portaoggetto.

Tutte le sezioni sono state sparaffinate in xilolo, reidratate nella scala discendente degli etanoli e successivamente colorate con ematossilina-eosina. Dopo la colorazione le sezioni sono state disidratate nella scala ascendente degli etanoli, diafanizzate in xilolo e montate con coprioggetto utilizzando il balsamo eukitt. I campioni sono stati quindi osservati con un microscopio Nikon Eclipse 600 dotato di

fotocamera digitale Nikon digital sight DS-U1. Le immagini sono state quindi acquisite ed elaborate con un programma di analisi di immagine (NIS-Elements F).

Per gli studi al *microscopio elettronico a trasmissione* l'animale è stato perfuso tramite iniezione nel ventricolo sinistro di soluzione Karnovsky (0.25% glutaraldeide e 0.25% paraformaldeide in tampone 0.1 M Na-cacodilato a pH 7.2), dopo perfusione del circolo sistemico con soluzione fisiologica. Al termine della procedura di perfusione è stata eseguita la craniectomia al fine di espianare l'encefalo in toto. In seguito è stata eseguita fissazione del campione per 5-6 ore a 4-8°C, lavaggio del campione in tampone contenente Na-cacodilato 0.1 M e saccarosio 2.5% e successiva post-fissazione per 1,5 ore in soluzione tampone contenente collidina 2.67%. HCl 1 N, tetrossido di osmio ( $\text{OsO}_4$ ) 4% a pH 7.4.

Dopo le fasi di pre- e post-fissazione, si è proceduto alla disidratazione a 4°C in scala crescente (25°-50°-70°-80°-95°-100°) di alcol etilico. Infine è stata eseguita l'inclusione in una resina per conferire al preparato un grado di durezza ed elasticità tale da consentirne il taglio. La penetrazione della resina è favorita da un pre-trattamento con epossipropano. I reagenti utilizzati sono stati: la resina EPON 812 e due agenti induritori, il dodecenyil-succinil-anidride (DDSA) e il Nadie-metil-anidride (NMA), con l'aggiunta di Tri-dimetil-amminometil-fenolo (DMP-30) come catalizzatore. L'imbibizione del campione con la resina, avviene per gradi e prevede il passaggio del campione in soluzioni contenenti differenti proporzioni di miscela di resina e del suo solvente. I campioni, inclusi nella miscela pura, sono stati posti a polimerizzare in stufa a 60°C per 48 ore. Dal pezzo incluso sono state ricavate, con

speciali lame di diamante, sezioni ultrasottili dello spessore di 0.05-0.1  $\mu\text{m}$  che, appoggiate sulle reticelle di rame e fatte asciugare, sono state colorate con sali di metalli pesanti per aumentare il contrasto del materiale cellulare durante l'osservazione al microscopio.

I dati morfologico-strutturali sulla microcircolazione cerebrale sono stati ottenuti mediante la *tecnica del corrosion-casting* e successiva osservazione dei campioni al *microscopio elettronico a scansione* (scanning electron microscope, SEM)<sup>55</sup>.

La tecnica del corrosion-casting ha permesso l'ottenimento di calchi del letto vascolare tramite l'utilizzo di una resina.

Nello specifico, abbiamo utilizzato una soluzione di 10 ml di resina (MERCOS-Spi Supplies) con 0.2 ml di catalizzatore (benzoin-perossido), il tutto diluito con un monomero (metil-metacrilato) al fine di aumentare il tempo di polimerizzazione e di diminuire la viscosità ematica per consentire un adeguato riempimento dei vasi. Il composto così ottenuto è stato quindi infuso a pressione costante, previo lavaggio del circolo con soluzione fisiologica, in una cannula posizionata nell'aorta del ratto legata a monte al fine di prevenire fenomeni di reflusso della resina. Dopo craniectomia ed espianco dell'encefalo il campione è stato immerso in soluzione di KOH 15% e lasciato macerare fino a completa digestione.

## 2. Studio morfologico-morfometrico

### a. Risultati

Lo studio al microscopio ottico ed elettronico a trasmissione (TEM) ci ha permesso di osservare una precoce degenerazione dello strato delle cellule endoteliali, caratterizzata da vacuolizzazione, rottura delle giunzioni serrate intercellulari, ed occasionalmente desquamazione endoteliale e microtrombi all'interno del lume.

La tonaca intima, e la sottostante lamina elastica interna, si presentano convoluti a causa della contrazione della tonaca media. Lo spessore intimale diventerà più apprezzabile istologicamente a distanza di circa 7 giorni dal sanguinamento, ed il suo culmine verrà raggiunto dopo alcune settimane; l'aumento di spessore è da ascrivere a edema, infiltrazione di cellule polimorfe, granulazione tissutale, migrazione di cellule muscolari lisce (verosimilmente dalla tonaca media), o fibrodisplasia.

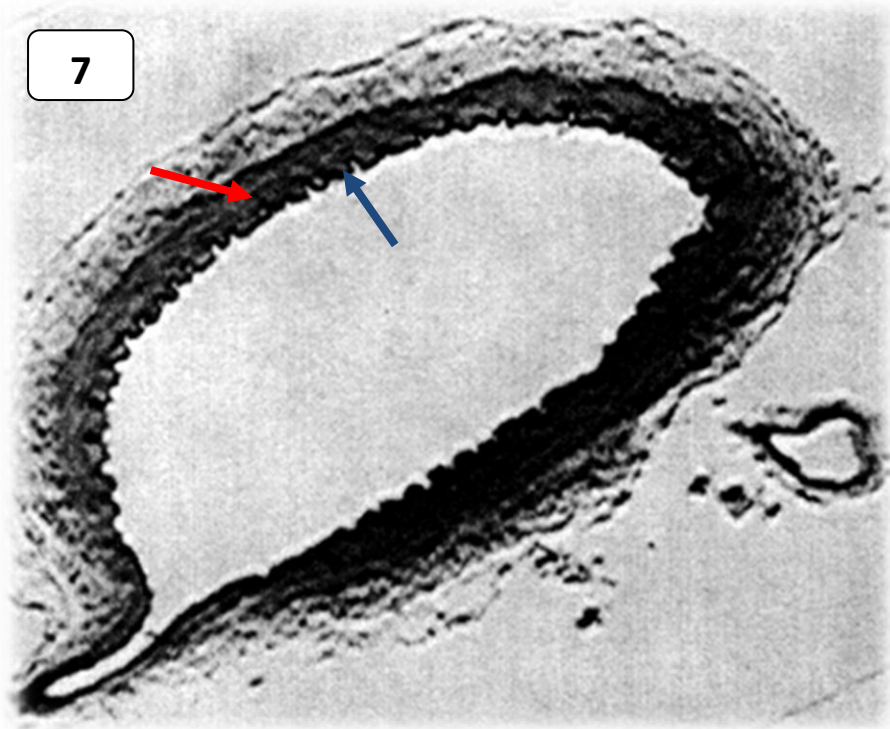
La tonaca media è lo strato che maggiormente va incontro ad aumento di spessore, fino a cinque volte; l'ispessimento è correlato principalmente alla contrazione delle cellule muscolari e, solo in un secondo tempo, ad una infiltrazione di cellule infiammatorie provenienti dal manicotto di sangue a livello avventiziale. (Tav.7)



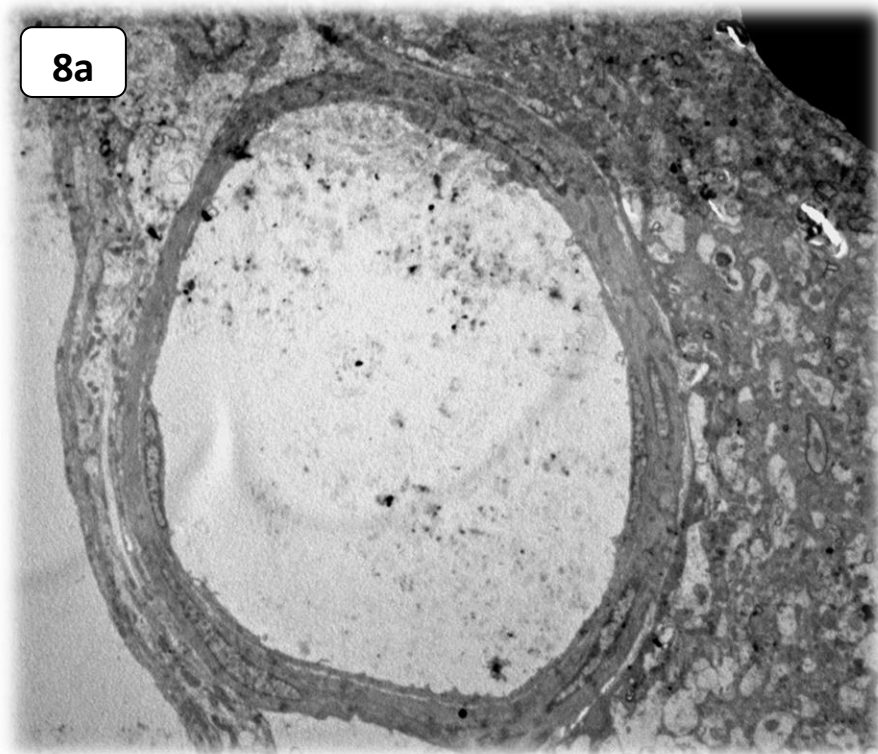
Il vasospasmo è inoltre accompagnato da mionecrosi diffusa dello strato muscolare e, in alcuni modelli sperimentali, da un aumento della matrice extracellulare, prodotta dalle cellule miointimali della parete arteriosa.

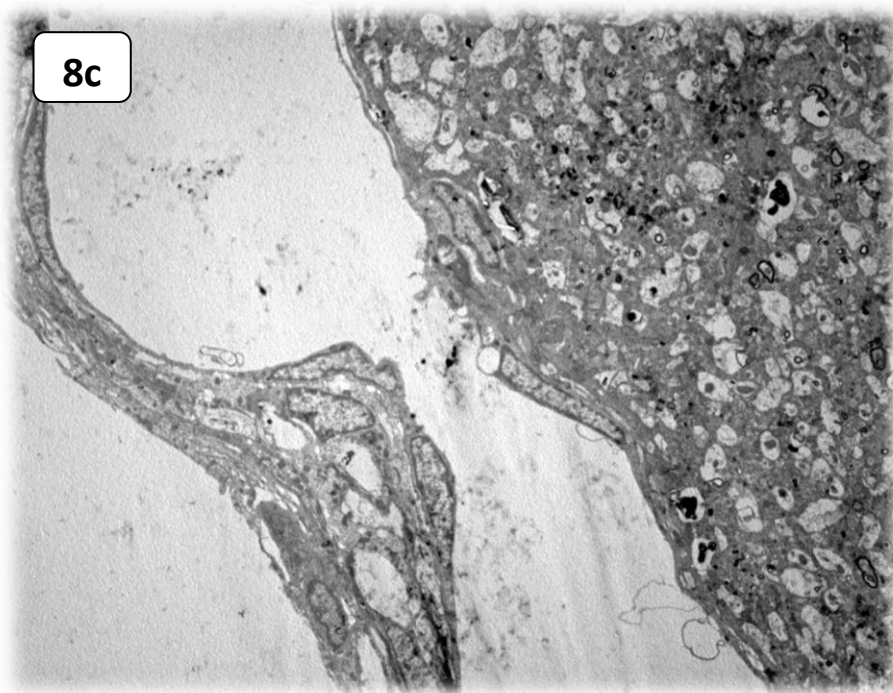
La tonaca avventizia appare solo lievemente ispessita, e tale ispessimento risulterà più evidente in una fase più tardiva per la presenza di tessuto di granulazione frammentato a fibrina ed eritrociti.

Lo studio al TEM ci ha inoltre permesso di evidenziare la presenza di costrizioni vascolari di tipo sfinteriale, sia a livello dei vasi piali che di quelli intraparenchimali (*Tav.8*).



**Tav.7:** al microscopio ottico, sezione trasversale di vaso cerebrale durante vasospasmo. Si notino il corrugamento endoteliale (*freccia blu*) e l'ispessimento della tonaca media (*freccia rossa*).





**Tav.8: al microscopio elettronico a trasmissione (TEM), sezione trasversale di un vaso normale (a) e costrizioni vascolari a livello di un vaso intraparenchimale (b) e di un vaso piaie (c).**

## b. Discussione

La tecnica di analisi morfometrica è stata sviluppata come metodo di grande utilità per lo studio dei cambi morfologici dei vasi cerebrali, in particolare dei piccoli vasi dove lo spasmo è molto difficile da visualizzare con esame angiografico.

Le modificazioni di tipo morfometrico a livello vascolare cerebrale sono state attentamente studiate in diversi lavori sperimentali, con riscontri differenti a seconda del modello utilizzato.

Il vasospasmo coinvolge le arterie con maggiore componente muscolare situate nello spazio subaracnoideo, e quindi più esposte al coagulo di sangue; l'estensione dello spasmo a livello delle arterie perforanti intraparenchimali è invece dibattuto.

Alla luce di studi morfometrici nel vasospasmo sperimentale, si è infatti notato un comportamento differente tra le grosse e le piccole arterie. Le piccole arterie hanno indubbiamente una capacità contrattile sufficiente per sviluppare corrugamento della lamina elastica interna, dal momento che una severa vasocostrizione, fino talvolta ad una completa occlusione di tali arterie, è stata osservata dopo iniezione intracisternale di agenti costrittori della muscolatura liscia. Queste piccole arterie non mostravano però corrugamento della lamina elastica dopo ESA, anche quando l'arteria basilare mostrava una riduzione fino al 70% del diametro normale. Ciò suggerirebbe che le grosse arterie sono affette da vasospasmo dopo ESA più prontamente che le piccole arterie o per lo meno che le caratteristiche morfologiche dell'arteria stessa possano giocare un ruolo fondamentale nel

meccanismo patogenetico dello spasmo. Esiste tuttora una discrepanza tra i risultati di studi clinici che suggeriscono una dilatazione dei vasi intraparenchimali, con aumento del CBV, e studi sperimentali che invece mostrano un costrizione di tali vasi.

La teoria della costrizione delle arteriole potrebbe spiegare numerosi riscontri clinici, come la riduzione del CBF non ristretto alla sola area di vasospasmo o come la riduzione del DID, e quindi la migliore prognosi dei pazienti, dopo terapia con  $Ca^{2+}$  antagonisti, anche senza evidente riduzione dello spasmo angiografico o delle velocità di flusso al TCD.

Nel lavoro di Prunell<sup>62</sup> l'analisi morfometrica dell'arteria basilare, nel modello a single injection, mostrò a 48 ore dall'ESA una riduzione del 20% del perimetro interno e del 62% del diametro interno rispetto al vaso controllo. Nel modello a doppia iniezione sono stati osservati cambi morfometrici maggiori durante il vasospasmo tardivo (7 giorni dopo la prima iniezione), ma senza grosse differenze nella severità dell'ischemia<sup>81</sup>. Nel modello di perforazione del vaso le modificazioni sono meno pronunciate che nel modello di doppia iniezione, ma sovrapponibili a quelle osservate nel modello a singola iniezione. Infine, nel modello di puntura dell'arteria basilare i cambi morfometrici a 4 giorni dall'ESA sono trascurabili se confrontati con quelli ottenuti con gli altri modelli sperimentali.

Fondamentale struttura, oltre che sito principale, nella genesi e nel mantenimento del vasospasmo cerebrale, è l'architettura cellulare della parete vascolare. Lo spasmo arterioso comporta infatti importanti variazioni della sua morfologia; numerosi studi di emorragia subaracnoidea, indotta sperimentalmente e dopo

rottura di aneurisma cerebrale nell'uomo, hanno evidenziato cambiamenti patologici della parete arteriosa. Nello studio di Mayberg<sup>46</sup>, profonde alterazioni strutturali nelle arterie cerebrali sono state osservate nelle prime 4 ore dall'esposizione al sangue.

Valutazioni in microscopia elettronica a trasmissione (TEM) e microscopia luce (ottica) dei cambi morfologici qualitativi delle arterie cerebrali dopo ESA sperimentalmente indotta hanno mostrato, fino a 3 ore dopo l'ESA e a una sezione trasversale, la presenza di marcata vasocostrizione del vaso con corrugamento dell'elastica, distorsione delle cellule endoteliali e riduzione del lume vasale<sup>53</sup>.

Studi di permeabilità hanno poi mostrato un'alterazione dell'integrità endoteliale a 3 giorni dall'ESA. Dal 3° al 14° giorno dopo l'ESA la morfologia dell'arteria era caratterizzata da alterazioni nella morfologia della cellula endoteliale, ispessimento e discontinuità dell'elastica, vacuoli nel muscolo liscio con occasionali focolai di micronecrosi, cellule miointimali proliferanti migranti verso l'intima e infiammazione periaffettuale. Dopo 2 settimane fino a 6 mesi dopo l'ESA, furono osservati regressione della proliferazione subintimale, aumento del diametro luminale, e deposizione di collagene in un tutti e tre gli strati della parete vasale<sup>2,65,86</sup>.

Il vasospasmo sembra pertanto non esercitare un effetto a lungo termine sulla architettura vascolare cerebrale. Sia rilievi sperimentali che osservazioni su pazienti a distanza di anni dall'ESA, testimoniano rispettivamente una normale morfologia e risposta farmacologica già dopo 21-28 giorni, con una riserva vascolare e una velocità del CBF fisiologiche.

### 3. Studio morfologico-ultrastrutturale:

#### a. Risultati

La microvascolarizzazione della giunzione leptomeningo-corticale può essere suddivisa dalla superficie verso l'interno in 3 strati principali (*Tav.9*):

- ✓ Vasi piali
- ✓ Vasi perforanti
- ✓ Unità glomerulari della sostanza grigia.

Osservando a basso ingrandimento la superficie cerebrale si incontra una rete organizzata in maglie larghe di vasi piali di grosso e medio calibro variamente anastomizzati fra di loro.

Il diametro dei vasi principali che costituiscono la rete piale varia dai 100 agli 80  $\mu\text{m}$ . Da questi prendono origine, ad angolo acuto, molte collaterali che costituiscono la rete corticale vera e propria estendendosi lungo tutta la superficie cerebrale.

Il diametro dei collaterali si aggira intorno ai 50  $\mu\text{m}$  e la loro lunghezza media sfiora i 200  $\mu\text{m}$ . Questi vasi decorrono parallelamente alla superficie cerebrale con un decorso iniziale di 100-300  $\mu\text{m}$  per poi approfondirsi nella zona corticale.

Nel punto di origine dei vasi perforanti a sezione maggiore si possono osservare numerose impronte di sistemi sfinterici, a testimoniarne una probabile funzionalità regolatrice (*Tav.11*).

Sono infatti due le afferenze al microcircolo cerebrale: la maggiore deriva dai vasi piali di piccolo calibro che decorrono paralleli alla superficie cerebrale per poi entrare perpendicolarmente nella compagine della sostanza grigia e la minore dai vasi di maggior calibro derivanti direttamente dai grossi vasi piali e regolati da numerosi sistemi sfinterici.

La visualizzazione al SEM ci ha permesso di dimostrare la presenza di sfinteri vascolari sia all'origine dei vasi perforanti (costrizioni focali), sia più estesamente lungo il decorso del vaso a livello intraparenchimale (costrizioni diffuse).

Più nello specifico, in corrispondenza delle biforcazioni arteriose abbiamo apprezzato importanti riduzioni focali del calibro del calco vascolare. La distribuzione topografica di tali costrizioni si mantiene costante, localizzandosi specificamente a livello delle ramificazioni dei vasi piali e nel sito di origine dei vasi perforanti intraparenchimali.

Il restringimento focale condiziona un chiaro corrugamento della parete arteriosa limitrofa con dislocazione delle impronte cellulari endoteliali e conseguente formazione di un solco trasversale sul vaso a valle. Questi solchi si presentano con diverse caratteristiche morfologiche, dovute ai diversi tipi e architetture cellulari dei sistemi sfinterici: la maggior parte ha una conformazione "a fionda" (*Tav.10*), altri ancora una struttura circolare (*Tav.11*), mentre più raramente si estendono per un tratto arterioso ampio longitudinalmente lungo l'asse maggiore del vaso (*Tav.12a*).

A livello dei vasi piali prossimali (di circa 100  $\mu\text{m}$ ) sono evidenti numerosi sistemi sfinterici "a fionda": l'attivazione delle strutture cellulari provoca una trazione in



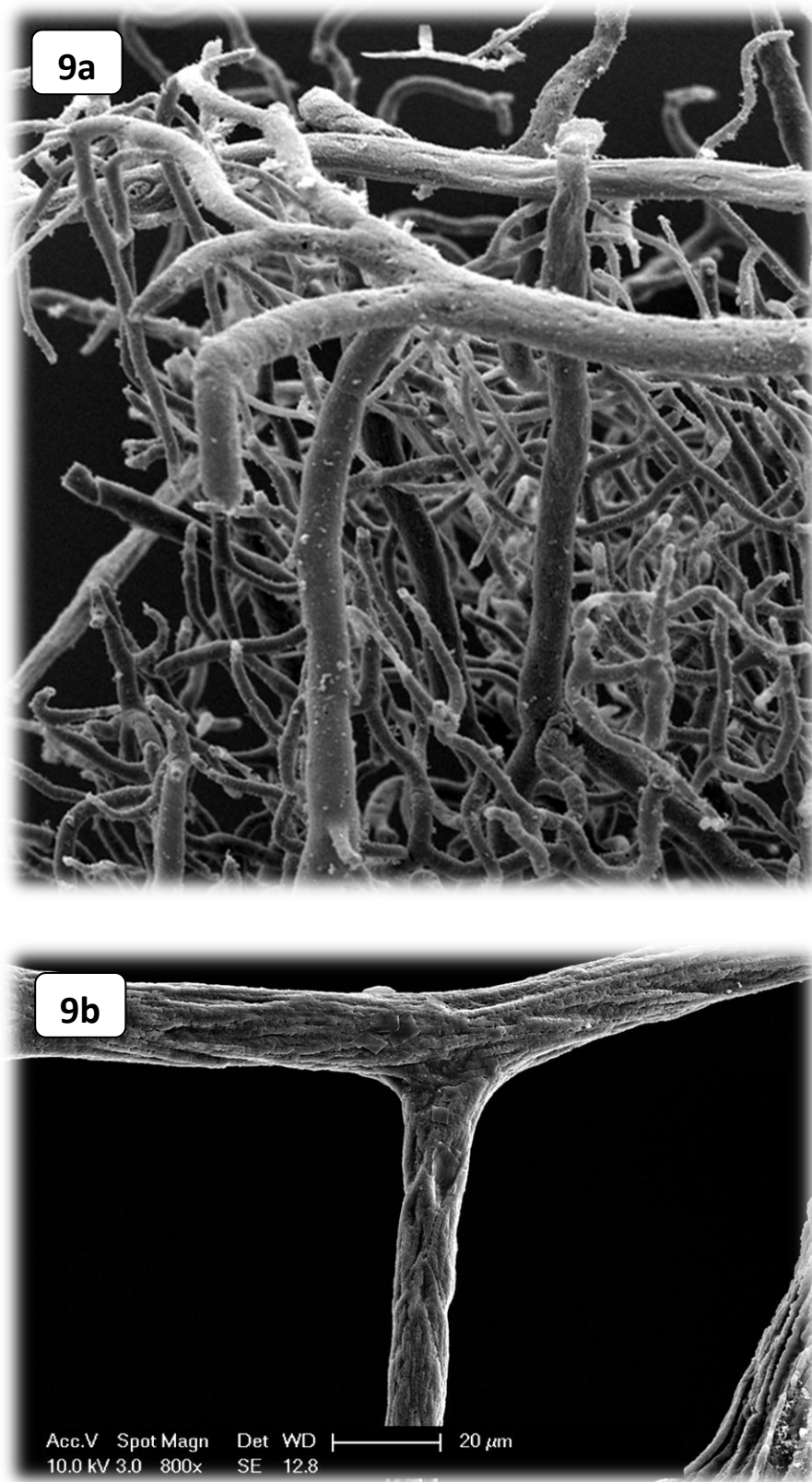
direzione prossimale al vaso portante, formando il caratteristico solco nel margine acuto della ramificazione vasale

Una distribuzione topografica e morfologica simile si riscontra anche nei tratti più distali delle arterie piali nelle biforcazioni di secondo e terzo ordine: osservando vasi con un lume che varia dai 50 ai 75  $\mu\text{m}$ , si evidenziano impronte ripetute di sfinteri "a fionda".

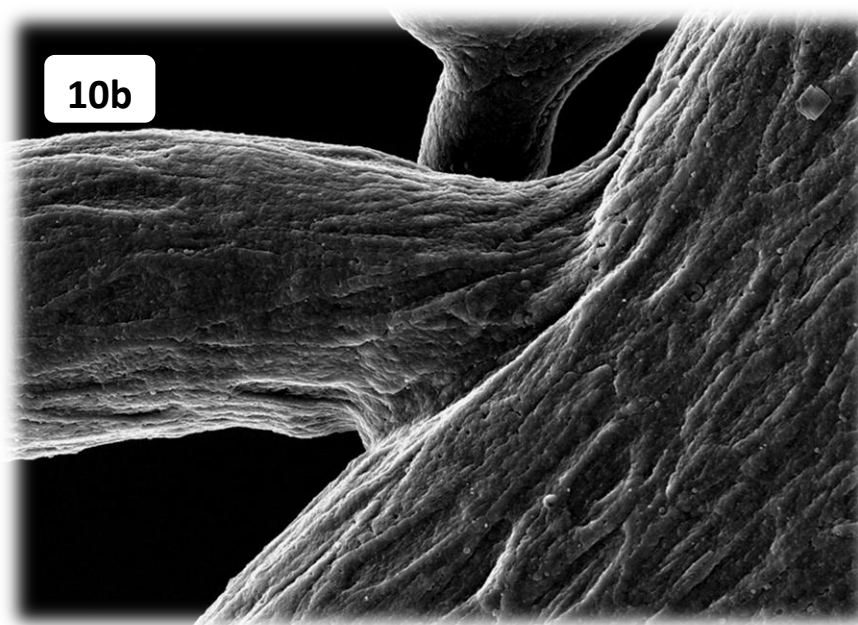
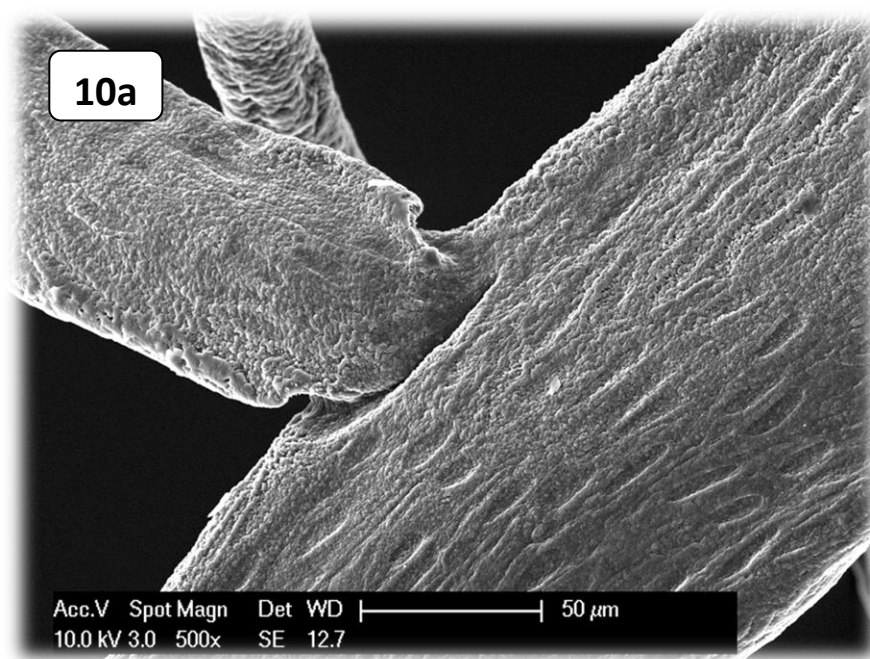
Di riscontro occasionale anche alcuni sistemi sfinterici multipli (*Tav.12b*). Sebbene situati sempre all'emergenza delle ramificazioni arteriose, tali strutture cellulari possono provocare contemporaneamente lo spasmo di tre vasi diversi. A maggiore ingrandimento, la superficie del calco spasmizzata risulta essere continua lungo tutta la triforcazione

Differenze sostanziali si evidenziano nell'osservazione dei vasi perforanti. Se infatti il riscontro di sfinteri di tipo circolare nelle arterie piali è raro, nelle arterie perforanti diventa la norma: già esaminando a basso ingrandimento questa rete vascolare, si apprezzano restringimenti che coinvolgono tutta la circonferenza della parete arteriosa, fin dalla sua origine dall'arteria cerebrale superficiale.

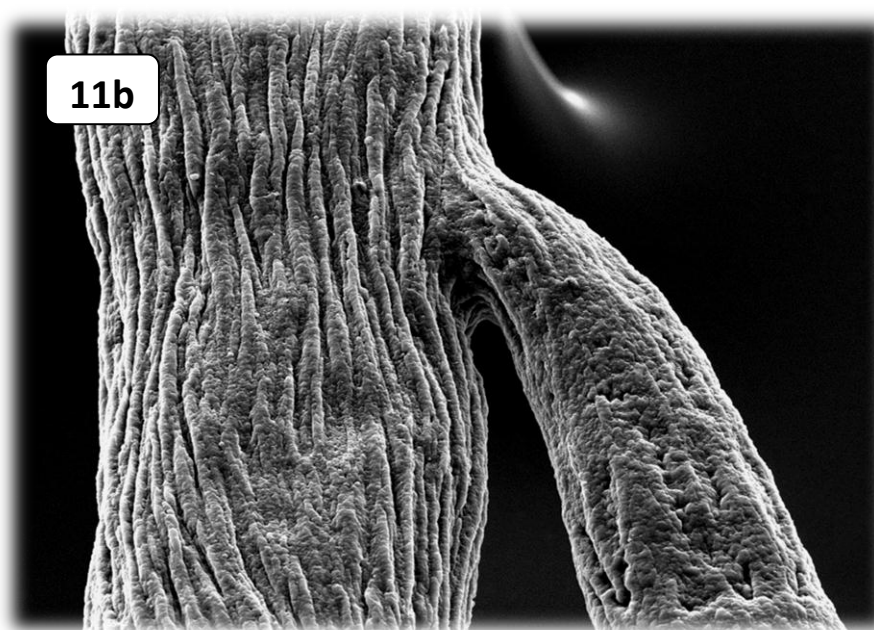
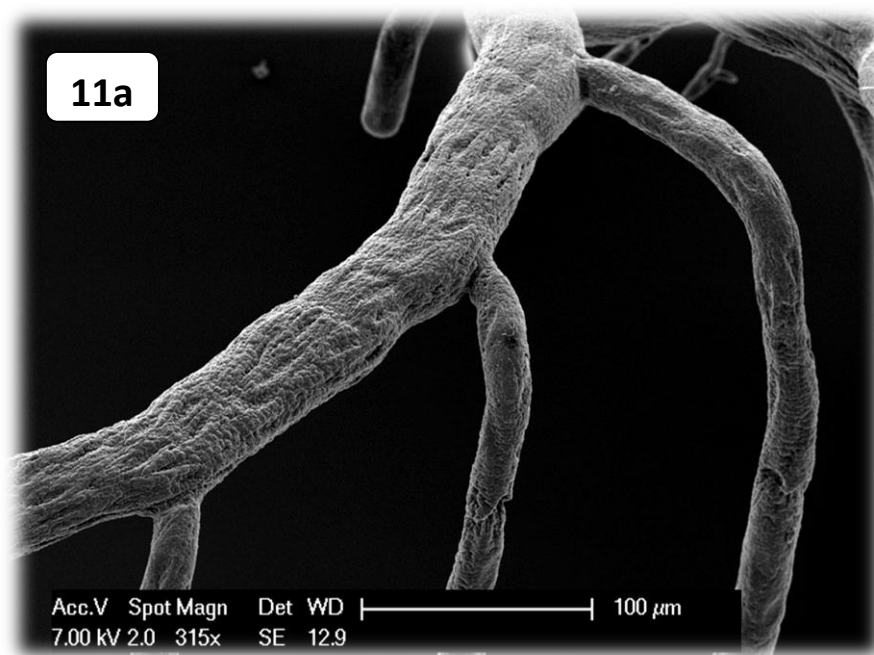
Più frequentemente tali costrizioni mostrano un aspetto focale. Sono state però notate anche costrizioni di tipo diffuso, interessanti un ampio tratto della parete del vaso.



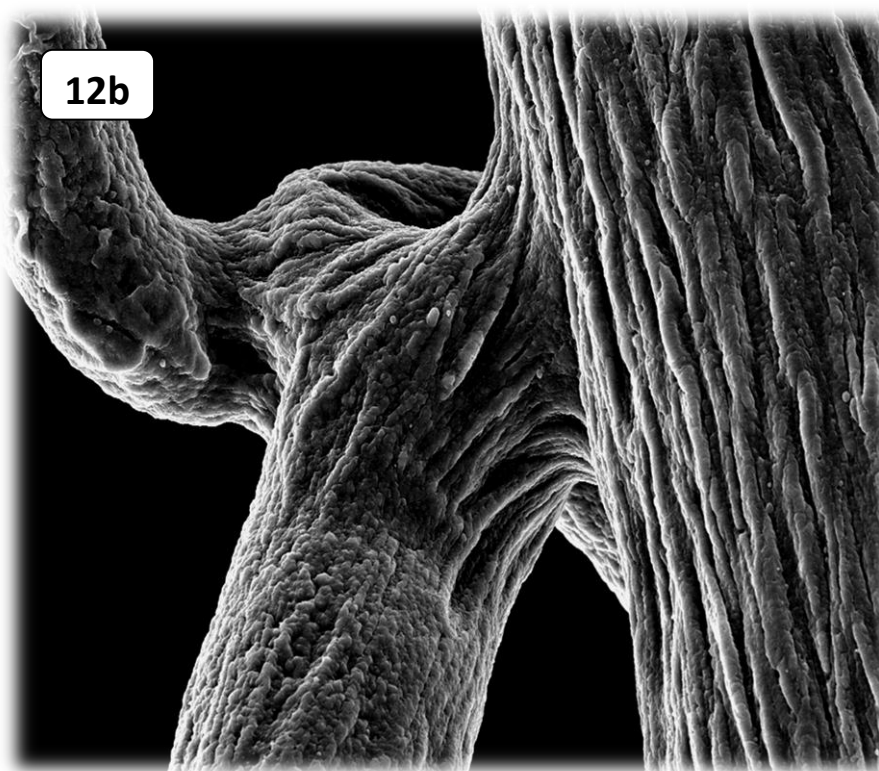
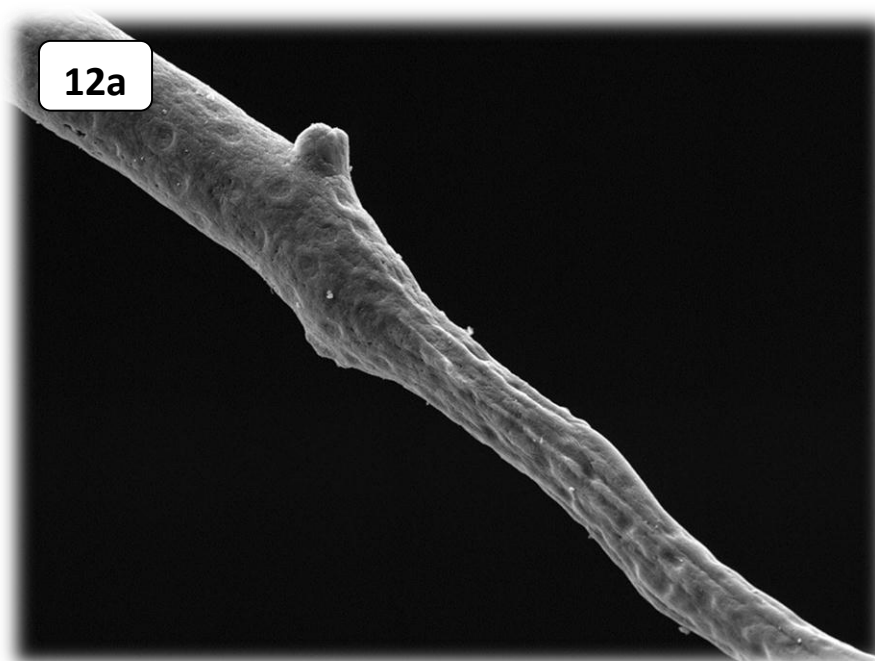
**Tav.9: al microscopio elettronico a scansione (SEM), calco di vasi piali normali da cui originano vasi perforanti intraparenchimali (a) e dettaglio (b).**



**Tav.10(a,b):** al SEM, costrizioni sfinteriche focali “a fionda” all’origine dei vasi perforanti dalle arterie piali.



**Tav.11(a,b):** al SEM, costrizioni sfinteriche focali circolari all'origine dei vasi perforanti dalle arterie piali.



**Tav.12: al SEM, costrizione sfinterica diffusa a livello di un vaso intraparenchimale (a) e sistema sfinterico multiplo con costrizione interessante tre arterie (b).**

## b. Discussione

Lo studio morfologico dei vasi cerebrali, e in particolare della microcircolazione cerebrale corticale, rappresenta un passaggio fondamentale nell'inquadramento del vasospasmo nella sua complessità, non soltanto molecolare ma anche distrettuale.

I meriti della tecnica del corrosion-casting nell'analizzare vasi spastici sia di grosso che di piccolo calibro sono molteplici. Tale metodo è certamente il più accurato per misurare il diametro dei vasi, con la possibilità di osservare vasi di ratto fino a dimensioni di  $10^{-6}$  m. E' inoltre possibile osservare differenti porzioni del cast e da diversi angoli di visione e possono essere studiate in contemporanea arterie, vene e vasi periferici.

Con la tecnica del corrosion-casting è stato infatti possibile studiare nel dettaglio la microcircolazione cerebrale, prima e dopo induzione dello spasmo. Tali dati risultano complementari ai dati di flussimetria e morfometria al fine di comprendere meglio tutte le possibili modificazioni a carico del CBF, e in particolare della circolazione periferica, durante il vasospasmo.

Nello specifico, abbiamo potuto osservare la presenza, a livello della microcircolazione corticale, di sistemi sfinteriali la cui attivazione sembra responsabile dello spasmo dei vasi periferici.

In particolare, tali sistemi sono stati identificati all'origine dei vasi intraparenchimali dalle arterie piali come costrizioni sia focali, prevalentemente, sia diffuse.

I sistemi sfinterici corticali sono strutture cellulari localizzate lungo il decorso dei vasi sanguigni, in particolare a livello delle biforcazioni, e partecipano alla regolazione del CBF modificando il diametro del lume vasale.

Sebbene tali sistemi non siano stati ancora ben caratterizzati istologicamente, sembrano comunque costituiti da periciti e/o cellule muscolari<sup>67</sup>. E' risaputo che le cellule pericitiche sono tra le cellule che formano la barriera emato-encefalica: sebbene le conoscenze in quest'ambito siano limitate, nel loro citoplasma sono presenti proteine contrattili. E' ipotizzabile che i periciti abbiano una funzione regolatoria sul CBF e sul grado di permeabilità della barriera emato-encefalica.

Gli sfinteri cerebrali sembrano coinvolti nelle variazioni della pressione arteriosa cerebrale sia in condizioni fisiologiche che patologiche, ma non si è ancora a conoscenza dei fini e complessi meccanismi di attivazione/inibizione, né di quali specifici sistemi sfinterici vengano reclutati nelle diverse situazioni.

Nel 1987, Motti<sup>48</sup> descrisse la presenza di un fenomeno vasospastico cerebrale, in risposta ad un possibile aumento pressorio intravasale, dopo iniezione nel circolo arterioso di ratto della resina per la metodica di corrosion. Sotto lo stimolo da stiramento, si è ottenuta un'attivazione diffusa di tutti i sistemi sfinterici cerebrali con la formazione di costrizioni localizzate, costrizioni a "corona di rosario", corrugamenti endoteliali, localizzati a livello sia delle arterie piali superficiali, che delle arterie intraparenchimali.

Un'attivazione più selettiva dei sistemi sfinterici cerebrali, è stata ottenuta da Nakai<sup>49</sup> usando un neurotrasmettitore vasocostrittivo: il neuropeptide-Y (NPY). Questo mediatore fu iniettato nello spazio subaracnoideo: si evidenziò così una

risposta sfinterica specifica, con contrazioni della parete vasale localizzate nello strato corticale più esterno, all'emergenza delle arterie perforanti. Il risultato ottenuto è una prova che le fibre nervose contenenti NPY disposte lungo i vasi sanguigni parenchimali prendono parte alla regolazione del CBF, inducendo una diminuzione del calibro delle arterie perforanti prossimali.

E' pertanto accettato che tali sfinteri vascolari, in quanto strutture contrattili, giochino un ruolo cardine nella genesi dei fenomeni vasomotori, e principalmente nel vasospasmo cerebrale.



## 5. Conclusioni

Gli studi di farmacologia, flussimetria e morfologia che abbiamo eseguito sui modelli sperimentali di vasospasmo post-emorragico hanno confermato la complessità dello spasmo, sia da un punto di vista biomolecolare che distrettuale.

I dati presentati in questo lavoro sembrano confermare che il vasospasmo, e il conseguente DID, si sviluppano come risultato di cambi strutturali e funzionali tanto nei vasi cerebrali extra- come in quelli intraparenchimali, ovvero nella microcircolazione distale. Si tratterebbe dunque di un progressivo processo di maturazione che trova il suo culmine nel vasospasmo angiografico e/o in una severa alterazione microvascolare.

Iniziare una terapia per la regressione del vasospasmo cronico potrebbe pertanto rappresentare una soluzione tardiva, dal momento che tali processi potrebbero essere irreversibili a quel punto. Invece di trattare il vasospasmo alla sua comparsa clinica o radiografica tardiva sarebbe opportuno tentare di prevenirlo, indirizzandosi però verso un target differente, ovvero tenendo in conto non, o non solo, le grosse arterie ma anche i vasi sanguigni più piccoli e periferici, iniziando a proteggere la microcircolazione già nella fase precoce dopo l'ESA.

Molto si può ancora indagare sulla caratterizzazione istologica e immunoistochimica delle strutture cellulari coinvolte nella costituzione degli sfinteri vascolari, e

soprattutto sulla loro attivazione in presenza di stimoli irritativi, sul funzionamento fisiologico, in condizioni patologiche, e durante somministrazione di farmaci.

Gli studi successivi verteranno dunque a un maggiore caratterizzazione morfologica della microcircolazione corticale e alla verifica dell'attivazione di questi sistemi sfinterici piali, cercando di associare a tali entità anatomiche un significativo coinvolgimento nella genesi e nel mantenimento di fenomeni ischemici focali sia precoci che tardivi.

Resta la speranza che lavorando in tale direzione si possa finalmente arrivare a ottenere risultati realmente positivi, non solo a livello sperimentale ma anche clinico, in quella che ormai da tempo rappresenta una vera e propria "sfida" al vasospasmo cerebrale post-emorragico.

## 6. Bibliografia

1. Aihara Y, Kasuya H, Onda H  
*Quantitative Analysis Of Gene Expressions Related To Inflammation In Canine Spastic Artery After Subarachnoid Hemorrhage.*  
Stroke 2001; 32: 212-217.
2. Alkan T, Tureyen K, Ulutas M, Et Al.  
*Acute And Delayed Vasoconstriction After Subarachnoid Hemorrhage: Local Cerebral Blood Flow, Histopathology, And Morphology In The Rat Basilar Artery.*  
Arch Physiol Pharmacol 2001; 2: 145-153.
3. Alonso-Galicia M, Hudetz AG, Shen H, Harder DR, Roman RJ.  
*Contribution Of 20-HETE To Vasodilator Actions Of Nitric Oxide In Cerebral Microcirculation.*  
Stroke 1999; 30: 2727-2734.
4. Ashton J., Appleton I., Darlington C., Smith P.  
*Immunohistochemical Localization Of Cerebrovascular Cannabinoid CB1 Receptor Protein*  
J Cardiovasc Pharmacol 2004, 44:517-519
5. Bassiouni H., Schulz R., Dorge H., Et Al.  
*The Impact Of Subarachnoid Hemorrhage On Regional Cerebral Blood Flow And Large Vessel Diameter In The Canine Model Of Chronic Vasospasm.*  
J Stroke Cerebrovasc Dis 2007, 16:45-51
6. Bederson JB., Germano IM., Guarino L.  
*Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the rat.*  
Stroke 1995, 26:1086-1091
7. Bergman J., Delatte M., Paronis C., Et Al.  
*Some Effects Of CB1 Antagonists With Inverse Agonist And Neutral Biochemical Properties.*  
Physiology And Behavior 2008, 93:666-670
8. Cahill Wj, Calvert Jh, Zhang Jh.  
*Mechanisms Of Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage.*  
J Cereb Blood Flow Metab 2006; 26: 1341-1353.
9. Clark J., Pyne-Geithman G.  
*Vascular Smooth Muscle Function: The Physiology And Pathology Of Vasoconstriction.*  
Pathophysiology 2005, 12:35-45
10. Clark JF, Sharp FR.  
*Bilirubin Oxidation Products (Boxes) And Their Role In Cerebral Vasospasm After Subarachnoid Hemorrhage.*  
J Cereb Blood Flow Metab 2006; 26: 1223-1233.

11. Clozel M, Watanabe H.  
*BQ-123, A Peptidergic Endothelin ETA Receptor Antagonist, Prevents The Early Cerebral Vasospasm Following Subarachnoid Hemorrhage After Intracisternal But Not Intravenous Injection.*  
Life Sci 1993; 52: 825-834.
12. Cocks T, Malta E, King SJ, Woods RL, Angus JA.  
*Oxyhemoglobin Increases The Production Of Endothelin-1 By Endothelial Cells In Culture.*  
Eur J Pharmacol 1991; 196: 177-182.
13. Cook Da, Vollrath B.  
*Free Radicals And Intracellular Events Associated With Cerebrovascular Spasm.*  
Cardiovasc Res 1995; 30: 493-500.
14. Dannert M., Alasua A., Herradon E., Martin M., Lopez-Miranda V.  
*Vasorelaxant Effect Of Win 55,212-2 In Rat Aorta: New Mechanisms Involved*  
Vascular Pharmacology 2007, 46:16-23
15. Del Zoppo GJ,  
*Microvascular Changes During Cerebral Ischemia And Reperfusion.*  
Cerebrovasc Brain Metab Rev 1994; 6: 47-96.
16. Dietrich H, Dacey R.  
*Molecular Keys To The Problems Of Cerebral Vasospasm.*  
Neurosurgery 2000; 46: 517-529.
17. Dogulu F., Ozogul C., Akpek S., Emmez H., Ercan S., Baykaner M.  
*Intra-Arterial Simultaneous Administration Of Anandamide Attenuates Endothelin-1 Induced Vasospasm In Rabbit Basilar Arteries*  
Acta Neurochir 2003, 145:579-582
18. Duncan M., Kendall D., Ralevic V.  
*Characterization Of Cannabinoid Modulation Of Sensory Neurotransmission In The Rat Isolated Mesenteric Arterial Bed*  
The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics 2004, 311:411-419
19. Durmaz R., Ozsandik A., Sahinturk V., Civi K., Et Al.  
*Dexanabinol Prevents Development Of Vasospasm In The Rat Femoral Artery Model.*  
Neurosurg Rev 2008, 31:215-223
20. Fisher CM, Kistler JP, Davis JM:  
*Relation Of Cerebral Vasospasm To Subarachnoid Hemorrhage Visualized By Computerized Tomographic Scanning.*  
Neurosurgery 1980, 6:1-9.
21. Fride E.  
*Endocannabinoids In The Central Nervous System-An Overview*  
Prostaglandins, Leukotrienes And Essential Fatty Acids 2002, 66:221-233
22. Frijns C.J., Kasius K.M., Fijnheer R., Rinkel G.  
*Endothelial Cell Activation Markers And Delayed Cerebral Ischemia In Patients With Subarachnoid Hemorrhage*  
J Neurol Neurosurg Psychiatry 2006, 77:863-867

23. Gardiner S., March J., Kemp P., Bennett T.  
*Complex Regional Haemodynamic Effects Of Anandamide In Conscious Rats*  
British Journal Of Pharmacology 2002, 135:1889-1896
24. Gebremedhin D., Lange A., Campbell W., Hillard C., Harder D.  
*Cannabinoid CB1 Receptor Of Cat Cerebral Arterial Muscle Functions To Inhibit L-Type Ca<sup>2+</sup> Channel Current*  
Am J Physiol 1999, 276:2085-2093
25. Grasso G.  
*An Overview Of New Pharmacological Treatments For Cerebrovascular Dysfunction After Experimental Subarachnoid Hemorrhage.*  
Brain Res Rev 2004; 44: 49-63.
26. Grotenhermen F.  
*Cannabinoidi E Sistema Endocannabinoidi.*  
Cannabinoids 2006, 1:10-14
27. Herradon E., Martin M., Lopez-Miranda V.  
*Characterization Of The Vasorelaxant Mechanisms Of The Endocannabinoid Anandamide In Rat Aorta*  
British Journal Of Pharmacology 2007, 152:699-708
28. Herz DA, Baez S, Shulman K.  
*Pial Microcirculation In Subarachnoid Hemorrhage.*  
Stroke 1975; 6: 417-424.
29. Hillard CJ.  
*Role Of Cannabinoids And Endocannabinoids In Cerebral Ischemia.*  
Curr Pharm Des 2008, 14:2347-2361
30. Hoh BL, Ogilvy CS.  
*Endovascular Treatment Of Cerebralvasospasm: Transluminal Balloon Angioplasty, Intra-Arterial Papaverine, And Intra-Arterial Nicardipine.*  
Neurosurg Clinics North Am 2005, 16:501-516, Vi.
31. Ignarro L.  
*Biosynthesis And Metabolism Of Endothelium-Derived Nitric Oxide.*  
Annu Rev Pharmacol Toxicol 1990; 30: 535-560.
32. Ignarro L.  
*Nitric Oxide As Unique Signaling Molecule In The Vascular System: A Historical Overview.*  
J Physiol Pharmacol 2002; 53: 503-514.
33. Imaizumi S., Shimizu H., Ahmad I., Et Al.  
*Effect Of Calcitonin Gene-Related Peptide On Delayed Cerebral Vasospasm After Experimental Subarachnoid Hemorrhage In Rabbits.*  
Surg Neurol 1996, 46:263-271
34. Jackowski A., Crockard A., Burnstok G., Russell RR., Kristek F.  
*The time course of intracranial pathophysiological changes following experimental subarachnoid hemorrhage in the rat.*  
J Cereb Blood Flow Metab 1990, 10:835-849

35. Jakobsen M., Skjodt T., Enevoldsen E.  
*Cerebral blood flow and metabolism following subarachnoid hemorrhage: effect of subarachnoid blood.*  
Acta Neurol scand 1991, 83:226-233
36. Jarus-Dziedzic K, Czernicki Z, Ko.Niewska E.  
*Acute Decrease Of Cerebrocortical Microflow And Lack Of Carbon Dioxide Reactivity After Experimental Subarachnoid Haemorrhage In The Rat.*  
Acta Neurochir Suppl 2003; 86: 489-491.
37. Keyrouz S.G., Diringer M.N.  
*Clinical Review: Prevention And Therapy Of Vasospasm In Subarachnoid Hemorrhage*  
Critical Care 2007, 11:220
38. Kosniewska E., Michalik R., Rafalowska J., Gadamski R., Walski M., Et Al.  
*Mechanisms Of Vascular Dysfunction After Subarachnoid Hemorrhage*  
Journal Of Physiology And Pharmacology 2006, 57, Suppl 11, 145.160
39. Lad SP, Guzman R, Kelly ME, Li G, Lim M, Lovbald K, Steinberg GK.  
*Cerebral Perfusion Imaging In Vasospasm.*  
Neurosurgical Focus 2006, 21:E7.
40. Lamping KG.  
*Enhanced Contractile Mechanism In Vasospasm. Is Endothelial Dysfunction The Whole Story?*  
Circulation 2002; 105: 1520-1522.
41. Lavine S., Wang M., Etu J., Et Al.  
*Augmentation Of Cerebral Blood Flow And Reversal Of Endothelin-1 Induced Vasospasm: A Comparison Of Intracarotid Nicardipine And Verapamil.*  
Neurosurgery 2007, 60:742-749
42. Lin G, Macdonald LR, Marton LS.  
*Hemoglobin Increases Endothelin-1 In Endothelial Cells By Decreasing Nitric Oxide.*  
Biochem Biophys Res Comm 2001; 280: 824-830.
43. Macdonald R.L., Ryszard M., Zhang J.  
*Cerebral Vasospasm After Subarachnoid Hemorrhage: The Emerging Revolution*  
Nature Clinical Practice 2007, Vol 3 No 5
44. Macdonald L.  
*Molecular Mediators Of Hemorrhagic Stroke*  
Principles Of Molecular Neurosurgery 2005, 377-412
45. Mayberg M., Houser W., Sundt T.  
*Ultrastructural Changes In Feline Arterial Endothelium Following Subarachnoid Hemorrhage.*  
J Neurosurg 1978, 48:49-57
46. Mayberg M., Okada T., Bark D.,  
*The Significance Of Morphological Changes In Cerebral Arteries After Subarachnoid Hemorrhage*  
J Neurosurg 1990, 72:626-633

47. Meguro T, Clower B, Carpenter R.  
*Improved Rat Model For Cerebral Vasospasm Studies.*  
Neurol Res 2001; 23: 761-766.
48. Motti EDF, Imhof HG, Garza JM, Yasargil MG:  
*Vasospastic phenomena on the luminal replica of rat brain vessels.*  
Scanning Microsc 1987, 1:207-222
49. Nakai K, Naka Y, Yokote H :  
*Vascular "sphincter" and microangioarchitecture in the central nervous system: Constriction of intraparenchymal blood vessels following a treatment of vasoconstrictive neurotransmitter.*  
Scanning Microsc 1989, 3:337-341
50. Nihei H., Kassell N., Dougherty D., Sasaki T.  
*Does Vasospasm Occur In Small Pial Arteries And Arterioles Of Rabbits?*  
Stroke 1991, 22:1419-1425
51. Nishizawa S, Chen D, Yokoyama T, Yokota N, Otha S.  
*Endothelin-1 Initiates The Development Of Spasm After Subarachnoid Haemorrhage Through Protein Kinase C Activation, But Does Not Contribute To Prolonged Vasospasm.*  
Acta Neurochir (Wien) 2000; 142: 1409-1415.
52. Nishizawa S, Laher I.  
*Signaling Mechanisms In Cerebral Vasospasm.*  
Trends Cardiovasc Med 2005; 15: 24-34.
53. Ohkuma H., Itoh K., Shibata S., Suzuki S.  
*Morphoogical Changes Of Intraparenchymal Arterioles After Experimental Subarachnoid Hemorrhage In Dogs*  
Neurosurgery 1997, 41:230-236
54. Ohkuma H, Manabe H., Tanaka M, Suzuki S.  
*Impact Of Cerebral Microcirculatory Changes On Cerebral Blood Flow During Cerebral Vasospasm After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage.*  
Stroke 2000; 31: 1621-1627.
55. Ono S., Date I., Nakajima M., Onoda K., Et Al.  
*Three Dimensional Analysis Of Vasospastic Major Cerebral Arteries In Rats With The Corrosion Cast Technique*  
Stroke 1997, 28:1631-1638
56. O'sullivan S., Kendall D., Randall M.  
*Vascular Effects Of  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol (THC), Anandamide And N-Arachidonoyldopamine (NADA) In The Rat Isolated Aorta*  
European Journal Of Pharmacology 2005, 507:211-221
57. Park KW, Metais C, Dai HB, Comunale ME, Sellke FW.  
*Microvascular Endothelial Dysfunction And Its Mechanism In A Rat Model Of Subarachnoid Hemorrhage.*  
Anesth Analg 2001; 92: 990-996.

58. Parra A., McGirt M., Sheng H., Et Al.  
*Mouse Model Of Subarachnoid Hemorrhage Associated Cerebral Vasospasm: Methodological Analysis.*  
Neurol Res 2002, 24:510-516
59. Pennings FA, Bouma GJ, Ince C.  
*Direct Observation Of The Human Cerebral Microcirculation During Aneurysm Surgery Reveals Increased Arteriolar Contractility.*  
Stroke 2004; 35: 1284-1288.
60. Philippon J., Grob R., Dageou F., Guggiari M. Et Al.  
*Prevention Of Vasospasm In Subarachnoid Haemorrhage. A Controlled Study With Nimodipine.*  
Acta Neurochirurgica 1986, 82: 110-114
61. Pluta R.  
*Delayed Cerebral Vasospasm And Nitric Oxide: Review, New Hypothesis, And Proposed Treatment.*  
Pharmacol Ther. 2005; 105: 23-56.
62. Prunell GF, Mathiesen T, Diemer NH, Svendgaard N-A.  
*Experimental Subarachnoid Hemorrhage: Subarachnoid Blood Volume, Mortality Rate, Neuronal Death, Cerebral Blood Flow, And Perfusion Pressure In Three Different Rat Models.*  
Neurosurgery 2003; 52: 165-176.
63. Prunell GF, Svendgaard N-A, Alkass K, Mathiesen T.  
*Inflammation In The Brain After Experimental Subarachnoid Hemorrhage.*  
Neurosurgery 2005; 56: 1082-1092.
64. Rap ZM, Chwalbińska-Moneta J.  
*Vasopressin Concentration In The Blood During Short-Term Intracranial Hypertension In Cats*  
Adv Neurol 1978; 20: 381-388
65. Rickels E., Seifert V., Et Al.  
*Corrugation Of Cerebral Vessels Following Subarachnoid Hemorrhage: Comparison Of Two Experimental Models Of Chronic Cerebral Vasospasm.*  
Experimental Neurology 1990, 107:178-186
66. Rijisdijk M., Van Der Schaaf I., Velthuis B., Wermer M., Rinkel G.  
*Global And Focal Cerebral Perfusion After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage In Relation With Delayed Cerebral Ischemia*  
Neuroradiology 2008, 50:813-820
67. Rodriguez-Baeza A., Reina-De La Torre F., Ortega-Sanchez M., Sahuquillo-Barris J.  
*Perivascular Structures In Corrosion Casts Of The Human Central Nervous System: A Confocal Laser And Scanning Electron Microscope Study.*  
Anat Rec 1998, 252:176-184
68. Rothoerl R., Ringel F.  
*Molecular Mechanisms Of Cerebral Vasospasm Following Aneurysmal SAH*  
Neurol Res 2007, 29:636-642
69. Sayama T, Suzuki S, Fukui M.  
*Expression Of Inducible Nitric Oxide Synthase In Rats Following Subarachnoid Hemorrhage.*  
Neurol Res 1998; 20: 79-84.



70. Soehle M., Czosnyka M., Pickard Jg., Kirkpatrick Pj.  
*Continuous Assessment Of Cerebral Autoregulation In Subarachnoid Hemorrhage.*  
Anesthesia Analgesia 2004, 98:1133-1139
71. Somlyo A P, Somlyo AV.  
*Signal Transduction And Regulation In Smooth Muscle.*  
Nature 1994; 372: 231-236.
72. Suzuki H., Muramatsu M., Kojima T., Taki W.  
*Intracranial Heme Metabolism And Cerebral Vasospasm After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage*  
Stroke 2003, 34:2796-2800
73. Suzuki K., Meguro K., Sakurai T., Et Al.  
*Endothelin-1 Concentration Increases In The Cerebrospinal Fluid In Cerebral Vasospasm Caused By Subarachnoid Hemorrhage.*  
Surg Neurol 2000, 53:131-135
74. Svirni G., Lewis D., Correa R., Britz G., Douville C., Newell D.  
*Basilar Artery Vasospasm And Delayed Posterior Circulation Ischemia After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage*  
Stroke 2004, 35:1867-1872
75. Schwartz AY., Masago A., Sehba FA., Bederson JB.  
*Experimental models of subarachnoid hemorrhage in the rat: a refinement of the endovascular filament model.*  
J Neurosci Methods 2000, 96:161-167
76. Treggiari MM, Walder B, Suter PM, Romand J-A.  
*Systematic Review Of The Prevention Of Delayed Ischemic Neurological Deficits With Hypertension, Hypervolemia, And Hemodilution Therapy Following Subarachnoid Hemorrhage.*  
J Neurosurg 2003; 98: 978-984.
77. Trandafir CC, Nishihashi T, Wang A, Et Al.  
*Participation Of Vasopressin In The Development Of Cerebral Vasospasm In A Rat Model Of Subarachnoid Hemorrhage.*  
Clin Exp Pharmacol Physiol 2004; 31: 261-266.
78. Tsou K., Sanudo-Pena M., Mackie K., Walker J.  
*Immunohistochemical Distribution Of Cannabinoid CB1 Receptors In The Rat Central Nervous System*  
Neuroscience 1998, 83:393-411
79. Uhl E, Lehmborg J, Steiger H-J, Messmer K.  
*Intraoperative Detection Of Early Microvasospasm In Patients With Subarachnoid Hemorrhage By Using Ortogonal Polarization Spectral Imaging.*  
Neurosurg 2003; 52: 1307-1317.
80. Vajkoczy P., Horn P., Thome C., Munch E., Schmiedek P.  
*Regional Cerebral Blood Flow Monitoring In The Diagnosis Of Delayed Ischemia Following Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage.*  
Neurosurg 2003, 98:1227-1234

81. Vatter H., Weidauer S., Konczalla J., Dettmann E., Et Al.  
*Time Course In The Development Of Cerebral Vasospasm After Experimental Subarachnoid Hemorrhage: Clinical And Neuroradiological Assessment Of The Rat Double Hemorrhage Model.*  
Neurosurgery 2006, 58:1190-1197
82. Vikman P, Beg S, Khurana T, Hansen-Schwartz J, Edvinsson L.  
*Gene Expression And Molecular Changes In Cerebral Arteries Following Subarachnoid Hemorrhage In The Rat.*  
J Neurosurg 2006; 105: 438-444.
83. Wier B.  
*The Pathophysiology Of Cerebral Vasospasm*  
Br J Neurosurg 1995, 9:375-390
84. Yamamoto S, Nishizawa S, Tsukada H, Et Al.  
*Cerebral Autoregulation Following Subarachnoid Hemorrhage In Rats: Chronic Vasospasm Shifts The Upper And Lower Limits Of The Autoregulatory Range Toward Higher Blood Pressure.*  
Brain Res 1998; 782: 194-201.
85. You JP, Johnson TD, Childres WF, Bryan RM Jr.  
*Endothelial-Mediated Dilatations Of Rat Middle Cerebral Arteries By ATP And ADP.*  
Am J Physiol 1997; 273: H1472-H1477.
86. Zhang ZD., Macdonald RL.  
*Contribution Of The Remodeling Response To Cerebral Vasospasm.*  
Neurol Res 2006, 28:713-720
87. Zubkov A., Nanda A., Zhang J.  
*Signal Transduction Pathways In Cerebral Vasospasm*  
Pathophysiology 2003, 9:47-61
88. Zygmunt P., Petersson J., Andersson D., Et Al.  
*Vanilloid Receptors On Sensory Nerves Mediate The Vasodilator Action Of Anandamide.*  
Nature 1999, 400:452457.