

Cerebral small vessel disease : endothelial progenitor cells and markers of vascular inflammation

Citation for published version (APA):

Rouhl, R. P. W. (2012). *Cerebral small vessel disease : endothelial progenitor cells and markers of vascular inflammation*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20120302rr>

Document status and date:

Published: 01/01/2012

DOI:

[10.26481/dis.20120302rr](https://doi.org/10.26481/dis.20120302rr)

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

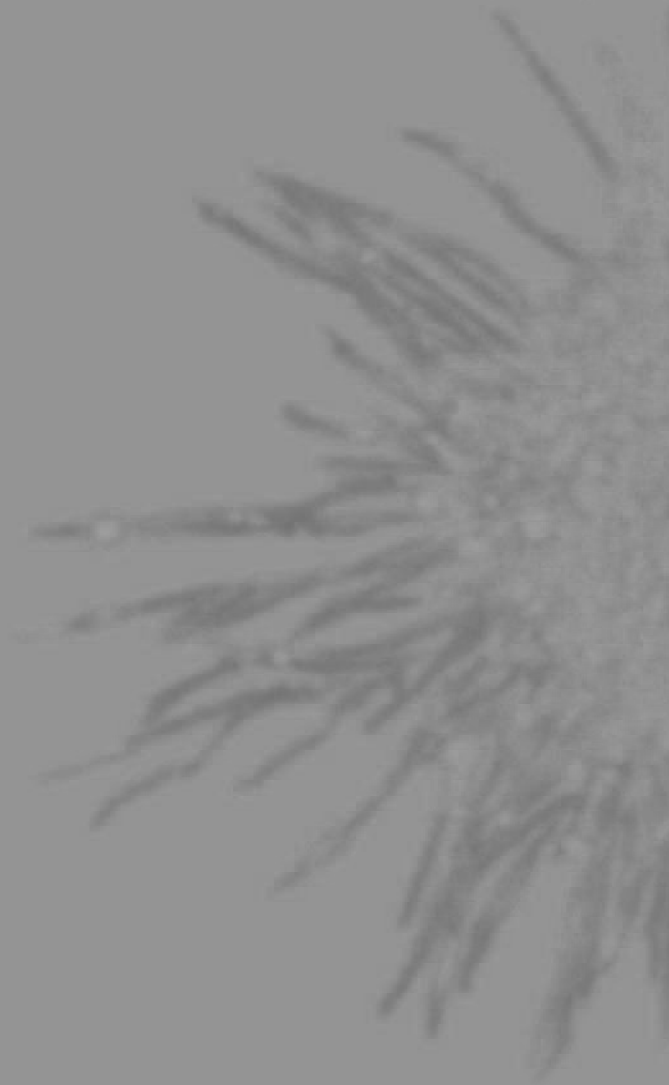
Take down policy

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

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary



Summary

Cerebral small vessel disease (CSVD) is a disease of the small penetrating arterioles in the brain. CSVD causes lacunar infarcts and white matter lesions (WML). CSVD has a high morbidity: it relates to (recurrent) ischemic stroke, cognitive disturbance and decline. Furthermore, patients with extensive CSVD (lacunar stroke patients with WML) have a worse prognosis (with regard to morbidity, stroke recurrence, and mortality), also on the long term, as compared to lacunar stroke patients without extensive CSVD (WML). However, the cause of CSVD, and therefore any therapeutic or preventive regimen, remains elusive. One of the current hypotheses is that blood-brain barrier (BBB) dysfunction will ultimately lead to CSVD. Because the BBB comprises the complex interplay between endothelial cells and the surrounding tissue, dysfunction of one of its components could lead to the dysfunction of the entire BBB. The main hypothesis of the research presented in this thesis is that endothelial dysfunction relates to CSVD (**Chapter 1**). Possible causes of this dysfunction are inflammation (immune activation) and a defective endothelial repair mechanism.

Before examining this hypothesis, we first examined the relation between established radiological manifestations of CSVD (lacunar infarcts and WML) and enlarged Virchow Robin spaces in **Chapter 2**. Our aim was to extend the spectrum of CSVD with another radiological manifestation, namely the enlarged Virchow Robin spaces. We found in 165 first-ever lacunar stroke patients, that increasing numbers of enlarged Virchow Robin spaces at the level of the basal ganglia related to an increasing extent of WML and (asymptomatic) lacunar infarcts. This suggests that WML and lacunar infarcts share their underlying vascular abnormality (CSVD) with enlarged Virchow Robin spaces.

We then continued with a study in two different patient groups (lacunar stroke patients and essential hypertensive patients) to examine the relation between immune activation, endothelial dysfunction and CSVD. In the first part, we measured antibodies against oxidized forms of LDL, which also relate to another vascular disease: atherosclerosis. In **Chapter 3**, we studied 158 lacunar stroke patients, 158 essential hypertensive patients and 43 controls. We found that patients with CSVD (as defined by the presence of WML and lacunar infarcts on MR of the brain) had higher levels of (possibly harmful) IgG-antibodies against hypochlorite oxidized LDL as well as lower levels of (possibly protective) IgM-antibodies against malondialdehyde modified LDL than patients without such lesions. Furthermore, we found that higher IgG-antibodies against hypochlorite oxLDL-levels were independently related to higher numbers of our newly found marker of CSVD: Virchow Robin spaces at the level of the basal ganglia. In the second part, we measured markers of endothelial dysfunction and markers of monocyte activation. In **Chapter 4**, we studied 163 lacunar stroke patients, as well as 183 essential hypertensive patients. We found that levels of neopterin, a

marker for monocyte activation by T-lymphocytes, as well as markers of endothelial dysfunction (sICAM and sVCAM) were higher in patients with extensive WML and lacunar infarcts. From these two studies we conclude that an immune response, involving activated and dysfunctional endothelium as well as activated monocytes and antibody production, may play a role in CSVD.

The effect of immune activation and endothelial dysfunction on the BBB and the pathogenesis of CSVD might be counteracted by protective mechanisms. Endothelial progenitor cells (EPC) may constitute one such protective mechanism. EPC are *immature* endothelial cells which circulate in peripheral blood. EPC are may repair damaged endothelium and may attenuate the endothelial dysfunction, which possibly causes CSVD. As EPC research in stroke and cerebrovascular disease is limited, we provided an overview of the potentials and pitfalls of EPC research in stroke and cerebrovascular disease in **Chapter 5**. We tried to instigate vascular neurologists to participate in EPC research, as EPC could also change pathophysiological concepts and improve clinical treatments in vascular neurology.

In **Chapter 6**, our aim was to demonstrate a relation between EPC number and vitality and CSVD (WML and multiple lacunar infarcts) in patients with a first-ever lacunar stroke and healthy controls. We also looked for possible regulating factors for EPC function in patient serum and studied the effect of different haptoglobin phenotypes on EPC. Haptoglobin is an acute phase protein, of which one of its three phenotypes, the 1-1, relates to WML and lacunar infarcts. This relation might be via its effect on endothelial biology and EPC. We studied 42 lacunar stroke patients and 18 controls without CSVD. We found that EPC vitality was lower in patients especially in those with WML and/or lacunar infarcts, than in controls. We also found that EPC vitality was inhibited by patient serum, especially by serum of patients with WML and lacunar infarcts, but not by control serum. Patients with haptoglobin 1-1 had lower EPC vitality, and when haptoglobin 1-1 was added to EPC cultures, EPC vitality was lower than with the other haptoglobin phenotypes.

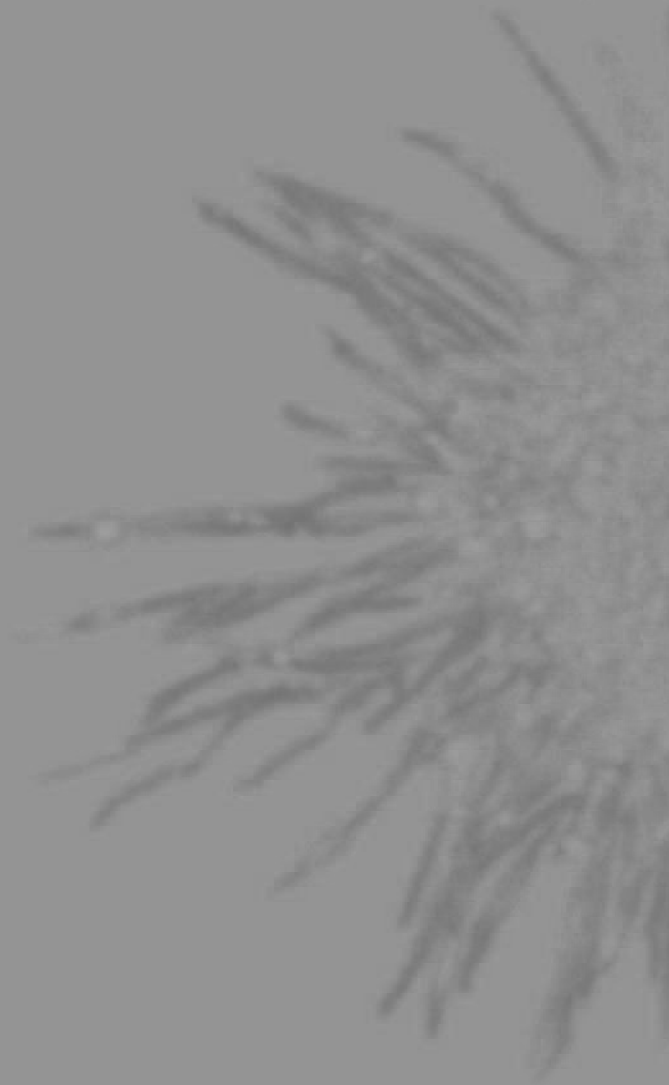
In **Chapter 7**, our aim was to demonstrate a relation between EPC number and vitality and another possible regulating factor in EPC function, the angiogenic T-cell. These cells promote the formation of new blood vessels and endothelial repair by directly stimulating the function of EPC. In a study in 32 hypertensive patients with CSVD (WML, lacunar infarcts, microbleeds) and 29 hypertensive patients without CSVD, we found that EPC as well as angiogenic T-cell numbers were lower in hypertensives with CSVD than in those without. The relation between lower angiogenic T-cell numbers and CSVD remained significant after correction for other parameters. From these two studies we conclude that patients with CSVD may have a defective endothelial repair mechanism, which, at least partly, might be due to the haptoglobin phenotype as well as to lower angiogenic T-cell numbers.

In **Chapter 8**, the implications and applicability of the main findings are discussed and put into perspective. All studies suggest that the (cerebral) endothelium is involved in CSVD. This involvement probably concerns a process with inflammation and defective endothelial repair. This process might lead to a dysfunction of the blood brain barrier and CSVD. This conclusion however, leaves several questions unanswered, like:

- 1) Do markers of endothelial activation and inflammation, enlarged Virchow-Robin spaces, and EPC parameters also predict CSVD progression radiologically as well as clinically (mainly in the area of cognitive function)?
- 2) Are the parameters we measured actually reflecting endothelial activation/dysfunction and/or damage and does this process actually occur in the brain?
- 3) Is enhancement of the endothelial repair mechanism possible and does this enhancement lead to improvement or attenuation of CSVD?

Suggestions for future research to answer these questions are included in this last chapter.

Samenvatting



Samenvatting

Cerebral Small Vessel Disease (Nederlands: cerebrale kleine vaten ziekte; CSVD) tast de kleine perforerende arteriën in de hersenen aan. Zo veroorzaakt CSVD lacunaire herseninfarcten en witte stof afwijkingen (WSA). CSVD heeft een hoge morbiditeit, aangezien CSVD gerelateerd is aan (herhaaldelijke) herseninfarcten en cognitieve stoornissen en achteruitgang. Patiënten met uitgebreide CSVD (lacunair herseninfarct met WSA) hebben een slechtere prognose (met betrekking tot morbiditeit, recidief herseninfarct en mortaliteit), ook op de lange termijn, dan patiënten zonder uitgebreide CSVD. Echter, de oorzaak van CSVD blijft onduidelijk, en daarom zijn er ook nog steeds geen effectieve therapieën of preventieve maatregelen bekend. Een van de hypothesen betreffende de oorzaak is dat een dysfunctie van de bloed-hersen-barrière uiteindelijk leidt tot CSVD. Aangezien de bloed-hersen-barrière bestaat uit een complex samenspel tussen endotheelcellen en het omgevende weefsel, kan dysfunctie van één van deze componenten leiden tot een dysfunctie van de gehele bloed-hersen-barrière. Daarom is hoofdhypothese van het onderzoek in dit proefschrift dat endotheliale dysfunctie verband houdt met CSVD (**Hoofdstuk 1**). Mogelijke oorzaken van deze dysfunctie zijn inflammatie (activatie van het immuunsysteem) en een tekortschietend herstelmechanisme van het endotheel.

Alvorens deze hypothese te onderzoeken, trachtten we eerst het radiologisch beeld van CVSD te verbreden door te onderzoeken of er een verband is tussen bekende manifestaties van CSVD, zoals WSA en lacunaire in herseninfarcten en verwijde Virchow Robinse ruimtes. In **Hoofdstuk 2** vonden wij, bij 165 patiënten met een eerste lacunair herseninfarct, dat hogere aantallen verwijde Virchow Robinse ruimtes op het niveau van de basale kernen geassocieerd waren met ernstigere WSA en meer lacunaire herseninfarcten. Hieruit kan afgeleid worden dat verwijde Virchow Robinse ruimtes, WSA en lacunaire herseninfarcten een vergelijkbare onderliggende oorzaak, c.q. vaatpathologie, hebben, namelijk CSVD.

Om te onderzoeken of een verband is tussen CSVD, activatie van endotheelcellen en een geactiveerde immuunrespons verzamelden wij twee patiëntengroepen, namelijk patiënten met een lacunair herseninfarct en patiënten met essentiële hypertensie. In het eerste deel, beschreven in **Hoofdstuk 3**, bestudeerden wij 158 patiënten met een eerste lacunair herseninfarct, 158 patiënten met essentiële hypertensie en 43 controles. Wij onderzochten in deze studie antistoffen tegen verschillende vormen van geoxideerd LDL. Deze antistoffen zijn o.a. ook betrokken bij atherosclerose, een andere vaatziekte. In onze studie vonden wij dat patiënten met CSVD (gedefinieerd als de aanwezigheid van WSA en/of (oude) lacunaire infarcten op de MRI-scan) hogere spiegels hadden van (waarschijnlijk nadelige) IgG-antistoffen tegen hypochloriet geoxideerd LDL, terwijl deze groep lagere spiegels had van (waarschijnlijk voordelige) IgM-antistoffen tegen MDA-gemodificeerd LDL in vergelijking met patiënten zonder

CSVD. Verder vonden wij dat hogere spiegels van IgG-antistoffen tegen hypochloriet geoxideerd LDL onafhankelijk geassocieerd waren aan onze nieuw gevonden marker van CSVD: verwijde Virchow Robinse ruimtes op het niveau van de basale kernen. In het tweede deel, maten wij merkers van activatie en disfunctie van van endotheelcellen en van activatie van monocytten. In **Hoofdstuk 4**, bestudeerden wij 163 patiënten met een lacunair herseninfarct en 183 patiënten met essentiële hypertensie. Wij toonden aan dat spiegels van neopterine, een merker voor activatie van monocytten door T lymfocytten, en merkers van endotheelactivatie (sICAM en sVCAM) hoger waren bij patiënten met WSA en/of (oude) lacunaire infarcten. We concluderen uit deze twee studies dat een immuunrespons, waarbij er enerzijds activatie en disfunctie van endotheel is, en anderzijds monocyttenactivatie en productie van antistoffen is, een rol zou kunnen spelen bij CSVD.

Het effect van activatie van het immuunsysteem en het endotheel op de pathogenese van CSVD zou tegengegaan kunnen worden door beschermingsmechanismen. Endotheliale progenitor cellen (EPC) zouden een beschermend effect kunnen hebben. EPC zijn onrijpe endotheelcellen die in het bloed circuleren. EPC zouden beschadigd endotheel kunnen repareren en zouden zo ook endotheelactivatie en –disfunctie, de veronderstelde oorzaak van CSVD, kunnen afremmen. Aangezien het EPC-onderzoek bij cerebrovasculaire ziekten en herseninfarcten bijzonder beperkt is, gaven wij in **Hoofdstuk 5** een overzicht van de mogelijkheden, onmogelijkheden en valkuilen van EPC-onderzoek bij herseninfarcten en cerebrovasculaire aandoeningen. Hiermee probeerden wij om vasculair neurologen te bewegen om in het EPC-onderzoek te stappen, aangezien EPC binnen de vasculaire neurologie de pathofysiologische concepten zou kunnen veranderen en de behandelingen zou kunnen verbeteren.

In **Hoofdstuk 6** was ons doel om een verband aan te tonen tussen EPC aantal en vitaliteit en CSVD (opnieuw gedefinieerd als WSA en (oude) lacunaire herseninfarcten) bij patiënten met een eerste lacunair herseninfarct. In deze studie zochten wij ook naar mogelijke regulerende factoren van de EPC functie in het serum van patiënten. Zo bestudeerden wij het effect van verschillende haptoglobine fenotypes op EPC. Haptoglobine is een acute fase eiwit met verschillende fenotypes, waarvan het 1-1 fenotype geassocieerd is met WSA en lacunaire infarcten. Mogelijk is deze relatie het gevolg van het effect van haptoglobine 1-1 op EPC functie. Wij bestudeerden 42 patiënten met een eerste lacunair herseninfarct en 18 controles zonder CSVD. Wij vonden dat de EPC vitaliteit slechter was bij patiënten met een lacunair herseninfarct, in het bijzonder bij degenen met tevens WSA en (meerdere) oude lacunaire infarcten. Wij toonden tevens aan dat serum van patiënten, in vergelijking met serum van gezonde controles, de vitaliteit van EPC negatief beïnvloedt, met name serum van patiënten met tevens WSA en/of lacunaire infarcten. Verder hadden patiënten met haptoglobine 1-1 een lagere EPC vitaliteit en toevoegen van haptoglobine 1-1 bij EPC kweken leidde tot een lagere vitaliteit dan toevoegen van andere haptoglobine

fenotypes. In **Hoofdstuk 7** was ons doel om een verband aan te tonen tussen EPC aantal en vitaliteit en een andere mogelijk regulerende factor van de EPC functie: de angiogene T lymfocyt. Angiogene T cellen stimuleren de vorming van nieuwe bloedvaten en endotheelherstel door een direct effect op EPC. Wij onderzochten 32 patiënten met essentiële hypertensie met CSVD (WSA, lacunaire infarcten en/of microbleeds) en 29 hypertensieven zonder CSVD. Wij vonden dat zowel EPC aantallen als angiogene T cel aantallen lager waren bij patiënten met CSVD in vergelijking met de groep patiënten zonder CSVD. Het verband tussen angiogene T cellen en CSVD bleef significant na statistische correctie voor andere mogelijk beïnvloedende variabelen (zoals bloeddruk en andere vaatziekten). Wij concluderen uit deze twee studies dat patiënten met CSVD wel eens een defect endotheelherstelmechanisme zouden kunnen hebben. Hierbij zouden, in ieder geval ten dele, het haptoglobine fenotype als lagere angiogene T cel aantallen een rol kunnen spelen.

In **Hoofdstuk 8** worden de betekenis en toepasbaarheid van de belangrijkste bevindingen uit dit proefschrift bediscussieerd. Alle studies suggereren dat bij CSVD het (cerebrale) endotheel betrokken is in een proces met activatie van het immuunsysteem en een tekortschietend endotheel regeneratievermogen. Dit proces leidt mogelijk tot een dysfunctie van de bloed-hersen-barrière en tot CSVD. Deze conclusie laat echter enkele vragen onbeantwoord, zoals:

- 1) Zijn de waardes van de merkers van endotheelactivatie en inflammatie, verwijde Virchow Robinse ruimtes en EPC parameters ook voorspellend voor CSVD progressie radiologisch en klinisch (met name cognitief functioneren) over verloop van tijd?
- 2) Zijn de merkers een adequate afspiegeling van wat zich in het brein afspeelt?
- 3) Is het mogelijk om de herstelmechanismen (door EPC) te verbeteren en zou een dergelijke verbetering leiden tot een verbetering of remming van CSVD?

Suggesties voor verder onderzoek om deze vragen te beantwoorden worden in dit laatste hoofdstuk gegeven.

