

# The role of haptoglobin phenotype and 24-hour blood pressure characteristics in cerebral small vessel disease

Citation for published version (APA):

Staals, J. E. (2009). *The role of haptoglobin phenotype and 24-hour blood pressure characteristics in cerebral small vessel disease*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20091204js>

**Document status and date:**

Published: 01/01/2009

**DOI:**

[10.26481/dis.20091204js](https://doi.org/10.26481/dis.20091204js)

**Document Version:**

Publisher's PDF, also known as Version of record

**Please check the document version of this publication:**

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

**General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

**Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

# Chapter 9

## Summary / Samenvatting



## Summary

**Lacunar stroke** accounts for about 25% of all ischemic strokes. It can be identified by rather specific clinical manifestations, the so-called lacunar stroke syndromes. It is usually caused by occlusion of a single small deep perforating artery or one of its branches, leading to infarction. On neuro-imaging it is represented by a small lacunar lesion, located deep in the brain or in the brain stem.

Lacunar stroke can be subtyped according to the presence or absence of additional **“silent” lesions** : asymptomatic lacunar infarcts, white matter lesions and brain microbleeds. Asymptomatic lacunar infarcts are small, deeply located infarcts that are not accompanied by acute neurological stroke symptoms. White matter lesions (or leukoaraiosis) are diffuse ischemic lesions in the deep or periventricular cerebral white matter. Brain microbleeds represent asymptomatic small old hemorrhages.

Knowledge about the underlying pathogenetic processes that lead to these different forms of **cerebral small vessel disease** is limited. To further dissolve the underlying pathogenetic processes we explored differences between lacunar stroke patients with and without these additional “silent” lesions.

Although lacunar stroke is generally considered a rather “benign” stroke, data on long-term prognosis are scarce. Most mortality studies are characterized by short follow-up time, small patient groups, and absence of a nonlacunar stroke group for comparison. Furthermore, long-term mortality data on lacunar stroke with or without concomitant “silent” lesions are lacking. In **chapter 2** we described a **long-term mortality** study in 782 first-ever cerebral infarct patients. We determined survival status after a median of 15.0 years in 333 atherothrombotic, 184 cardioembolic and 265 lacunar strokes. Lacunar stroke showed a lower 30-day case fatality rate than atherothrombotic and cardioembolic stroke. However, at the end of follow-up mortality in lacunar stroke was not significantly different from atherothrombotic stroke. Corrected for age, sex, diabetes mellitus, ischemic heart disease and hypertension, lacunar stroke showed better survival than cardioembolic stroke, but not than atherothrombotic stroke (Cox regression analysis).

Then we distinguished between lacunar stroke patients with or without asymptomatic lacunar infarcts on CT. The lacunar type without asymptomatic lesions showed a significantly better long-term survival, whereas the other type did not differ from atherothrombotic and cardioembolic stroke (Cox regression analysis). Distinguishing between lacunar stroke patients with or without leukoaraiosis gave similar results.

Firstly, this study showed that lacunar stroke cannot merely be considered a “benign” stroke type. Only in patients with a single lacunar lesion, unlike in those with additional “silent” lacunar lesions or leukoaraiosis, long-term survival is better

than in atherothrombotic stroke. Secondly, the difference in long-term mortality between lacunar stroke patients with or without “silent” lesions is in line with former findings of differences in vascular risk factor profile, in functional outcome, in recurrent stroke and in short-term mortality. These differences validate the distinction of lacunar stroke subtypes in our further research.

Up to recently, research in cerebral small vessel disease focused mainly on individual proteins that are already known to be involved in vascular pathogenesis. Research topics are often deducted from the scientific work on large vessel atherosclerotic disease or stroke in general. Unique factors in small vessel disease may go unnoticed in this way. In **chapter 3** we described how we applied Surface-Enhanced Laser Desorption / Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (**SELDI-TOF-MS**), a new approach to explore the expression profile of the total proteome. We compared serum protein profiles using SELDI-TOF-MS in eight lacunar stroke patients with and eight patients without concomitant “silent” lesions on MRI. A 16 kDa protein, identified as alpha-2-chain of haptoglobin, was found to be overrepresented in lacunar stroke patients without concomitant “silent” lesions compared to those with such lesions.

As a polymorphism with two alleles, Hp1 and Hp2, determines the presence of alpha-1 and/or alpha-2-chains in the haptoglobin-molecule, we subsequently performed haptoglobin phenotypic analysis. We found a higher Hp2 allele frequency in the lacunar stroke patients without concomitant “silent” lesions (0.438) than in those with such lesions (0.188), concluding that the overrepresentation of the alpha-2-chain in lacunar stroke patients without concomitant “silent” lesions related to a higher Hp2 allele frequency.

A further remarkably finding was that the Hp2 allele frequency in both lacunar stroke groups differed significantly from the expected allele frequency (0.600) derived from a general population reference group.

We showed that using SELDI-TOF-MS it is possible to detect differences in protein expression between two lacunar stroke subtypes. Our findings led to a new idea about a genetic contribution in the etiology of cerebral small vessel disease: haptoglobin phenotype.

## Haptoglobin phenotype

Due to the existence of two coding alleles, Hp1 and Hp2, three haptoglobin protein phenotypes with functional differences occur: Hp1-1, Hp2-1 and Hp2-2. The Hp2-2 phenotype has been associated with extracerebral large vessel disease. However, haptoglobin phenotypes have not been studied in cerebral small vessel disease. The results of the SELDI-TOF-MS study (chapter 3) led us to the exploration of **haptoglobin phenotypes in lacunar stroke**, which is described in **chapter 4**. Using starch gel electrophoresis, we determined haptoglobin phenotypes in 124 lacunar stroke patients and compared these to a large healthy control group.

Haptoglobin phenotypic distribution differed significantly between lacunar stroke patients and healthy controls ( $\chi^2$  analysis,  $p=0.032$ ): in lacunar stroke patients the Hp2-2 frequency was lower and the Hp1-1 frequency was higher. Hp1 allele frequency was significantly higher in lacunar stroke patients compared to healthy controls (0.480 vs 0.395,  $p=0.011$ ).

The association between the Hp1 allele and lacunar stroke, whereas Hp2-2 phenotype has been associated with extra-cerebral large vessel disease in other studies, suggests a different role for haptoglobin phenotypes in large and small vessel disease. This may depend on functional differences between the phenotypes that may have different importance in various vascular diseases: we discussed possible differences in effect on blood pressure regulation, differences in antioxidant and immunomodulatory capacities, differences in angiogenic effects that may be involved in blood-brain barrier integrity, and differences in the ability to pass the (dysfunctional) blood-brain barrier.

Then, we examined the relationship between **haptoglobin phenotypes** and “silent” signs of cerebral small vessel disease **in hypertensive patients**, which is described in **chapter 5**. Using starch gel electrophoresis, we determined haptoglobin phenotypes in 154 hypertensive patients without symptomatic vascular disease. Asymptomatic lacunar infarcts and volume of deep and periventricular white matter lesions were scored on MRI.

Compared to Hp2-2, phenotype Hp1-1 was associated with larger volumes of deep white matter lesions with an odds ratio of 2.77 (95%CI 1.07-7.10; ordinal regression analysis with adjustment for age, sex, brain volume, 24-hour mean arterial pressure, duration of hypertension and previous antihypertensive treatment). We found no association between haptoglobin phenotype and periventricular white matter lesions or the presence of asymptomatic lacunar infarcts.

The association between Hp1-1 phenotype and the extent of asymptomatic hypertensive deep white matter damage adds to the former study (chapter 4) in which we showed an association between the Hp1 allele and symptomatic cerebral small vessel disease (i.e. lacunar stroke). Contrarily, Hp2-2 has been associated with extra-cerebral large vessel disease. We assume that different functional properties of haptoglobin phenotypes play a vasculature-specific role and this may explain the different associations of the haptoglobin phenotype with various vascular diseases. There are indications that the Hp1-1 phenotype relates to lower regenerating power against endothelial injury, which may lead to blood-brain barrier dysfunction, probably an important factor in small vessel disease.

The different results for deep and periventricular white matter lesions add to earlier studies that showed differences regarding genetic factors, vascular risk factors, progression rate and clinical consequences in terms of cognitive impairment. They are indicative of distinct subtypes of white matter lesions, possibly depending on

differences in vascular supply of the deep and periventricular white matter areas. The role of haptoglobin may differ between these vascular areas.

However, studies on the precise pathogenetic mechanisms of haptoglobin phenotypes in different vascular diseases or in different vascular areas are awaiting.

## 24-hour blood pressure characteristics

Hypertension is an important risk factor for stroke in general. In particular, hypertension is considered a strong risk factor for “silent” small vessel lesions. However, hypertension is just a qualitative label, mostly established by a few office blood pressure measurements. Ambulatory blood pressure, easily measured by ambulatory blood pressure monitoring, is a better predictor for blood pressure related end organ damage than office blood pressure, allows exploring blood pressure quantitatively, and gives additional information about 24-hour blood pressure characteristics such as night in addition to day blood pressure and nocturnal dipping.

While associations between ambulatory blood pressure characteristics and asymptomatic lacunar infarcts and white matter lesions have quite extensively been studied in stroke-free (mainly hypertensive) patients, studies in lacunar stroke patients are few. In **chapter 6** we studied the relationship between **24-hour ambulatory blood pressure characteristics** and **asymptomatic lacunar infarcts and white matter lesions** in 143 first-ever lacunar stroke patients. Ambulatory blood pressure monitoring over a 24-hour period was performed after the acute stroke phase. We classified the number of asymptomatic lacunar infarcts on MRI in three categories (0, 1-2,  $\geq 3$ ), and we graded the severity of deep and periventricular white matter lesions according to Fazekas scale in four ordinal categories.

Both higher day and night systolic and diastolic ambulatory blood pressure levels were significantly associated with asymptomatic lacunar infarcts (ordinal regression analyses, odds ratios 1.5-1.6 per standard deviation increase in blood pressure, adjusted for age, sex and number of antihypertensive drugs in use by each patient). A high blood pressure during day and night, i.e. a high cumulative 24-hour blood pressure load, probably plays a role in causing dysfunction of the small vessel endothelium, which is considered a main pathogenetic feature in small vessel disease.

None of the blood pressure characteristics was significantly associated with deep or periventricular white matter lesions. We think that blood pressure might play a complex, dual role in white matter lesions: high blood pressure levels may be an initial causal factor in small vessel pathology, by causing endothelial dysfunction. However, once the small arteries are diseased, low blood pressure levels may worsen white matter damage by hypoperfusion. Therefore, depending on the stage of the small vessel damage, similar blood pressure levels may enhance or forestall

further damage in different patients. This effect may have obscured a clear effect of blood pressure on white matter lesions in our study.

Nocturnal dipping was not found to be related to asymptomatic lacunar infarcts or white matter lesions. However, there is no consensus on how to define nocturnal dipping and its reproducibility is quite poor.

We conclude that future blood pressure controlling studies in lacunar stroke patients should address both day and night blood pressure, and should pay extra attention to the presence of white matter lesions.

Although hypertension is a known risk factor for brain microbleeds, associations between ambulatory blood pressure characteristics and brain microbleeds have not been studied in lacunar stroke patients. We looked for associations between **24-hour ambulatory blood pressure characteristics** and **brain microbleeds** in 123 first-ever lacunar stroke patients (**chapter 7**). In these patients, ambulatory blood pressure monitoring over a 24-hour period was performed after the acute stroke phase. We counted brain microbleeds on T2\*-weighted gradient-echo MR images and classified them in three categories (0, 1,  $\geq 2$ ).

Brain microbleeds were seen in 36 (29.3%) patients. Both day and night systolic and diastolic ambulatory blood pressure levels were significantly associated with the presence and number of brain microbleeds (ordinal regression analyses, odds ratios 1.6-2.3 per standard deviation increase in blood pressure, adjusted for age, sex, number of antihypertensive drugs, asymptomatic lacunar infarcts and white matter lesions). These results emphasize the importance of an increased 24-hour blood pressure load as an important risk factor for brain microbleeds in lacunar stroke patients.

It is suggested that the etiology of brain microbleeds differs according to their location in the brain, analogous to symptomatic brain hemorrhage: microbleeds in deep locations may result from hypertension-related vasculopathy, while microbleeds in lobar locations may relate to amyloid angiopathy. We thus distinguished between microbleeds in deep brain locations and microbleeds in lobar locations. Various ambulatory blood pressure characteristics were significantly associated with the presence of deep (or combined deep and lobar) brain microbleeds, but not with purely lobar brain microbleeds. Our results support the idea that deep brain microbleeds may be a particular marker of blood pressure-related small vessel disease. However, the subgroups were small, and longitudinal and larger studies are warranted to substantiate these findings.

In **chapter 8 (general discussion)** I discussed the implications of our findings for future research. Firstly, further appliance of SELDI-TOF-MS in small vessel research was discussed. One of the most limiting factors of this technique at this moment is that it only detects highly abundant proteins, which restricts the use of SELDI-TOF-MS in small vessel research at this time. However, when new developments will



improve the technique in future, the SELDI-TOF-MS approach may still prove valuable. Secondly, strategies of genetic research in lacunar stroke were discussed. The candidate gene approach, such as our studies on haptoglobin phenotype, genomic wide screening, and linkage analysis in affected sib-pairs were mentioned. Thirdly, I discussed on the clear association between 24-hour ambulatory blood pressure characteristics and the presence of silent lacunar infarcts and brain microbleeds, versus the probably more complex relationship between blood pressure and white matter lesions. The need for longitudinal studies, and the influence of other factors, such as cerebral autoregulation, were mentioned. Fourthly, I gave some views on the clinical and therapeutical consequences of our findings. Finally, I stated that we should go beyond the view that small vessel disease is one disease entity. Besides distinguishing asymptomatic lacunar infarcts, white matter lesions and brain microbleeds, there are also arguments to distinguish deep subcortical from periventricular white matter lesions, and deep from lobar brain microbleeds. As they occur in different vascular territories and show differences in pathogenesis, the different lesions should be splitted in future research.

## Samenvatting

Ongeveer 25% van alle ischemische beroertes betreft een **lacunaire beroerte**. Een lacunaire beroerte kan herkend worden aan specifieke klinische verschijnselen, de zogenaamde lacunaire syndromen. Een lacunaire beroerte wordt meestal veroorzaakt door afsluiting van één van de kleine diepe perforerende hersenvaten, of een zijtak daarvan, hetgeen tot een infarct leidt. Een scan toont een kleine lacunaire laesie diep in het brein of in de hersenstam.

Lacunaire beroertes kunnen onderverdeeld worden naar de aan- of afwezigheid van bijkomende **“stille” laesies** veroorzaakt door pathologie van de kleine hersenvaten: asymptomatische lacunaire infarcten, witte stoflaesies en microbloedingen. Asymptomatische lacunaire infarcten zijn kleine, diep in het brein gelegen infarcten die niet gepaard gaan met acute neurologische uitvalsverschijnselen. Witte stoflaesies (ook leukoaraiose genoemd) zijn diffuse ischemische laesies in de diepe of periventriculaire witte stof van het brein. Microbloedingen zijn asymptomatische, kleine, oude bloedingen.

Kennis over de onderliggende pathogenetische processen die tot deze verschillende **aandoeningen van de kleine hersenvaten** leiden, is beperkt. Om de onderliggende pathogenetische processen verder te ontrafelen, onderzochten we verschillen tussen patiënten met een lacunaire beroerte met en zonder deze bijkomende “stille” laesies.

Hoewel lacunaire beroertes over het algemeen als vrij “goedaardige” beroertes beschouwd worden, zijn gegevens over lange termijnprognose beperkt. De meeste mortaliteitsonderzoeken worden gekenmerkt door een korte follow-up tijd, kleine patiëntaantallen, en de afwezigheid van een controlegroep met niet-lacunair infarctpatiënten. Bovendien zijn er geen lange termijn mortaliteitsgegevens over lacunaire beroertes met of zonder bijkomende “stille” laesies.

In **hoofdstuk 2** beschreven we een onderzoek naar **lange termijnmortaliteit** bij 782 patiënten met een eerste beroerte. We bepaalden de overlevingsstatus na een mediaan van 15 jaar bij 333 atherothrombotische beroertes, 184 cardioembolische beroertes, en 265 lacunaire beroertes. De 30-dagen *case fatality rate* was lager bij lacunaire beroertes dan bij atherothrombotische en cardioembolische beroertes. Aan het einde van de follow-up was de mortaliteit van lacunaire beroertes echter niet lager dan van atherothrombotische beroertes. Gecorrigeerd voor leeftijd, geslacht, diabetes mellitus, coronairlijden en hypertensie, hadden patiënten met lacunaire beroertes een betere overleving dan patiënten met cardioembolische beroertes, maar niet beter dan patiënten met atherothrombotische beroertes (Cox regressie analyse).

Daarna onderzochten we verschillen tussen lacunaire beroertes met en zonder asymptomatische lacunaire infarcten op CT-scan. Het lacunaire type zonder asymptomatische laesies had een significant betere lange termijnoverleving, terwijl

het andere type niet verschilde van atherothrombotische en cardioembolische beroertes (Cox regressie analyse). Onderverdeling van lacunaire beroertes naar de aan- of afwezigheid van leukoaraiose gaf vergelijkbare resultaten.

Ten eerste toonde dit onderzoek aan dat lacunaire beroertes niet zondermeer als “goedaardig” beschouwd kunnen worden. In vergelijking met atherothrombotische beroertes is de lange termijnoverleving van lacunaire beroertes alleen beter bij patiënten met een enkel lacunair infarct en niet bij de aanwezigheid van “stille” lacunaire infarcten of leukoaraiose. Ten tweede past het verschil in lange termijnmortaliteit tussen lacunaire beroertes met en zonder bijkomende “stille” laesies bij eerdere onderzoeken die verschillen aantoonde in klinische gevolgen (functionele uitkomst, recidief beroertes en korte termijnmortaliteit), en verschillen in vasculair risicoprofiel. Dit valideert het onderscheiden van subtypes van lacunaire beroertes in ons verdere onderzoek.

Tot voor kort was onderzoek naar de aandoening van de kleine hersenvaten vooral gericht op individuele eiwitten waarvan bekend is dat ze betrokken zijn bij de pathogenese van vasculaire aandoeningen. Het onderzoeksonderwerp wordt vaak afgeleid van eerder onderzoek naar atherosclerose van de grote vaten of beroerte in het algemeen. Unieke factoren die een rol spelen in aandoeningen van de kleine hersenvaten kunnen hierdoor onopgemerkt blijven. In **hoofdstuk 3** beschreven we de toepassing van Surface-Enhanced Laser Desorption / Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (**SELDI-TOF-MS**), een nieuwe manier om het expressieprofiel van het gehele proteoom te onderzoeken. We vergeleken serum eiwitprofielen van acht patiënten met een lacunaire beroerte met, en acht zonder aanwezigheid van bijkomende “stille” laesies op MRI-scan. Bij patiënten zonder bijkomende “stille” laesies vonden we een hogere expressie van een 16 kDa eiwit dan bij patiënten met bijkomende “stille” laesies. Het eiwit werd geïdentificeerd als alpha-2-keten van haptoglobine.

Een polymorfisme met twee allelen, Hp1 en Hp2, bepaalt de aanwezigheid van alfa-1 en/of alfa-2-ketens in het haptoglobinemolecuul. Daarom werd vervolgens een haptoglobine fenotype-analyse verricht. Er werd een hogere Hp2 allelfrequentie (0.438) gevonden bij de patiënten zonder “stille” laesies dan bij de patiënten met bijkomende laesies (0.188). We concludeerden dat de hogere expressie van de alfa-2-keten in de groep patiënten zonder bijkomende “stille” laesies gerelateerd is aan een hogere Hp2 allelfrequentie.

Een volgende opvallende bevinding was dat de Hp2 allelfrequentie in beide groepen patiënten significant verschilde van de verwachte allelfrequentie in een referentiegroep uit de algemene bevolking (0.600).

Concluderend hebben we in dit hoofdstuk laten zien dat het met de SELDI-TOF-MS techniek mogelijk is om verschillen in eiwitexpressie aan te tonen tussen twee subtypes van lacunaire beroertes. Onze bevindingen hebben bovendien tot een

nieuw idee geleid met betrekking tot de genetische bijdrage aan de etiologie van de aandoening van de kleine hersenvaten: het haptoglobine fenotype.

## Haptoglobine fenotype

Twee coderende allelen, Hp1 en Hp2, leiden tot het bestaan van drie haptoglobine eiwitfenotypes: Hp1-1, Hp2-1 en Hp2-2. Het Hp2-2 fenotype is geassocieerd met extracerebrale aandoeningen van de grote vaten. In de aandoening van de kleine hersenvaten zijn haptoglobine fenotypes niet onderzocht. De resultaten van het SELDI-TOF-MS onderzoek (hoofdstuk 3) gaven aanleiding tot onderzoek van het **haptoglobine fenotype bij lacunaire beroertes**, hetgeen in **hoofdstuk 4** werd beschreven. Met gelelectroforese werd het haptoglobine fenotype bepaald bij 124 patiënten met een lacunaire beroerte, en deze werden vergeleken met een grote gezonde controlegroep.

De fenotypeverdeling was significant verschillend tussen patiënten met een lacunaire beroerte en gezonde controles ( $\chi^2$  analyse,  $p=0.032$ ): bij de patiënten met een lacunaire beroerte was de Hp2-2 frequentie lager en de Hp1-1 frequentie hoger. De Hp1 allelfrequentie was derhalve ook significant hoger bij de patiënten met een lacunaire beroerte dan bij de gezonde controles (0.480 vs 0.395,  $p=0.011$ ).

De associatie tussen Hp1 allel en lacunaire beroertes, terwijl Hp2-2 fenotype geassocieerd is met extracerebrale aandoeningen van de grote vaten, suggereert dat haptoglobinefenotypes een verschillende rol spelen in de grote en in de kleine vaten. Mogelijk heeft dit te maken met functionele verschillen tussen de fenotypes, met een verschillend effect op het ontstaan van vasculaire aandoeningen: in het hoofdstuk werden mogelijke verschillen in effect op bloeddrukregulatie besproken, alsmede verschillen in antioxiderende en immuunmodulatoire eigenschappen, verschillen in angiogene effecten die van belang kunnen zijn voor de integriteit van de bloed-hersenbarrière, en verschillen in de mogelijkheid om de (dysfunctionele) bloed-hersenbarrière te passeren.

Daarna onderzochten we in **hoofdstuk 5** de relatie tussen het **haptoglobine fenotype** en “stille” laesies van de kleine hersenvaten bij **hypertensieve patiënten**. Haptoglobine fenotypes werden met zetmeelgelelectroforese bepaald bij 154 hypertensieve patiënten zonder symptomatisch vaatlijden. Op MRI-scans werden asymptomatische lacunaire infarcten en het volume van diepe en periventriculaire witte stoflaesies bepaald.

In vergelijking met Hp2-2, was fenotype Hp1-1 geassocieerd met grotere volumes van diepe witte stoflaesies, met een odds ratio van 2.77 (95%-betrouwbaarheidsinterval 1.07-7.10; ordinale regressie-analyse met correctie voor leeftijd, geslacht, hersenvolume, 24-uurs *mean arterial pressure*, duur van de hypertensie en eerdere bloeddrukbehandeling). We vonden geen associatie tussen

haptoglobine fenotype en periventriculaire witte stoflaesies of asymptomatische lacunaire infarcten.

De associatie tussen fenotype Hp1-1 en de uitgebreidheid van asymptomatische hypertensieve diepe witte stofschade is een aanvulling op het vorige onderzoek (hoofdstuk 4) waarin we een associatie aantoonde tussen Hp1 allel en symptomatisch lijden van de kleine hersenvaten (ofwel lacunaire beroerte). Daarentegen is Hp2-2 geassocieerd met aandoeningen van de grote vaten buiten het brein. We veronderstellen dat verschillende functionele eigenschappen van de haptoglobine fenotypes een vaatspecifieke rol spelen. Dit zou de verschillende associaties van haptoglobine fenotypes met verschillende vaataandoeningen kunnen verklaren. Er zijn aanwijzingen dat fenotype Hp1-1 gepaard gaat met minder herstelvermogen van endotheelschade, hetgeen kan leiden tot disfunctie van de bloed-hersenbarrière. Barrièredysfunctie is waarschijnlijk een belangrijke factor in de aandoening van de kleine hersenvaten.

De verschillende resultaten voor diepe en periventriculaire witte stoflaesies past bij eerdere onderzoeken die verschillen in genetische factoren, vasculaire risicofactoren, mate van progressie, en klinische gevolgen in de zin van cognitief (dys)functioneren aantoonde. Deze onderzoeken wijzen op het bestaan van verschillende subtypes van witte stoflaesies, mogelijk samenhangend met verschillen in de bloedtoevoer van de diepe en periventriculaire witte stofgebieden. De rol van haptoglobine zou verschillend kunnen zijn in deze vaatgebieden.

Onderzoek naar de precieze pathogenetische mechanismen van haptoglobine fenotypes in verschillende vaataandoeningen ontbreekt echter nog.

## 24-uurs bloeddrukkenmerken

Hypertensie is een belangrijke risicofactor voor beroerte in het algemeen, en wordt in het bijzonder beschouwd als een sterke risicofactor voor “stille” laesies van de kleine hersenvaten. Hypertensie is echter slechts een kwalitatief label, meestal vastgesteld met een paar spreekkamermetingen. De ambulante bloeddruk, eenvoudig te meten met een ambulante bloeddrukmeter, is een betere voorspeller voor bloeddrukgerelateerde eindorgaanschade dan de spreekkamerbloeddruk. De ambulante bloeddruk geeft bovendien de mogelijkheid om bloeddruk kwantitatief te onderzoeken en geeft extra informatie over 24-uurs bloeddrukkenmerken zoals dag- en nachtwaardes en nachtelijke dipping.

Associaties tussen ambulante bloeddrukkenmerken en asymptomatische lacunaire infarcten en witte stoflaesies zijn vrij uitgebreid onderzocht bij (meestal hypertensieve) patiënten zonder doorgemaakte beroerte. Er zijn echter maar weinig onderzoeken gedaan bij patiënten met een lacunaire beroerte. In **hoofdstuk 6** onderzochten we de relatie tussen **24-uurs bloeddrukkenmerken** en **asymptomatische lacunaire infarcten en witte stoflaesies** bij 143 patiënten met een eerste lacunaire beroerte. Ambulante 24-uurs bloeddrukmetingen werden na

de acute fase uitgevoerd. Het aantal asymptomatische lacunaire infarcten op MRI-scan werd in drie categorieën ingedeeld (0, 1-2,  $\geq 3$ ). De ernst van de diepe en periventriculaire witte stoflaesies werd gescoord volgens de schaal van Fazekas in vier ordinale categorieën.

Zowel een hogere dag- als nacht- systolische en diastolische ambulante bloeddruk was significant geassocieerd met asymptomatische lacunaire infarcten (ordinale regressie analyses, odds ratio's 1.5-1.6 per standaarddeviatie toename in bloeddruk, gecorrigeerd voor leeftijd, geslacht en aantal antihypertensiva dat door elke patiënt werd gebruikt). Een hoge bloeddruk gedurende dag en nacht, dus een hoge cumulatieve 24-uurs bloeddruklast, speelt waarschijnlijk een rol in het veroorzaken van disfunctie van het endotheel in de kleine bloedvaten. Endotheeldysfunctie wordt als een hoofdkenmerk in de pathogenese van de aandoening van de kleine hersenvaten beschouwd.

Geen enkele bloeddrukkenmerk was significant geassocieerd met diepe of periventriculaire witte stoflaesies. We denken dat bloeddruk hier een complexe, dubbele rol speelt: hoge bloeddruk kan een initiële oorzakelijke factor in de pathologie van de kleine vaten zijn, doordat het disfunctie van het endotheel veroorzaakt. Als de kleine vaten echter eenmaal zijn aangedaan, kan een lage bloeddruk de witte stofschade verergeren, doordat het leidt tot hypoperfusie. Afhankelijk van het stadium van de schade, zouden dezelfde bloeddrukwaardes bij de ene patiënt schade kunnen verergeren, maar bij de andere patiënt verdere schade juist voorkomen. Dit effect zou een duidelijke relatie tussen bloeddruk en witte stoflaesies in ons onderzoek verhuld kunnen hebben.

Nachtelijke dipping was niet gerelateerd aan asymptomatische lacunaire infarcten of witte stoflaesies. Er is echter geen consensus over de definitie van nachtelijke dipping en de reproduceerbaarheid is vrij slecht.

Toekomstige onderzoeken naar bloeddrukbehandeling bij patiënten met een lacunaire beroerte zouden zowel dag- als nachtbloeddruk moeten meenemen, en zouden extra aandacht moeten hebben voor de aanwezigheid van witte stoflaesies.

Hoewel hypertensie een bekende risicofactor voor microbloedingen is, zijn associaties tussen ambulante bloeddrukkenmerken en microbloedingen nooit onderzocht bij patiënten met een lacunaire beroerte. Wij onderzochten associaties tussen **24-uurs ambulante bloeddrukkenmerken** en **microbloedingen** bij 123 patiënten met een eerste lacunaire beroerte (**hoofdstuk 7**). Ambulante 24-uurs bloeddrukmetingen werden na de acute fase uitgevoerd. Microbloedingen werden geteld op T2\*-gewogen gradiënt-echo MR beelden, en ingedeeld in drie categorieën (0, 1,  $\geq 2$ ).

Microbloedingen werden bij 36 (29.3%) patiënten gezien. Zowel dag- als nachtsystolische en diastolische ambulante bloeddruk waren significant geassocieerd met de aanwezigheid en aantal microbloedingen (ordinale regressie analyses, odds ratio's 1.6-2.3 per standaarddeviatie toename in bloeddruk, gecorrigeerd voor

leeftijd, geslacht, aantal antihypertensiva, asymptotische lacunaire infarcten en witte stoflaesies). Deze resultaten benadrukken het belang van een hoge 24-uurs bloeddruklast als belangrijke risicofactor voor microbloedingen bij patiënten met een lacunaire beroerte.

Men suggereert dat de etiologie van microbloedingen verschilt per lokatie in de hersenen, parallel aan symptomatische hersenbloedingen: microbloedingen in diepe lokaties zouden gerelateerd zijn aan een hypertensie-gerelateerde vasculopathie, en microbloedingen in oppervlakkige lobaire lokaties aan amyloid angiopathie. We maakten daarom onderscheid tussen microbloedingen in diepe en in lobaire hersengebieden, en vonden dat verschillende bloeddrukkenmerken significant geassocieerd waren met diep (of gecombineerd diep en lobair) gelegen microbloedingen, maar niet met louter lobair gelegen microbloedingen. Deze resultaten ondersteunen het idee dat diep gelegen microbloedingen een specifieke marker zijn van de bloeddrukgerelateerde aandoening van de kleine hersenvaten. De subgroepen waren echter klein, en longitudinale en grotere onderzoeken zijn nodig om deze bevindingen te bevestigen.

In **hoofdstuk 8 (algemene discussie)** besprak ik de implicaties van onze bevindingen voor toekomstig onderzoek. Ten eerste de verdere toepassing van SELDI-TOF-MS in onderzoek naar de kleine hersenvaten: een van de meest beperkende factoren van deze techniek op dit moment is, dat het alleen eiwitten detecteert die in hoge concentraties aanwezig zijn. Dit beperkt het gebruik van SELDI-TOF-MS in onderzoek naar de kleine hersenvaten. Als nieuwe ontwikkelingen de techniek in de toekomst zullen verbeteren, zal de SELDI-TOF-MS benadering echter nog steeds waardevol kunnen blijken. Ten tweede strategieën van genetisch onderzoek bij lacunaire beroertes: de kandidaatgen-benadering, zoals onze onderzoeken naar het haptoglobine fenotype, alsmede genomwijde screening en linkage-analyse bij aangedane familieleden, werden besproken. Ten derde de duidelijke associatie tussen 24-uurs ambulante bloeddrukkenmerken en de aanwezigheid van asymptotische lacunaire infarcten en microbloedingen, versus de waarschijnlijk meer complexe relatie tussen bloeddruk en witte stoflaesies. Hierbij noemde ik de noodzaak tot longitudinale onderzoeken, en de invloed van andere factoren zoals cerebrale autoregulatie. Ten vierde mijn ideeën over de klinische en therapeutische gevolgen van onze bevindingen. Tenslotte stelde ik dat we de aandoening van de kleine hersenvaten nu niet langer als één ziekte-entiteit moeten blijven beschouwen. Behalve het onderscheiden van asymptotische lacunaire infarcten, witte stoflaesies en microbloedingen, zijn er ook argumenten om diepe subcorticale van periventriculaire witte stoflaesies te onderscheiden, en diepe van lobaire microbloedingen. Omdat de verschillende laesies in verschillende vaatgebieden voorkomen en verschillen vertonen in pathogenese, zullen ze in toekomstig onderzoek uitgesplitst moeten worden.