

# Vascular endothelial function and genetic epidemiology in lacunar stroke subtypes

## Citation for published version (APA):

Knottnerus, I. L. H. (2012). *Vascular endothelial function and genetic epidemiology in lacunar stroke subtypes*. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20120302ik>

## Document status and date:

Published: 01/01/2012

## DOI:

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

## 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.

## Samenvatting



## Samenvatting

Ongeveer een kwart van alle ischemische beroertes wordt veroorzaakt door een zogenaamd lacunair herseninfarct. Dit type herseninfarct is het gevolg van een afsluiting van een perforerend bloedvat, is meestal klein (<15-20 mm) en is gelokaliseerd in de basale kernen, diepe cerebrale witte stof of hersenstam. Klinisch kenmerkt een lacunair herseninfarct zich door één van de klassieke lacunaire syndromen zoals éézijdige motorische uitval, éézijdige sensibele uitval of een combinatie van beide. Hierbij zijn tenminste 2 van de 3 lichaamsdelen (gelaat, arm en/of been) betrokken en er mag geen sprake zijn van een bewustzijnsstoornis of een hogere corticale functiestoornis.

Ongeveer een halve eeuw geleden verrichtte Fisher pathologisch-anatomisch onderzoek op hersenen van patiënten met een lacunair herseninfarct. Hij onderscheidde een tweetal aandoeningen van de kleine hersenvaten die ten grondslag kunnen liggen aan deze lacunaire herseninfarcten. Enerzijds beschreef hij als oorzaak een kleine atherosclerotische plaque gelokaliseerd aan de origo van één van de perforerende vaten (micro-atheromatose). Deze variant veroorzaakt veelal het geïsoleerde lacunaire infarct. Anderzijds definieerde hij het type dat wordt veroorzaakt door een diffuse aandoening van de kleine hersenvaten (lipohyalinosis). Dit type wordt gekenmerkt door bijkomende stille afwijkingen, namelijk asymptomatische lacunaire infarcten. Onderzoek bij klinisch en radiologisch getypeerde patiënten met een lacunair herseninfarct, toonde aan dat deze asymptomatische lacunaire infarcten gerelateerd zijn aan een tweetal afwijkingen; ischemische witte stofafwijkingen en micro- of puntbloedingen (<5-10mm). Deze puntbloedingen worden gezien op gradient echo Magnetische Resonantie-opnamen en bestaan uit hemosiderine-deposities.

In het voorgaande decennium ontwikkelden Boiten en Lodder de hypothese dat beide typen gedurende het leven van elkaar onderscheiden kunnen worden op basis van verschillen bij beeldvormend onderzoek. Door het aantonen van klinische verschillen, onder andere in lange termijnprognose tussen de beide typen, werd deze hypothese door anderen bevestigd.

Op basis van gegevens uit pathologie- en beeldvormingstudies vormden Wardlaw en anderen de hypothese dat endotheliale activatie leidt tot het ontstaan van de cerebrale kleine hersenvaten aandoening welke gepaard gaat met bijkomende stille afwijkingen. Endotheliale activatie, en uiteindelijk disfunctie, leidt tot een toegenomen doorlaatbaarheid van de bloed-hersen-barrière. Hierdoor ontstaat er lekkage van plasma-eiwitten naar de vaatwand en de perivasculaire ruimte. Dit proces leidt uiteindelijk tot het ontstaan van lacunaire infarcten, witte stofafwijkingen en puntbloedingen.

Het doel van de studies in dit proefschrift was de verdere evaluatie van de pathologische processen die ten grondslag liggen aan de verschillende typen aandoeningen van de cerebrale kleine vaten leidend tot het lacunaire herseninfarct. Het proefschrift focust op een tweetal thema's. Ten eerste onderzochten we de

aanwezigheid van endotheliale activatie bij patiënten met een lacunair herseninfarct. We bepaalden hiervoor bloedspiegels van enkele hemostase gerelateerde endotheliale markers en keken naar verschillen tussen beide typen (**hoofdstuk 4 en 5**). Ten tweede bekeken we genetisch-epidemiologisch de rol van genetische factoren ten aanzien van het lacunaire herseninfarct en zijn subtypen. Gezien de verschillende pathofysiologische mechanismen in de subtypen, verwachtten wij verschillen in de bijdrage van genetische factoren. Hiervoor onderzochten we de clustering van beroertes in eerstegraads familieleden van patiënten met lacunaire herseninfarcten (**hoofdstuk 6 en 7**).

In **hoofdstuk 1**, de algemene introductie, worden de bovenbeschreven achtergronden besproken en wordt tevens een overzicht van de studies behorende bij dit proefschrift gegeven.

In **hoofdstuk 2** beschrijven wij een tweetal patiënten met een lacunair herseninfarct en bijkomende asymptomatische lacunaire infarcten, witte stofafwijkingen en puntbloedingen. Beide patiënten ontwikkelden een bloeding op de plaats van een eerder gedocumenteerde puntbloeding. Wij concluderen dat puntbloedingen niet alleen een verhoogd risico geven op een intracerebrale bloeding, maar dat zij ook de bron van de bloeding kunnen zijn. Derhalve zijn deze puntbloedingen op Magnetische Resonantie Imaging (MRI) mogelijk een sterke voorspeller van het bloedingsrisico bij de individuele patiënt. Een grote prospectieve studie om dit risico te evalueren lijkt relevant omdat daardoor de voordelen en de risico's van anti-thrombotische therapie bij deze patiënten beter afgewogen kunnen worden.

**Hoofdstuk 3** bevat een systematische review van de literatuur naar bewijs voor endotheliale activatie en dysfunctie bij patiënten met een lacunair herseninfarct. Onze zoekstrategie (Appendix 1) leverde 29 artikelen op die bruikbaar waren voor verdere evaluatie. De verdere evaluatie vond plaats door middel van een checklist met items betreffende methodologische en informatieve kwaliteit (Appendix 2). De artikelen werden gesorteerd naar de verschillende fysiologische functies van het endotheel en een categorie betreffende toxische stoffen voor het endotheel.

Publicaties over de regulatie van de vaattonus door het endotheel toonden een gestoorde endotheelfunctie op verschillende meetmomenten na de beroerte. Spiegels van hemostase gerelateerde markers van het endotheel waren verhoogd in de acute en subacute fase. Daarentegen bleken spiegels van adhesiemoleculen alleen verhoogd gedurende de acute fase. Tenslotte was homocysteïne, hetgeen in hoge concentraties toxisch voor het endotheel is, verhoogd bij patiënten met een lacunair herseninfarct.

Wij concluderen dat, op basis van de huidige literatuur, endotheeldysfunctie waarschijnlijk een rol speelt in de pathogenese van het lacunaire herseninfarct. Deze endotheeldysfunctie speelt met name een rol bij patiënten met bijkomende stille afwijkingen. Overigens lijkt het nog te vroeg voor robuuste conclusies. Ten eerste

wordt beroerte in veel studies als een homogene ziekte beschreven, terwijl andere studies verschillende classificatiesystemen voor beroertes gebruiken. Het gevolg is dat een patiënt in verschillende categorieën terecht kan komen. Wij adviseren dat toekomstige studies het begrip lacunair herseninfarct duidelijk definiëren waarbij klinische criteria voor lacunaire syndromen gecombineerd worden met MRI-bevindingen zonder dat er risicofactoren in de definitie meegenomen worden. Ten tweede bepaalden veel studies alleen plasmaconcentraties in de acute fase, waardoor de invloed van de acute fase respons, met andere woorden de acute ontstekingsreactie, niet uitgesloten is. Met deze gegevens in het achterhoofd ontwierpen wij onze studies betreffende hemostase gerelateerde endotheliale markers bij patiënten met een eerste lacunair herseninfarct.

### Circulerende hemostase gerelateerde markers van endotheel functie

Het vasculaire endotheel speelt een belangrijke rol in de hemostase. Dit blijkt onder andere uit de aanwezigheid van een aantal hemostase- en stollingsgerelateerde eiwitten in het bloed, die afkomstig zijn van het endotheel. In **hoofdstuk 4** bepaalden we spiegels van dergelijke eiwitten (tissue plasminogeen activator [tPA], plasminogeen activator inhibitor type 1 [PAI-1], tPA-PAI-1-complex, Von Willebrand factor [vWF], tissue factor, trombomoduline en stollingsfactor VIII) in patiënten met een eerste lacunair herseninfarct. We verwachtten de hoogste spiegels bij patiënten met bijkomende witte stofafwijkingen en/of asymptomatische lacunaire infarcten.

tPA-activiteit bleek verhoogd bij patiënten met bijkomende witte stofafwijkingen (0.79 IU/mL versus 0.44 IU/mL voor het geïsoleerde lacunaire infarct,  $P=0.02$ ) en spiegels van PAI-1 bleken het laagst in deze groep (27.5 ng/mL versus 44.0 ng/mL voor het geïsoleerde lacunaire infarct,  $P=0.02$ ). Deze laatste associatie bleef overeind in de multivariate analyse (OR 0.99; 95%CI 0.98-1.00 per ng/mL verandering van PAI-1,  $P=0.04$ ). De hoogste spiegels van vWF-antigeen werden gevonden bij patiënten met bijkomende asymptomatische lacunaire infarcten, gevolgd door patiënten met witte stofafwijkingen en het laagst bij diegenen met het geïsoleerde lacunaire infarct, echter deze verschillen waren niet significant. De concentraties van de andere eiwitten verschilden niet tussen de subtypen van het lacunaire herseninfarct.

Wij concluderen dat de hogere spiegels van tPA bij patiënten met bijkomende witte stofafwijkingen een argument vormen voor endotheliale activatie in het subtype van het lacunaire herseninfarct veroorzaakt door de diffuse vasculopathie. Ten tweede concluderen wij dat de combinatie van lage spiegels van PAI-1 en hoge spiegels van tPA in patiënten met bijkomende witte stofafwijkingen, suggereren dat verschillen in activiteit van het fibrinolytische systeem bijdragen aan de ontwikkeling van witte stofafwijkingen. Tenslotte onderkennen wij dat spiegels van diverse endotheliale markers gelijk zijn tussen de subtypen van het lacunaire herseninfarct. Dit zou verklaard kunnen worden door het gebruik van medicatie. Zo kunnen zogenaamde statines (cholesterolverlagers) de bloedspiegel van tissue factor verlagen. Daarnaast

wordt de aanwezigheid van enkele endotheliale markers, bijvoorbeeld trombo-moduline, in de cerebrale kleine bloedvaten in een aantal studies betwijfeld.

In **hoofdstuk 5** hebben we spiegels van de verschillende vormen van tissue factor pathway inhibitor (TFPI) gemeten en verwachtten wij de hoogste spiegels bij patiënten met bijkomende stille afwijkingen. TFPI bevindt zich op verschillende plaatsen in het menselijk lichaam. TFPI wordt geproduceerd en opgeslagen in de vasculaire endotheelcel. Bij uitscheiding wordt een gedeelte gebonden aan celwand proteoglycanen. In plasma is het grootste gedeelte van TFPI gebonden aan lipoproteïnen, voornamelijk LDL, en bestaat uit verschillende incomplete (truncated) vormen. Slechts 10% van het plasma TFPI bestaat uit de vrije volledige (full-length) vorm.

Antigeen spiegels van het totale TFPI (vrij en lipoproteïne gebonden vormen) en het vrije volledige (full-length) TFPI werden bepaald door middel van ELISA in 149 patiënten en 42 controles. Na toediening van heparine komt TFPI vrij uit het endotheel. Spiegels van door heparine vrijgemaakt TFPI werden gemeten in een subgroep van 17 patiënten en 15 controles. Op basis van MRI-kenmerken werden patiënten met een lacunair herseninfarct geïsoleerd als geïsoleerd lacunair infarct of met tevens bijkomende stille afwijkingen.

Alhoewel spiegels van het totale TFPI lager bleken bij patiënten (mediaan 69.5 [IQR 60.5-83.9] ng/mL) dan controles (80.3 [68.1-91.9] ng/mL,  $P < 0.01$ ), en spiegels van totale TFPI hoger waren in patiënten met bijkomende stille schade (71.0 [62.8-86.0] ng/mL) dan diegenen met het geïsoleerde lacunaire infarct (61.3 [54.1-77.7] ng/mL,  $P < 0.01$ ), verdwenen beide associaties na correctie voor leeftijd en de hoogte van cholesterolspiegel. Opnieuw zou het gebruik van medicatie een verklaring kunnen zijn voor het ontbreken van een verschil in spiegels van totaal TFPI. Het overgrote deel van plasma TFPI bestaat uit enkele incomplete vormen gebonden aan LDL-cholesterol. Omdat statines LDL-cholesterol in het bloed verlagen, dalen ook de spiegels van TFPI. Spiegels van het vrije volledige (full-length) TFPI verschilden niet tussen patiënten en controles en tussen subtypen van het lacunaire herseninfarct.

Tenslotte, aangezien het totale TFPI en het vrije volledige (full-length) TFPI slechts een klein gedeelte vormen van de totale hoeveelheid TFPI aanwezig in het lichaam, bepaalden wij de grotere (endotheel-geassocieerde) TFPI-voorraad door intraveneuze toediening van heparine. Het toedienen van heparine leidde tot een 9-voudige stijging in de concentratie van het vrije volledige (full-length) TFPI en de spiegels bleken hoger bij patiënten dan bij controles ( $1297 \pm 246$  %d.N. [percentage van normaal] versus  $1039 \pm 302$  %d.N.,  $P = 0.01$ ). Het TFPI dat vrijkomt na toediening van heparine komt van de celwandproteoglycanen en vanuit de endotheelcel zelf. Het feit dat er meer TFPI vrijkomt na toediening van heparine bij patiënten, dan bij controles, zou een argument kunnen zijn voor endotheelactivatie bij patiënten met een lacunair herseninfarct.

## Genetische epidemiologische studies en het lacunaire herseninfarct

Gegevens uit case-control studies laten zien dat een positieve familie-anamnese voor een beroerte een onafhankelijke risicofactor is voor het optreden van een lacunair herseninfarct. Verder tonen een beperkt aantal tweelingstudies, dat monozygote tweelingen vaker beide een beroerte doormaakten dan dizygote tweelingen. Dit past bij een rol voor genetische factoren in het ontstaan van een beroerte.

In **hoofdstuk 6** onderzochten wij of clustering van beroertes in families van patiënten met een lacunair herseninfarct verschilt tussen de verschillende fenotypen van het lacunaire herseninfarct. Met behulp van de gestandaardiseerde vragenlijst, aangevuld met een interview tijdens polikliniekbezoek, onderzochten wij de familie-anamnese voor een beroerte bij 157 patiënten met een lacunair herseninfarct, die gefenotypeerd werden door middel van MRI. 52% van de patiënten rapporteerde een positieve familie-anamnese voor een beroerte bij één of meerdere eerstegraad familieleden. Jonge (<65 jaar) indexpatiënten met bijkomende asymptomatische lacunaire infarcten bleken vaker een aangedane ouder te hebben dan jonge indexpatiënten zonder asymptomatische lacunaire infarcten (59% versus 20%,  $P < 0.01$ ). In de multivariate analyse vonden wij de sterkste verbanden tussen bijkomende asymptomatische lacunaire infarcten en een positieve familie-anamnese bij ouders (OR 6.46 [95%CI 1.96-21.33]), moeders (OR 4.00 [95%CI 1.18-13.56]) en vaders (OR 5.40 [95%CI 1.14-25.61]). Wij concluderen dat de clustering van beroertes in families van patiënten met bijkomende asymptomatische lacunaire infarcten een argument is voor een genetische component. Het feit dat de familiäre aggregatie zich voordoet in dit subtype, wijst op een rol voor genetische factoren in de onderliggende pathofysiologie van endotheelactivatie.

In deze studie vonden we geen verband tussen positieve familie-anamnese en witte stofafwijkingen. Mogelijk hebben we een verband gemist omdat we de mate van witte stof afwijkingen beoordeelden met een visuele scoringschaal, te weten de Fazekas-schaal. Deze schaal correleert op zich goed met kwantitatieve scoringsmethoden, hij bezit echter wel een zogenaamd plafond-fenomeen. Dit laatste betekent dat de variabiliteit in volumes van witte stofafwijkingen groot is bij patiënten met eenzelfde hoge score op de visuele schalen.

In **hoofdstuk 7** berekenden we het genetisch relatief risico voor beroertes bij patiënten met een lacunair herseninfarct. Daarvoor vergeleken we de prevalentie van beroertes bij familieleden van patiënten met een lacunair herseninfarct met de prevalentie van beroertes in een Nederlands cohort van oudere vrijwilligers.

144 van de 1066 eerstegraads familieleden (13.5%) maakten een beroerte door. Het genetisch relatief risico was daarmee 2.94 (95%CI 2.45-3.53) voor alle eerstegraads familieleden, 4.52 (95%CI 3.61-5.65) voor ouders van patiënten en 2.10 (95%CI 1.63-2.69) voor broers en zussen van patiënten. De getallen zijn hoger dan het gemiddelde relatieve risico voor een multifactoriële aandoening en voor beroerte in het algemeen. De clustering van beroertes in families van patiënten met een lacunair herseninfarct is



op zich niet nieuw. Echter, de meeste studies definieerden een positieve familie-anamnese als minimaal één aangedaan eerstegraads familielid. De toegevoegde waarde van het genetisch relatief risico is gelegen in het feit dat het aantal aangedane en het aantal bekende familieleden wordt meegenomen in de berekening, waardoor er iets gezegd kan worden over de mate van clustering van beroertes.

In **hoofdstuk 8**, de algemene discussie, bespreken wij de implicaties van de bevindingen in dit proefschrift voor toekomstig onderzoek.

Het eerste thema betreft het ontbreken van verschillen in plasmaspiegels van enkele endotheliale markers tussen patiënten en controles en tussen de subtypen van het lacunaire herseninfarct. De aanwezigheid van de bepaalde markers in de cerebrale kleine vaten wordt in enkele pathologisch-anatomische studies betwijfeld. De vraag is of dit relevant is aangezien nieuwe informatie laat zien dat de ziekte niet beperkt is tot de kleine vaten van de hersenen, maar dat er sprake is van een systeemaandoening. Functionele testen van het vasculaire endotheel in verschillende vaatgebieden in combinatie met meting van endotheliale plasma markers zou meer duidelijkheid kunnen bieden. Daarnaast heeft het gebruik van statines door onze patiënten met een lacunair herseninfarct mogelijke verschillen in spiegels van endotheliale markers waarschijnlijk gereduceerd. Een studie waarbij endotheelfunctie wordt vergeleken tussen een laag en een hoog doseringsregime van statines zou nieuwe inzichten in pathofysiologie kunnen genereren, ook lijken therapeutische mogelijkheden binnen handbereik.

Het tweede thema omvat de tekortkomingen van de voorgaande moleculair genetische studies, zoals de beperkte toepassingsmogelijkheden van zogenaamde linkage studies en conflicterende resultaten van kandidaat-genen studies. “Genome wide association studies” lijken op het eerste gezicht een veelbelovende methode omdat er geen hypothese betreffende interessante genetische loci nodig is, waardoor nieuwe risico-allelen voor herseninfarcten ontdekt kunnen worden. Echter de grote patiënten aantallen, kleine effecten van veel voorkomende varianten en het feit dat vaak alleen interessante regio's gevonden worden, leidt tot de conclusie dat deze methode minder geschikt is bij het lacunaire herseninfarct. Zeer recent is het zoeken naar zeldzame varianten in veel voorkomende ziekten als methode ontwikkeld. Hierbij worden interessante regio's van het genoom volledig in kaart gebracht. Deze interessante regio's worden geselecteerd op grond van pathofysiologische overwegingen, zoals genen gerelateerd aan endotheel functie. Eén van de voorwaarden voor dit type onderzoek, is een goed gedefinieerd fenotype, zoals onze patiënten met een lacunair herseninfarct. Mogelijk is dit een goede methode voor verder onderzoek naar genetische factoren en daarmee de verdere ontrafeling van de pathofysiologie van het lacunaire herseninfarct.