



# ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

## ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΙΩΝ ΟΡΓΑΝΩΝ

ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Γεώργιος Χατζηγεωργίου



### Διδακτορική Διατριβή

**«Γενετική μελέτη σε γονίδια που σχετίζονται με την εμφάνιση και την έκβαση ασθενών με ενδοεγκεφαλική αιμορραγία»**

Υπό

**Τηλέμαχου Ζαφειρίδη**

Παθολόγου - Εντατικολόγου

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των  
απαιτήσεων για την απόκτηση του  
Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2018



# ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

## ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΙΩΝ ΟΡΓΑΝΩΝ

ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

Διευθυντής: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Γεώργιος Χατζηγεωργίου



### Διδακτορική Διατριβή

**«Γενετική μελέτη σε γονίδια που σχετίζονται με την εμφάνιση και την έκβαση ασθενών με ενδοεγκεφαλική αιμορραγία»**

Υπό

**Τηλέμαχου Ζαφειρίδη**

Παθολόγου - Εντατικολόγου

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των  
απαιτήσεων για την απόκτηση του  
Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2018

© 2018 ΖΑΦΕΙΡΙΔΗΣ ΤΗΛΕΜΑΧΟΣ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

## Σύντομο Βιογραφικό Σημείωμα

### Προσωπικά Στοιχεία

---

Όνοματεπώνυμο	Ζαφειρίδης Τηλέμαχος
Ημερομηνία γέννησης	24-Απρ-1974
Τόπος γέννησης	Αθήνα
Διεύθυνση κατοικίας	Ερυθρού Σταυρού 30, 41221, Λάρισα
Τηλέφωνα	2411108737 6974647325
Ηλεκτρονική διεύθυνση	Tilemachos@hotmail.com

### Στοιχεία Πτυχίου

---

1999	Αποφοίτηση από την Ιατρική σχολή του Πετς, Ουγγαρίας
2000	Αναγνώριση του πτυχίου ιατρικής από το Διαπανεπιστημιακό Κέντρο Αναγνωρίσεως Τίτλων Σπουδών της Αλλοδαπής (ΔΙ.Κ.Α.Τ.Σ.Α.), με βαθμό: λίαν καλώς (6,87/10)

### Επαγγελματική Εμπειρία

---

Νοέμ. 2000 – Μάιος 2002	Εκπλήρωση στρατιωτικής θητείας ως οπλίτης ιατρός – χωρίς ειδικότητα
Αυγ. – Νοέμ. 2002	Τρίμηνη εκπαίδευση υπηρεσίας υπαίθρου στο Γ.Ν.Ν. Καρπενησίου
Νοέμ. 2002 – Νοέμ. 2003	Υπηρεσία υπαίθρου στο Π.Ι. Σιδήρων, Κ.Υ. Καρπενησίου
Μαρ. 2005 – Σεπ. 2009	Ειδικευόμενος – εσωτερικός βοηθός στην Β' Παθολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Γ.Ν.Α. Ιπποκράτειο <b>(Απόκτηση τίτλου ειδικότητας παθολογίας Ιαν. 2010)</b>
Αυγ. 2010 – Φεβ. 2013	Έμμισθη θέση ειδικευμένου ιατρού για εξειδίκευση στην Εντατικολογία, στη ΜΕΘ του Γ.Ν.Ν. Λάρισας <b>(Απόκτηση πιστοποιητικού εξειδίκευσης στην εντατικολογία Δεκ. 2012)</b>
<b>Ιουν. 2013 – Σήμερα</b>	Έμμισθη θέση, επιμ. ΕΣΥ, στη ΜΕΘ του Γ.Ν. Λάρισας

### Επιστημονικό Έργο

---

4 δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά. Συγγραφή κεφαλαίων σε δύο βιβλία Εντατικής Θεραπείας. Ανακοινώσεις σε διεθνή και τοπικά συνέδρια.

### Ξένες Γλώσσες

---

Αγγλικά, Γερμανικά, Ουγγρικά

**ΑΡΘΡΑ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ.**

Dardiotis E, Siokas V, **Zafeiridis T**, Paterakis K, Tsivgoulis G, Dardioti M, Grigoriadis S, Simeonidou C, Deretzi G, Zintzaras E, Jagiella J, Hadjigeorgiou GM. Integrins AV and B8 Gene Polymorphisms and Risk for Intracerebral Hemorrhage in Greek and Polish Populations. *Neuromolecular Med.* 2017 Mar;19(1):69-80

**«Γενετική μελέτη σε γονίδια που σχετίζονται με την εμφάνιση και την έκβαση ασθενών με ενδοεγκεφαλική αιμορραγία»**

**Τηλέμαχος Ζαφειρίδης**

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2018

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

1. **Ε. Δαρδιώτης**, Επικ. Καθηγητής Νευρολογίας, ΤΙ ΠΘ (**Επιβλέπων**)
2. **Γ. Χατζηγεωργίου**, Καθηγητής Νευρολογίας, ΤΙ ΠΘ
3. **Α. Παπαδημητρίου**, Ομότιμος Καθηγητής Νευρολογίας, ΤΙ ΠΘ

**Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής**  
4<sup>η</sup>ΣΕΣ/15-2-2017

- 1. Ε. Δαρδιώτης**, Επικ. Καθηγητής Νευρολογίας, Τμήμ. Ιατρικής Π.Θ **(επιβλέπων)**
- 2. Γ. Χατζηγεωργίου**, Καθηγητής Νευρολογίας, Τμήμ. Ιατρικής Π.Θ
- 3. Α. Παπαδημητρίου**, Ομ. Καθηγητής Νευρολογίας, Τμημ. Ιατρικής Π.Θ
- 4. Ι. Στεφανίδης**, Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας, Τμήμ. Ιατρικής Π.Θ
- 5. Η. Ζιντζαράς**, Καθηγητής Βιομαθηματικών-Βιομετρίας, Τμήμ. Ιατρικής Π.Θ
- 6. Ι. Χατζηϊωάννου**, Επικ.Καθηγητής ΩΡΛ Τμήμ. Ιατρικής Π.Θ
- 7. Κ. Πατεράκης**,Επικ.Καθηγητής Νευροχειρουργικής Τμήμ. Ιατρικής Π.Θ

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση και ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής θα ήταν αδύνατη χωρίς τη συνεχή βοήθεια και τη διαρκή υποστήριξη πολλών ανθρώπων στους οποίους θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου.

Αρχικά, θέλω να εκφράσω τις εγκάρδιες ευχαριστίες μου στον Επιβλέπων, Επίκουρο Καθηγητή Νευρολογίας, κ. Δαρδιώτη Ευθύμιο για την υπόδειξη του θέματος, την καθοδήγηση και τον πολύτιμο προσωπικό χρόνο που μου προσέφερε ώστε η διατριβή αυτή να ολοκληρωθεί. Ευχαριστώ τον Καθηγητή Νευρολογίας κ. Χατζηγεωργίου Γεώργιο για την πολυδιάστατη συμβολή του στη πραγματοποίηση της διατριβής. Ευχαριστώ τον Ομ. Καθηγητή Νευρολογίας κ Παπαδημητρίου Α. για την αρχική προτροπή και καθοδήγηση. Ευχαριστώ τον συνάδελφο Σιώκα Β. για την υποστήριξή του. Οφείλω συνολικά πολλά στη νευρολογική κλινική του ΠΓΝΛ. Θέλω να εκφράσω την βαθιά ευγνωμοσύνη μου στον Διευθυντή της Μονάδας Εντατικής Θεραπείας του Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, κ. Κομό Απόστολο, που χωρίς την προτροπή του δεν θα αναλάμβανα ποτέ αυτό το εγχείρημα. Πρόκειται για ένα Διευθυντή που στοχεύει στη βελτίωση της ποιότητας και την πρόοδο των συνεργατών του.



## Περίληψη

Οι αυτόματες ενδοεγκεφαλικές αιμορραγίες αντιπροσωπεύουν το 10-15% των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων, έχουν ποικίλη αιτιολογία και προκαλούν δυσανάλογα μεγαλύτερη θνητότητα και νοσηρότητα από τα ισχαιμικά αγγειακά εγκεφαλικά. Ένας περιορισμένος αριθμός γενετικών παραλλαγών έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση της ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας. Έχει βρεθεί ότι πειραματοζωα που δεν εκφράζουν την ιντεγκρίνη AV ή/και την B8 παρουσιάζουν ενδοεγκεφαλική αιμορραγία. Η παρούσα μελέτη συσχέτισης υποψήφιων γονιδίων σχεδιάστηκε με σκοπό την διερεύνηση της πιθανής επίδρασης των πολυμορφισμών στην περιοχή των γονιδίων των ιντεγκρινών AV (ITGAV) και B8 (ITGB8) στον κίνδυνο εμφάνισης ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας σε ενήλικες ασθενείς. 1015 ασθενείς (250 Έλληνες και 193 Πολωνοί με πρωτοπαθή ενδοεγκεφαλική αιμορραγία καθώς και 250 Έλληνες και 322 Πολωνοί στην ομάδα ελέγχου) συμμετείχαν στη μελέτη. Με τη χρήση λογιστικής παλινδρόμησης, 11 σημειακοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί σήμανσης (tagSNPs) για το ITGAV και 11 για το ITGB8 γονίδιο ελέγχθηκαν για πιθανή συσχέτιση με τον κίνδυνο για ΕΕΑ, με τον κίνδυνο για λοβώδη ΕΕΑ και μη λοβώδη ΕΕΑ αφού διορθώθηκε για την ηλικία, το φύλο, ιστορικό υπέρτασης και χώρα προέλευσης. Η επίδραση των tagSNPs στη ηλικία εμφάνισης ΕΕΑ ελέγχθηκε με ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης. Η συσχέτισή τους με την έκβαση των ΕΕΑ διερευνήθηκε με τον υπολογισμό γενικευμένων λόγων πιθανοτήτων. Το rs7565633 tag SNP του γονιδίου ITGAV, βρέθηκε ότι σχετίζεται ανεξάρτητα με τον κίνδυνο εμφάνισης λοβώδους ΕΕΑ σε ένα συνεπικρατούν μοντέλο κληρονόμησης [OR 0.56; 95 % CI 0.36–0.86,  $p = 0.0013$ ]. Επιπλέον, ετεροζυγώτες για το rs10251386 και το rs10239099 του γονιδίου ITGB8 είχαν σημαντικά μικρότερη ηλικία έναρξης ΕΕΑ συγκρινόμενοι με τους συνηθισμένους γονότυπους [συντελεστής παλινδρόμησης (b) -3.884 (95 % CI -6.519, -1.249),  $p = 0.0039$  και  $b = -4.502$  (95 % CI -7.159, -1.845),  $p = 0.0009$ , αντίστοιχα]. Πολυμορφισμοί στο rs3911238 του ITGAV και στο rs752474 του ITGB8 φαίνεται ότι επιδρούν στο mRS εξαμήνου. Η παρούσα μελέτη παρέχει σημαντικές ενδείξεις για τη συσχέτιση ενός πολυμορφισμού του ITGAV γονιδίου με την εμφάνιση λοβώδους ΕΕΑ, στην επίδραση πολυμορφισμών του ITGB8 γονιδίου στην ηλικία εμφάνισης ΕΕΑ, καθώς και στη συσχέτιση και των δύο γονιδίων με την έκβαση.

## Abstract

Intracerebral hemorrhage accounts for 10-15% of all strokes, could be caused by a wide spectrum of disorders and is more likely to result in death or major disability than ischemic stroke. A limited number of genetic variants have been linked to the development of intracerebral hemorrhage (ICH). Integrin AV and/or B8-deficient mice were found to develop ICH. The present candidate gene association study was designed to investigate possible influence of integrin AV (ITGAV) and integrin B8 (ITGB8) gene region polymorphisms on the risk of ICH. 1015 participants (250 Greek and 193 Polish patients with primary ICH and 250 Greek and 322 Polish controls) were included in the study. Using logistic regression analyses, 11 tag single nucleotide polymorphisms (SNPs) for ITGAV and 11 for ITGB8 gene were tested for associations with ICH risk, lobar ICH risk and non-lobar ICH after adjustment for age, gender, history of hypertension and country of origin. Linear regression models were used to test the effect of tag SNPs on the ICH age of onset. Correction for multiple comparisons was carried out. The rs7565633 tag SNP of the ITGAV gene was independently associated with the risk of lobar ICH in the codominant model of inheritance [odds ratio (95 % confidence interval (CI)) 0.56 (0.36–0.86),  $p = 0.0013$ ]. Furthermore, heterozygous individuals of the rs10251386 and the rs10239099 of the ITGB8 gene had significantly lower age of ICH onset compared to the wild-type genotypes [regression coefficient (b) -3.884 (95 % CI -6.519, -1.249),  $p = 0.0039$  and  $b = -4.502$  (95 % CI -7.159, -1.845),  $p = 0.0009$ , respectively]. Polymorphisms at rs3911238 of the ITGAV gene and rs752474 of the ITGB8 gene modified six month mRS outcome. The present study provides preliminary indication for an influence of ITGAV gene tag SNP in the development of lobar ICH and of ITGB8 gene variants in the age of ICH onset. An effect of both ITGAV and ITGB8 gene polymorphisms on ICH outcome was also supported by our findings.

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Αυτόματη Ενδοεγκεφαλική Αιμορραγία	13
Αιτιολογικοί Παράγοντες	15
Επιδημιολογία	23
Παθοφυσιολογία της βλάβης του εγκεφαλικού παρεγχύματος	25
Διάγνωση	27
Θεραπεία	31
Κλινική Πορεία –Πρόγνωση	38
Γενετικές μελέτες σε ασθενείς με ενδοεγκεφαλική αιμορραγία	41
Οι Ιντεγκρίνες	43

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Υλικά και Μέθοδοι	54
Εργαστηριακές τεχνικές	59

Στατιστική ανάλυση	65
Αποτελέσματα	67
Συζήτηση	76
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	80

Αυτόματη ενδοκρανιακή αιμορραγία ονομάζεται η παθολογική συσσώρευση αίματος εντός του κρανιακού θόλου, χωρίς άμεσα προηγθέντα τραυματισμό. Μπορεί να αναφέρεται στον εγκέφαλο, το στέλεχος, την παρεγκεφαλίδα ή τις μήνιγγες και τους δυνητικούς τους χώρους. Όταν το αιμάτωμα δημιουργείται εντός του εγκεφαλικού παρεγχύματος χαρακτηρίζεται ως αυτόματη ενδοεγκεφαλική αιμορραγία

Οι αυτόματες ενδοεγκεφαλικές αιμορραγίες αντιπροσωπεύουν το 10/15% των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων με μια ετήσια επίπτωση που εκτιμάται στα 16 με 33 περιστατικά στις 100000, στον αναπτυγμένο κόσμο, προκαλώντας δυσανάλογα μεγάλη θνητότητα και νοσηρότητα<sup>1</sup>. Το ποσοστό αυτό αναμένεται να διπλασιαστεί τα επόμενα 50 χρόνια κυρίως λόγω της γήρανσης του πληθυσμού<sup>2</sup>. Ανάλογα με την αιτιολογία της, η αυτόματη ενδοεγκεφαλική αιμορραγία διακρίνεται σε πρωτοπαθή και δευτεροπαθή. Τα πρωτοπαθή αιματώματα, που αποτελούν περίπου το 90% των περιπτώσεων<sup>1</sup>, προέρχονται από τη ρήξη μικρών αγγειακών στελεχών, ως αποτέλεσμα της επίδρασης της χρόνιας αρτηριακής υπέρτασης και της αμυλοειδικής αγγειοπάθειας στο τοίχωμα τους. Τα δευτεροπαθή αιματώματα, που αναπτύσσονται στη μειοψηφία των περιπτώσεων, οφείλονται σε μια ποικιλία συγγενών και επίκτητων καταστάσεων, όπως αγγειακές δυσπλασίες (αρτηριοφλεβώδεις δυσπλασίες, ανευρύσματα), νεοπλασίες η διαταραχή του πηκτικού μηχανισμού σε χρήση φαρμάκων ή άλλων χημικών ουσιών.

## Αιτιολογικοί Παράγοντες

**Αρτηριακή υπέρταση:** Η υπερτασική αγγειοπάθεια είναι το πιο συχνό αίτιο αυτόματης ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας στο γενικό πλυθυσμό,<sup>3</sup> Η αύξηση τόσο της μέσης αρτηριακής όσο και μόνο της συστολικής πίεσης μπορεί να αυξήσουν τον κίνδυνο εμφάνισης ενός, θανατηφόρου ή μη, αυτόματου ενδοεγκεφαλικού αιματώματος<sup>3</sup>. Η επίδραση της αρτηριακής πίεσης φαίνεται να είναι ίδια σε όλα τα άτομα ανεξαρτήτου φυλής ή φύλου.<sup>4</sup> Ιδιαίτερη σημασία έχει το γεγονός ότι η σωστή και συστηματική αντιυπερτασική θεραπεία φαίνεται να ελαττώνει την πιθανότητα εμφάνισης ενός αυτόματου ενδοεγκεφαλικού αιματώματος, μέχρι και 36%.<sup>[13]</sup> Οι υπερτασικές αιμορραγίες εμφανίζονται συνήθως στις περιοχές αιμάτωσης των διατητραίνουσών αρτηριών. Αυτές είναι αρτηρίες που διακλαδίζονται από τις κύριες ενδοκράνιες αρτηρίες, συχνά σε γωνία 90 μοιρών. Αρδεύουν περιοχές όπως η γέφυρα, ο θάλαμος και τα βασικά γάγγλια. Φαίνεται να είναι ιδιαίτερα επιρρεπείς στις επιπτώσεις της υπέρτασης γιατί εκτίθενται απευθείας στις πιέσεις του μεγαλύτερου μητρικού αγγείου<sup>5</sup>. Πράγματι, παθολογοανατομικές μελέτες σε ασθενείς με υπέρταση και ενδοεγκεφαλικές αιμορραγίες καταδεικνύουν πάχυνση του έσω χιτώνα των αγγείων αυτών, ινδοειδή νέκρωση του τοιχώματος και τελικά δημιουργία ψευδοανευρυσμάτων (Charcot-Bouchard) και μικρό-αιμορραγιών<sup>6</sup>. Σε μια συστηματική μελέτη, τέτοιες μικροαιμορραγίες εμφανείς σε MRI παρατηρήθηκαν στο 5% των υγιών ενηλίκων, στο 34% των ασθενών με ισχαιμικό ΑΕΕ και στο 60% των ασθενών με αυτόματη αιμορραγία<sup>7</sup>. Οι μικροαιμορραγίες έχουν βρεθεί να εμφανίζουν αυξημένη συχνότητα και σε ασθενείς που λαμβάνουν αντιπηκτική αγωγή<sup>8</sup>. Όταν ο πηκτικός μηχανισμός αδυνατεί να αντιρροπήσει την βλάβη του τοιχώματος, οι αιμορραγίες επεκτείνονται μαζικά.

**Εγκεφαλική αμυλοείδωση:** Η αμυλοειδική αγγειοπάθεια είναι ένα σημαντικό αίτιο αυτόματης ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας στους ηλικιωμένους. (συνήθως άνω των 70 ετών<sup>9,10</sup>) Χαρακτηρίζεται από εναπόθεση β-αμυλοειδούς σε μικρού και μεσαίου μεγέθους αγγεία και είναι η σημαντικότερη αιτία λοβωδών αιματωμάτων σε αυτή την ηλικιακή ομάδα, προσβάλλοντας κυρίως το βρεγματικό

και τον ινιακό λοβό. Κύριο κλινικό χαρακτηριστικό της κατάστασης αυτής είναι οι συνεχείς και επαναλαμβανόμενες αιμορραγίες, αν και μπορεί να εμφανιστεί με την εικόνα κάποιου νευρολογικού συνδρόμου ή άνοιας.<sup>11</sup>

**Αγγειακές δομικές βλάβες:** Στην ομάδα αυτή των αιτιολογικών παραγόντων ανήκουν συγγενείς ή επίκτητες δυσπλασίες του αγγειακού δικτύου. Αποτελούν το πιο συχνό αίτιο εγκεφαλικής αιμορραγίας στους νέους

#### *Ανευρύσματα*

Τα ανευρύσματα αποτελούν τη δεύτερη σε σειρά αιτία αυτόματης ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας, μετά την αρτηριακή υπέρταση, προκαλώντας το 20% των περιπτώσεων αυτών.<sup>12</sup> Ο ετήσιος ρυθμός αιμορραγίας των άρρηκτων ανευρυσμάτων είναι περίπου 1%, με ανευρύσματα άνω των 10mm να έχουν υψηλότερο κίνδυνο αιμορραγίας.<sup>13</sup> Αν και η συχνότερη εμφάνιση των ρηγμένων ανευρυσμάτων είναι η υπαραχνοειδής αιμορραγία, περίπου το 40% αυτών εμφανίζονται ως ενδοπαρεγχυματική αιμορραγία.<sup>13,14</sup> Συχνότερη είναι η εμφάνιση της ενδοπαρεγχυματικής αιμορραγίας σε επανααιμορραγία του ανευρύσματος. Γενικά, τα ανευρύσματα αιμορραγούν στο εγκεφαλικό παρέγχυμα όταν βρίσκονται «βυθισμένα» στον ιστό (διακλαδώσεις της έσω καρωτίδας, πρόσθια εγκεφαλική αρτηρία), όταν προέχουν μέσα στον ιστό (οπίσθια εγκεφαλική αρτηρία), όταν οι γειτονικές δομές έχουν υποστεί ουλοποίηση από προηγούμενη αιμορραγία και όταν ο γειτονικός εγκεφαλικός ιστός έχει υποστεί ήδη βλάβη.<sup>14</sup>

#### *Αρτηριοφλεβώδεις δυσπλασίες*

Οι αγγειακές αυτές δυσπλασίες είναι συγγενούς αιτιολογίας. Εμφανίζονται συνήθως στα εγκεφαλικά ημισφαίρια και στην περιοχή της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας. Μακροσκοπικά εμφανίζονται σαν αγγειακές μάζες, διαφόρου μεγέθους με ανώμαλο τοίχωμα εύθρυπτες και αιμορραγικές. Στην παθολογοανατομική εξέταση τα αγγεία παρουσιάζουν αλληλοεπικοινωνίες, θρομβώσεις και παθολογικό τοίχωμα. Μεταξύ των αγγείων αναπτύσσεται γλοιώδης ιστός ενώ παρεμβάλλεται και φυσιολογικός εγκεφαλικός ιστός. Μόλις το 18-20% διαγιγνώσκονται πριν την ηλικία των 15 χρόνων αν και θεωρούνται συγγενείς ανωμαλίες.<sup>15</sup> Η ενδοεγκεφαλική αιμορραγία είναι η πρώτη εκδήλωση των αρτηριοφλεβικών δυσπλασιών στο 65%

των περιπτώσεων. Η αιμορραγία εντοπίζεται στο παρέγχυμα του εγκεφάλου σε ποσοστό 45%, στον υπαραχνοειδή χώρο στο 20% και στους δύο παραπάνω χώρους στο 10%. Κοιλιακή είναι η εντόπιση της αιμορραγίας στο 10% των περιπτώσεων ενώ συνδυασμός ενδοκοιλιακής και ενδοπαρεγχυματικής αιμορραγίας στο 15% των περιπτώσεων.<sup>16</sup> Ο ρυθμός επαναιμορραγίας μπορεί να είναι μέχρι και 15% με 20% κατά τη διάρκεια των πρώτων 14 ημερών μετά την αρχική αιμορραγία και μετά το πρώτο έτος ελαττώνεται στο 6% με 18%. Τέλος, όσον αφορά στην ηλικιακή κατανομή της οφειλόμενης σε αρτηριοφλεβώδη δυσπλασία ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας, αναφέρεται ότι το 75% αυτών συμβαίνουν πριν οι ασθενείς φτάσουν τα πενήτηκοστά γενέθλιά τους και ότι η μέγιστη συχνότητα είναι κατά τη διάρκεια της 5<sup>ης</sup> δεκαετίας της ζωής τους. Ιδιαίτερα μεγάλη συχνότητα παρατηρείται επίσης και κατά την ηλικία μεταξύ 0 και 9 ετών.<sup>16</sup> Γι' αυτό το λόγο η υπόνοια μιας αρτηριοφλεβώδους δυσπλασίας τίθεται σε περιπτώσεις νέων ασθενών χωρίς ιστορικό υπέρτασης, που επιπλέον έχουν επιφανειακή, λοβιακή, περικοιλιακή ή ενδοκοιλιακή αιμορραγία και όταν οι σχηματιζόμενοι θρόμβοι φέρουν μια κυκλική περιοχή χαμηλής πυκνότητας γύρω τους ή συνδυάζονται με αίμα στον υπαραχνοειδή χώρο.<sup>14</sup>

#### *Σηραγγώδη αγγειώματα*

Τα σηραγγώδη αγγειώματα είναι δομές που αποτελούνται από ευμεγέθη κολποειδή αγγειακά κανάλια χωρίς παρεμβαλλόμενο εγκεφαλικό ιστό και έχουν χαμηλή αιματική ροή. Σιδηροφάγα μακροφάγα μπορεί να παρατηρηθούν ενδιάμεσα ή γύρω από τα αγγειακά κανάλια, όπως επίσης και ασβεστώσεις. Διακρίνονται σε δυο μορφές: την κυστική μορφή και το ασβεστοποιοί αιμαγγείωμα, το οποίο θεωρείται ότι είναι ασβεστοποιημένη σηραγγώδης δυσπλασία, εντοπίζεται κυρίως στον κροταφικό λοβό και έχει μικρή πιθανότητα εκδήλωσης αιμορραγίας. Συνήθως είναι μονήρη. Η επίπτωση των σηραγγωδών αγγειωμάτων στο γενικό πληθυσμό είναι περίπου 0,4%, με ένα εκτιμώμενο κίνδυνο αιμορραγίας περίπου 0.7% ανά έτος. Όσον αφορά στην αιτιολογική συσχέτιση τους με τα ενδοεγκεφαλικά αιματώματα, οι απόψεις δίστανται. Υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν την πολύ μικρή επίπτωσή τους ως αιτίες των εγκεφαλικών αιματωμάτων και άλλες που υποστηρίζουν ότι ποσοστό 27% ως 53% των ασθενών με λοβώδη αιμορραγία μπορεί να υποκρύπτουν μία τέτοια δυσπλασία.<sup>13</sup> Αξίζει να



σημειωθεί ότι υπάρχει και κληρονομούμενη μορφή που σχετίζεται με μια μετάλλαξη στο μακρύ τμήμα του χρωμοσώματος 7 (7q) και έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της λειτουργικότητας της πρωτεΐνης Krit1. Απαντάται συχνότερα σε Ισπανό-Αμερικάνους, όπου μπορεί να παρατηρηθούν πολλαπλά σηραγγώδη αγγειώματα.<sup>15</sup> Η έκβαση των ασθενών με σηραγγώδες αγγείωμα εξαρτάται από την εντόπιση αυτού. Η εντόπιση στο θάλαμο, το εγκεφαλικό στέλεχος και το μυελικό σωλήνα έχουν τη χειρότερη πρόγνωση, ενώ η υπερσκληνίδια εντόπιση την καλύτερη. Η επαναιμορραγία είναι ένα αρκετά συχνό φαινόμενο, αν και φαίνεται ότι ο ρυθμός επαναιμορραγίας βαίνει μειούμενος μέσα σε μια περίοδο 3 ετών.<sup>[21]</sup> Τα σιδηροφάγα κύτταρα που περιβάλλουν τις βλάβες συνηγορούν στο ότι η αιμορραγία είναι επαναλαμβανόμενη ακόμη και υποκλινικά.<sup>13</sup>

#### *Φλεβικά αγγειώματα*

Τα φλεβικά αγγειώματα αποτελούν μετατριχοειδικές δυσπλασίες και αποτελούνται από ένα δίκτυο μικρών και ιστολογικά ανώμαλων φλεβών που περιβάλλουν ένα κεντρικό φλεβικό αυλό. Οι φλέβες χαρακτηρίζονται από υαλίνωση και πάχυνση, ενώ ο ενδιάμεσος εγκεφαλικός ιστός είναι φυσιολογικός. Το κεντρικό φλεβικό στέλεχος συνήθως προσανατολίζεται προς το φλοιό του εγκεφάλου και προς το κοντινότερο φλεβώδη κόλπο της σκληράς μήνιγγας. Αν και τα φλεβώδη αγγειώματα αποτελούν το συχνότερο τύπο εγκεφαλικής αγγειακής δυσπλασίας (63%), έχουν τη χαμηλότερη συχνότητα ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας.<sup>15</sup>

#### *Τριχοειδική τηλεαγγειεκτασία.*

Η τριχοειδική τηλεαγγειεκτασία είναι μια αγγειακή δυσπλασία που χαρακτηρίζεται από διατεταμένα τριχοειδή αγγεία με φυσιολογικό παρεμβαλλόμενο εγκεφαλικό ιστό. Συχνά συνδέεται με τη νόσο Rendy-Osler-Weber, όπου οι δυσπλασίες παρατηρούνται σε πολλά όργανα. Η τριχοειδική τηλεαγγειεκτασία εντοπίζεται συνήθως στη γέφυρα, όπου και μπορεί να εκδηλωθεί ως αιμορραγία με τη μορφή του «μερικού γεφυρικού αιματώματος», που χαρακτηρίζεται από ομόπλευρη πάρεση της συζυγούς βλεμματικής κίνησης ή διαπυρηνική οφθαλμοπληγία.<sup>13</sup>

**Διαταραχές του πήκτικού μηχανισμού:** Στον μηχανισμό της πήξης εμπλέκονται τα αιμοπετάλια οι παράγοντες πήξης και το σύστημα ινωδόλυσης. Βλάβη και δυσλειτουργία των παραγόντων αυτών οδηγεί είτε σε αυτόματη ενδοεγκεφαλική αιμορραγία είτε επιδεινώνει αιμορραγία άλλης αιτιολογίας

Στην πρώτη ομάδα ανήκουν οι διαταραχές του αριθμού των αιμοπεταλίων (λόγω ελαττωμένης παραγωγής ή λόγω περιφερικής καταστροφής τους) και οι διαταραχές της λειτουργίας τους (συγγενείς ή επίκτητες). Ο κίνδυνος εκδήλωσης μιας ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας αυξάνεται με μείωση του αριθμού των αιμοπεταλίων.<sup>17</sup>

Στη δεύτερη ομάδα ανήκουν συγγενείς (π.χ. αιμορροφιλία) ή επίκτητες διαταραχές (ανεπάρκεια της βιταμίνης Κ, διάχυτη ενδαγγειακή πήξη, ηπατική νόσος) της λειτουργίας των παραγόντων πήξης. Η εκδήλωση αιμορραγίας σχετίζεται με ελάττωση του εκάστοτε παράγοντα κάτω από το 1% της φυσιολογικής τιμής. Στους ασθενείς με αιμορροφιλία ο κίνδυνος ανάπτυξης μιας ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας φτάνει το 2-3% ανά έτος. Οι αιμορραγίες αυτές συμβαίνουν στο 10% των ασθενών και το 30% αυτών είναι θανατηφόρες.<sup>18</sup> Συχνά συνδυάζονται με κρανιοεγκεφαλική κάκωση. Τα αναπτυσσόμενα αιματώματα συνήθως είναι μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα άλλης αιτιολογίας και αφορούν κυρίως τους λοβούς των ημισφαιρίων. Η προσβολή διαφόρων εγκεφαλικών τμημάτων συγχρόνως, η ασυνήθης εντόπιση του αιματώματος, τα πολλαπλά αιματώματα και η παρουσία επιπέδου αίματος-υγρού, θα πρέπει να θέτουν την υπόνοια της διαταραχής της πήξης.<sup>19</sup>

**Νεοπλασίες:** Οι νεοπλασίες του εγκεφαλικού παρεγχύματος αναφέρονται ως στο 0,9-11% των περιπτώσεων ως πρωταρχικός αιτιολογικός παράγοντας των αυτόματων ενδοκρανιακών αιμορραγιών στο 0,9% ως 11% των περιπτώσεων,. Το 3,9% των ασθενών με εγκεφαλική νεοπλασία μπορεί να εκδηλώσουν αιμορραγία. Η προκαλούμενη αιμορραγία μπορεί να είναι υπαραχνοειδής, υποσκληρίδια, επισκληρίδια ή ενδοπαρεγχυματική, με την τελευταία να υπερέχει σαφώς. Ως αιτία της αιμορραγίας έχουν ενοχοποιηθεί τόσο πρωτοπαθείς όσο και μεταστατικοί όγκοι του εγκεφαλικού παρεγχύματος.( 10% των μεταστατικών και 5% των πρωτοπαθών όγκων). Από τους μεταστατικούς όγκους, μεγαλύτερο κίνδυνο εκδήλωσης ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας παρουσιάζουν το βρογχογενές καρκίνωμα, το

μελάνωμα, το χοριοκαρκίνωμα και το καρκίνωμα εκ νεφρικών κυττάρων. Από τους πρωτοπαθείς όγκους, τη μεγαλύτερη πιθανότητα εκδήλωσης ενός ενδοεγκεφαλικού αιματώματος έχει το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα (IV<sup>ου</sup> βαθμού αστροκύτωμα), με ποσοστό που φτάνει το 7,8%. Επιπλέον τόσο το ολιγοδενδρογλοίωμα, όσο και τα καλά διαφοροποιημένα αστροκυτώματα μπορεί να εκδηλώσουν ενδοεγκεφαλική αιμορραγία, όπως επίσης και καλοήθεις όγκοι, με πρώτο το αδένωμα της υπόφυσης. Ανεξάρτητα από τον τύπο της υποκείμενης νεοπλασίας, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η αιμορραγία αναπτύσσεται εντός του όγκου (ποσοστό 66,7%) και στον ιστό γύρω από αυτόν.<sup>20</sup>

Ο μηχανισμός πρόκλησης της ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας σε περίπτωση νεοπλασίας του εγκεφαλικού παρεγχύματος μπορεί να σχετίζεται με ρήξη εύθραυστων και μορφολογικά ανώμαλων αγγείων, έμβολα που προκαλούν αιμορραγικό έμφρακτο, διήθηση του αγγειακού τοιχώματος από τον όγκο, αγγειακή νέκρωση μετά από ακτινοβολία, αιφνίδιες αυξήσεις της ενδοκράνιας πίεσης μετά από αποσυμφόρηση του ΕΝΥ και διάφορους μεταβολικούς παράγοντες του ταχέως αναπτυσσόμενου όγκου.

**Αγγειίτιδες:** Η αγγειίτιδα περιλαμβάνει καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από φλεγμονή και νέκρωση του τοιχώματος των αγγείων. Οι παραπάνω καταστάσεις μπορούν να προκαλέσουν αυτόματη ενδοεγκεφαλική αιμορραγία εξασθενίζοντας το τοίχωμα των αγγείων, αποφράσσοντας αγγεία και δημιουργώντας έμφρακτο, μέσα στο οποίο μπορεί να επισυμβεί αιμορραγία.

**Άλλες αγγειοπάθειες:** Αξίζει να αναφερθεί η νόσος Μογατογα . Έως 10% των περιπτώσεων Μογατογα είναι οικογενείς και αποδίδονται σε συγκεκριμένες γενετικές μεταλλάξεις. Πρόκειται για ένα ιδιαίτερο σύνδρομο, το οποίο προκαλεί απόφραξη των εγκεφαλικών αγγείων. Χαρακτηρίζεται από προοδευτική στένωση του προσθίου τμήματος του κύκλου του Willis, αντιρροπιστικές αναστομώσεις των αγγείων της σκληράς μήνιγγας ή του προσθίου εγκεφαλικού βόθρου και παράπλευρα κανάλια στα βασικά γάγγλια. Η αιμορραγία στην περίπτωση αυτή οφείλεται σε ρήξη μικροανευρυσμάτων των αγγείων των βασικών γαγγλίων ή των δευτεροπαθών ανευρυσμάτων του εγγύς τμήματος της έσω καρωτίδας και των αγγείων του προσθίου εγκεφαλικού βόθρου. Το αυτόματο ενδοεγκεφαλικό

αιμάτωμα αποτελεί τη συχνότερη αιτία θανάτου στους πάσχοντες από Μογατογα

.<sup>13</sup>

**Φάρμακα:** Η λήψη διαφόρων φαρμακευτικών σκευασμάτων είτε για θεραπευτικούς σκοπούς είτε ως αποτέλεσμα παράνομης πράξης μπορεί επίσης να αποτελέσει την αιτία πρόκλησης και εμφάνισης ενός αυτόματου ενδοεγκεφαλικού αιματώματος. Οι κατηγορίες των φαρμάκων που σχετίζονται με το ενδοεγκεφαλικό αιμάτωμα είναι τα αντιπηκτικά, τα αντιαιμοπεταλιακά και τα θρομβολυτικά φάρμακα. Αποτελούν σημαντικό τμήμα, τόσο της θεραπευτικής αντιμετώπισης όσο και της πρόληψης, του εμφράγματος του μυοκαρδίου, του ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου και της θρομβοεμβολικής νόσου. Κύρια χρησιμοποιούμενα φάρμακα είναι οι ηπαρίνες, οι άμεσοι αναστολείς της θρομβίνης, οι εκλεκτικοί αναστολείς του παράγοντα Χα, τα κουμαρινικά παράγωγα, καθώς και αντιαιμοπεταλιακοί παράγοντες όπως η ασπιρίνη. Η χορήγηση ηπαρίνης ή βαρφαρίνης σχετίζεται με το 10% του συνόλου των αυτόματων ενδοεγκεφαλικών αιματωμάτων και μάλιστα το 70% αυτών είναι ενδοπαρεγχυματικές. Η αγωγή με κουμαρινικά παράγωγα αυξάνει τον κίνδυνο για ενδοεγκεφαλική αιμορραγία 2-5 φορές, ενώ INR (International Normalized Ratio) άνω του 3 σχετίζεται με μεγαλύτερου αρχικού όγκου αιματώματα.<sup>21</sup> Τα νεότερα αντιπηκτικά συμφώνα με τις πρόσφατες μεταanalύσεις δείχνουν να μειώνουν σημαντικά τον κίνδυνο σε σχέση με τα κλασικά κουμαρινικά αντιπηκτικά (RR 0.44).<sup>22</sup>

Όσον αφορά στα αντιαιμοπεταλιακά από τα αποτελέσματα διαφόρων μεταanalύσεων προκύπτει μικρός κίνδυνος πρόκλησης ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας. Ενδεχομένως η μακροχρόνια διπλή αντιαιμοπεταλιακή αγωγή να αυξάνει τον κίνδυνο σε κάποιους πληθυσμούς.<sup>23</sup>

Η συστηματική η θρομβόλυση συνεχίζει να αποτελεί μια από τις θεραπευτικές παρεμβάσεις στο έμφραγμα του μυοκαρδίου και στο ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισοδίου, στοχεύοντας στη ταχεία αποκατάσταση του αγγειακού αυλού και την προστασία του προσβαλλόμενου ιστού. Η αυτόματη ενδοεγκεφαλική αιμορραγία είναι και σε αυτή την περίπτωση η πιο επίφοβη παρενέργεια και αναφέρεται ως αποτέλεσμα τόσο της ενδοφλέβιας όσο και της ενδαρτηριακής χορήγησης των θρομβολυτικών παραγόντων. Πάραυτα αξίζει να σημειωθεί για τους ασθενείς με ισχαιμικό ΑΕΕ πως μια νεώτερη υποανάλυση του μητρώου της RESCUE

δεν κατέδειξε συσχετισμό της αιμορραγικής μετατροπής αυτών με την θρομβολυση.<sup>24</sup>

Εκτός όμως από τις παραπάνω περιπτώσεις, όπου το αυτόματο ενδοεγκεφαλικό αιμάτωμα είναι ουσιαστικά παρενέργεια διαφόρων φαρμακευτικών θεραπευτικών παρεμβάσεων, η αυτόβουλη λήψη διαφόρων, απαγορευμένων συνήθως, χημικών ουσιών μπορεί να έχει το ίδιο αποτέλεσμα. Στην ομάδα των ουσιών αυτών ανήκουν συμπαθητικομιμητικά, όπως η κοκαΐνη<sup>25</sup>, οι αμφεταμίνες, η εφεδρίνη η ψευδοεφεδρίνη, η φαινυλκυκλιδίνη, η φαινυλπροπανολαμίνη<sup>26</sup> και το κρακ<sup>21</sup>. Αν και το μεγαλύτερο ποσοστό των προκαλούμενων από τις ουσίες αυτές αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων είναι ισχαιμικά, στο 1/3 των περιπτώσεων προκαλείται ενδοεγκεφαλική αιμορραγία. Οι ηλικίες που κυρίως προσβάλλονται είναι οι νεαροί ενήλικες και οι μεσήλικες, ενώ η συνηθέστερη εντόπισή τους είναι η υποφλοιώδης λευκή ουσία. Η χρονική στιγμή ανάπτυξης του ενδοεγκεφαλικού θρόμβου φαίνεται να είναι είτε κατά τη διάρκεια είτε κάποιες ώρες μετά τη χρήση της παράνομης ουσίας, αν και οι μακροχρόνιοι χρήστες έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα αιμορραγίας. Όσον αφορά στον μηχανισμό πρόκλησης της αιμορραγίας, οξείες αυξήσεις της αρτηριακής πίεσης και ιστολογικές αλλοιώσεις αγγείτιδας παίζουν σημαντικό ρόλο, αν και σε πάνω από το 50% των περιπτώσεων συνυπάρχει κάποια υποκείμενη αγγειακή δυσπλασία, όπως ανεύρυσμα ή αρτηριοφλεβώδης δυσπλασία.<sup>21</sup>

**Αιμορραγικός μετασχηματισμός ισχαιμικού επεισοδίου:** Η μετατροπή ενός ισχαιμικού εμφράκτου σε αιμορραγικό έμφρακτο ή ακόμα και σε αυτή καθεαυτή αιμορραγία είναι αρκετά συχνή και φαίνεται να οφείλεται στη διάνοιξη του κλεισμένου εξ αρχής αγγείου και τη διαφυγή αίματος από τα αγγεία, τα οποία υπέστησαν βλάβες κατά την ισχαιμική προσβολή και από το διαταραγμένο αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Ο κίνδυνος μιας τέτοιας μετατροπής είναι μεγαλύτερος σε ασθενείς με έμβολα από τις καρωτίδες ή τις καρδιακές κοιλότητες, σε αυτούς με μεγάλα έμφρακτα, και σε αυτούς που λάμβαναν προ του επεισοδίου αντιαιμοπεταλιακή η αντιπηκτική αγωγή<sup>27</sup>. Ο μετασχηματισμός αυτός μπορεί να μην είναι εμφανής την πρώτη μέρα και συχνά συμβαίνει κατά τη διάρκεια των τεσσάρων πρώτων ημερών.

**Λοιμώδη αίτια:** Αυτόματη ενδοεγκεφαλική αιμορραγία μετά από κάποια λοίμωξη μπορεί να οφείλεται σε αιμορραγία μέσα σε έμφρακτο ή συχνότερα σε ρήξη ενός μυκωτικού ανευρύσματος. Συνηθέστερα τα ανευρύσματα αυτά είναι αποτέλεσμα μικροβιακής ενδοκαρδίτιδας και συμβαίνουν σε ένα ποσοστό 1,7% των ασθενών αυτών. Είναι αποτέλεσμα της δημιουργίας σηπτικών εμβόλων και αφορούν συχνότερα τους κλάδους της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας. Η κύρια εικόνα είναι οι πολλαπλές αιμορραγίες, που αναπτύσσονται στο απομακρυσμένο άκρο των αγγείων. Η αιμορραγία συμβαίνει 1-2 μέρες μετά τη λοίμωξη ή μήνες μετά από αυτή (μέσος όρος: 17 μέρες).<sup>13</sup>

**Άλλες αιτίες:** Η θρόμβωση των φλεβωδών κόλπων του εγκεφάλου μπορεί να προκαλέσει την ανάπτυξη ενός ενδοεγκεφαλικού αιματώματος τα χαρακτηριστικά του οποίου είναι η λοβώδη εντόπιση και η προσβολή κυρίως της υποφλοιώδους λευκής ουσίας.<sup>13</sup>

Ειδική κατηγορία αυτόματων ενδοεγκεφαλικών αιματωμάτων είναι αυτά που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και της παιδικής ηλικίας. Η αυτόματη ενδοεγκεφαλική αιμορραγία κατά την εγκυμοσύνη μπορεί να οφείλεται σε ειδικές συνθήκες της περιόδου αυτής όπως σε εκλαμψία, μεταστατικό χοριοκαρκίνωμα και διάχυτη ενδαγγειακή πήξη, αλλά υπάρχει μια αυξημένη πιθανότητα ενδοπαρεγχυματικής αιμορραγίας από ρήξη προϋπάρχοντος ανευρύσματος ή αρτηριοφλεβώδους δυσπλασίας κατά την εγκυμοσύνη. Με θνητότητα 30%-40% , οι ενδοπαρεγχυματικές αιμορραγίες είναι υπεύθυνες για 1 στους 10 μητρικούς θανάτους.<sup>29</sup>

Τέλος, όσον αφορά στην παιδική ηλικία, η σημαντικότερη ενδοεγκεφαλική αιμορραγία αυτής της περιόδου είναι η ενδοκοιλιακή και περικοιλιακή αιμορραγία που συναντάται κυρίως στα νεογνά, ιδιαίτερα στα πρόωρα χαμηλού σωματικού βάρους. Άλλοι παράγοντες, όπως οι δυσπλασίες της φλέβας του Γαληνού, η λευχαιμία, η ιδιοπαθής θρομβοπενική πορφύρα και διάφορες κληρονομικές διαταραχές της πήξης μπορούν επίσης να σχετιστούν με την αυτόματη ενδοεγκεφαλική αιμορραγία αυτής της ηλικιακής ομάδας.<sup>14</sup>

**Γενετικοί παράγοντες:** Σε μια πρόσφατη μεγάλης κλίμακας μελέτη γενετικής συσχέτισης βρέθηκε κληρονομικότητα 45% για την ενδοκράνια αιμορραγία.

Ειδικότερα για την τη σχετιζόμενη με την εγκεφαλική αμυλοείδωση το ποσοστό αυτό έφτανε το 70%, ενώ για την σχετιζόμενη με την αρτηριακή υπέρταση το 35%. Οι Απολιποπρωτείνες E ε2/ε4 βρέθηκαν να έχουν γονιδιωματικής κλίμακας (genome-wide) στατιστική σημαντικότητα (odds ratio [OR]=1.82;  $P=6.6 \times 10^{-10}$  and OR=2.20;  $P=2.4 \times 10^{-11}$ , αντίστοιχα) για την εκδήλωση ενδοκράνιας αιμορραγίας, σχετιζόμενη με την εγκεφαλική αμυλοείδωση (λοβώδης εντόπιση)<sup>30</sup>. Η μελέτη αυτή επιβεβαιώνει προηγούμενες μελέτες σχετικά με το ρολό των APO E ε2/ε4 στην εμφάνιση αυτού του τύπου ενδοκράνιας αιμορραγίας<sup>31</sup>. Όταν διερευνήθηκαν όλες οι θέσεις σχετιζόμενες με τη νόσο Alzheimer μια παραλλαγή του γονιδίου *CR1* φαίνεται να συμμετέχει ιδιαίτερα στην αύξηση του κινδύνου (OR=1.61;  $P=8.0 \times 10^{-4}$ ). Στην ίδια μελέτη μια βαθμολόγηση του γενετικού κινδύνου για τις γνωστές θέσεις σχετιζόμενες με την υπέρταση έδειξε αύξηση του κινδύνου για ενδοεγκεφαλική αιμορραγία σχετιζόμενη με υπέρταση (OR=1.18 για κάθε μια από τις μελετημένες παραλλαγές;  $P=0.001$ )<sup>30</sup>. Άλλα αλληλόμορφα γονίδια που ενδεχομένως να σχετίζονται με την εμφάνιση αυτόματης ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας είναι του ACE<sup>32</sup>, του κολλαγόνου IV A1 και A2 (COL4A1/A2)<sup>33</sup>, του πεπτιδίου σηματοδότη του γονιδίου της α1 αντιχημοθρυψίνης<sup>34</sup>, του MTHFR<sup>36</sup>, του fga thr312ala<sup>35</sup>

## Επιδημιολογία

**Συχνότητα:** Τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια (ΑΕΕ) αποτελούν τη τρίτη σε σειρά αιτία θανάτου, μετά τις καρδιακές παθήσεις και τις νεοπλασίες, αριθμώντας το 2%- 4% όλων των θανάτων. Τα αυτόματα ενδοεγκεφαλικά αιματώματα αποτελούν τη μία από τις δύο κλινικές μορφές ΑΕΕ, αποτελώντας περίπου το 6%-15% των ΑΕΕ στο Δυτικό Κόσμο και 20%-25% των ΑΕΕ στην Ανατολή (το αντίστοιχο παγκόσμιο ποσοστό είναι 10%-15% των ΑΕΕ). Η ετήσια επίπτωση των αυτόματων ενδοεγκεφαλικών αιματωμάτων κυμαίνεται μεταξύ 16-33 περιστατικών σε 100000 πληθυσμό.<sup>1</sup> Ο ρυθμός αυτός αναμένεται να διπλασιαστεί μέσα στα επόμενα 50 χρόνια, ως αποτέλεσμα αύξησης του μέσου όρου ζωής και των αλλαγών στη φυλετική και γεωγραφική πληθυσμιακή κατανομή.<sup>2</sup>

**Ηλικία:** Τα αυτόματα ενδοεγκεφαλικά αιματώματα μπορούν να προσβάλλουν όλες τις ηλικιακές ομάδες, ακόμα και τα παιδιά, η συχνότητά τους όμως αυξάνεται με την πρόοδο της ηλικίας. Η επίπτωση τους αυξάνει μετά το 55<sup>ο</sup> έτος της ηλικίας και διπλασιάζεται με κάθε δεκαετία ζωής μέχρι τα 80 ετη.<sup>15,37</sup>

**Φύλο:** Οι άνδρες έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα από τις γυναίκες να εμφανίσουν ένα αυτόματο ενδοεγκεφαλικό αιμάτωμα.<sup>15</sup>

**Φυλή:** Η φυλετική ταυτότητα φαίνεται επίσης να επηρεάζει την επίπτωση των αυτόματων ενδοεγκεφαλικών αιματωμάτων. Συγκεκριμένες πληθυσμιακές ομάδες, όπως οι μαύροι και οι ιάπωνες έχουν αυξημένη επίπτωση. Στην περίπτωση της μαύρης φυλής η επίπτωση είναι 50 περιπτώσεις σε 100000 πληθυσμό, διπλάσια σε σύγκριση με την αντίστοιχη της καυκάσιας φυλής. Η διαφορά αυτή μπορεί να αποδοθεί στην αυξημένη τιμή της αρτηριακή πίεσης και στο χαμηλότερο κοινωνικοοικονομικό επίπεδο των ατόμων της μαύρης φυλής. Όσον αφορά στον ιαπωνικό πληθυσμό, η εκτιμώμενη επίπτωση των αυτόματων ενδοεγκεφαλικών αιματωμάτων είναι ελαφρώς υψηλότερη (55 περιπτώσεις σε 100000 πληθυσμό). Περιβαλλοντικοί ή/και γενετικοί λόγοι έχουν ενοχοποιηθεί για τη διαφορά αυτή.<sup>15,38</sup>



**Θνητότητα-Νοσηρότητα:** Τα αυτόματα ενδοεγκεφαλικά αιματώματα εξακολουθούν να έχουν μεγάλη νοσηρότητα και θνητότητα, παρόλο που πρόσφατες μελέτες παρουσιάζουν μείωση της θνητότητας που σχετίζεται με την οντότητα αυτή. Αποτελούν την αιτία του 15% με 20% των θανάτων που οφείλονται σε ΑΕΕ, ενώ έχουν επίσης ενοχοποιηθεί και για το 10%-15% του συνόλου των αιφνίδιων θανάτων. Η θνητότητα της νόσου τις πρώτες 30 ημέρες υπολογίζεται σε 44% στις ΗΠΑ. Το μεγαλύτερο ποσοστό των πρώιμων αυτών θανάτων είναι άμεσο αποτέλεσμα της εγκεφαλικής βλάβης και δυσλειτουργίας. Ο μέσος ετήσιος κίνδυνος θανάτου κατά τη διάρκεια των 5 πρώτων ετών για τους ασθενείς που επέζησαν τις πρώτες 30 ημέρες είναι 8%. Από τους επιζώντες τελικά, στο 80% παραμένει κάποια μορφή αναπηρίας και εξάρτησης από τρίτους, σε άλλοτε άλλο βαθμό.<sup>1</sup>

**Κόστος:** Εκτός από την άμεση και εμφανή επίδραση ενός αυτόματου ενδοεγκεφαλικού αιματώματος στην επιβίωση και την ποιότητα ζωής του προσβεβλημένου ατόμου, η νοσολογική αυτή οντότητα μπορεί επιπλέον να αποτελέσει τόσο θέμα πολιτικό όσο και θέμα δημόσιας υγείας, όσον αφορά στο κόστος που αυτή συνεπάγεται. Μελέτες που διεξάχθηκαν με σκοπό τον προσδιορισμό του άμεσου (νοσήλεια, φάρμακα, γιατροί κλπ) και του έμμεσου (μείωση της παραγωγικότητας) κόστους κατέληξαν στο συνολικό ποσό των 70000\$ για κάθε αυτόματο ενδοεγκεφαλικό αιμάτωμα, τουλάχιστον στις Η.Π.Α.<sup>39</sup>

## Παθοφυσιολογία της βλάβης του εγκεφαλικού παρεγχύματος

Στη βλάβη του εγκεφαλικού παρεγχύματος από την ενδοεγκεφαλική αιμορραγία συμμετέχουν πολλοί μηχανισμοί πρωτοπαθείς και δευτεροπαθείς. Ως χωροκατακτική βλάβη (mass effect) το αιμάτωμα με το συνοδό περιεσσιακό οίδημα που εμφανίζει έχει ως αποτέλεσμα την άμεση μηχανική βλάβη στους παρακείμενους νευρώνες. Επίσης καθότι το φαινόμενο αυτό λαμβάνει χώρα σε μια κλειστή κοιλότητα, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενδοκράνιας πίεσης και συνακόλουθα την μείωση της πίεσης άρδευσης του εγκεφάλου και γενίκευση της ισχαιμίας. Τελικό καταστροφικό αποτέλεσμα της αύξησης του όγκου της βλάβης είναι ο εγκολεασμός.<sup>14</sup>

Η μεγέθυνση του αιματώματος κατά τις 6 πρώτες ώρες από την έναρξη του επεισοδίου, κυρίως σε ασθενείς με υπερτασικής αιτιολογίας αιμορραγίες αποτελεί έναν σημαντικό μηχανισμό περαιτέρω βλάβης. Πολλοί διαφορετικοί μηχανισμοί έχουν ενοχοποιηθεί για το φαινόμενο αυτό. Η μηχανική διάσπαση των αγγείων που περιβάλουν το αιμάτωμα έχει περιγράψει από παλιότερες παθολογοανατομικές μελέτες. Διαταραχές του μηχανισμού της πήξης και εμμένουσα υπέρταση έχουν συσχετιστεί σαφώς στατιστικά. Σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει και η κατάλυση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού με την ενεργοποίηση φλεγμονωδών διεργασιών και την ακόλουθη αύξηση της συγκέντρωσης των μεσοκυττάρων μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs), της ιντερλευκίνης 6 (IL-6) και μείωση της κυτταρικής φμπρονεκτίνης (c-Fn).<sup>40</sup>

Η δευτερογενής βλάβη του εγκεφαλικού ιστού μετά την αιμορραγία είναι μια διαδικασία που συμβάλει σημαντικά στην τελική έκβαση. Σε απεικονιστικές εξετάσεις παρατηρείται περιεσσιακό οίδημα που αυξάνει γρήγορα τις πρώτες 48 ώρες και με μικρότερους ρυθμούς έως και τη 12 ημέρα μετά την αιμορραγία. Για το οίδημα αυτό ενοχοποιούνται αγγειογενείς και κυτταροτοξικοί μηχανισμοί.<sup>41</sup>

Η μείωση της αιματικής ροής πέριξ του αιματώματος και η συνακόλουθη τοπική ισχαιμία προκαλεί την απελευθέρωση διεγερτικών αμινοξέων και προφλεγμονωδών διαβιβαστών που περαιτέρω επιδεινώνει το κυτταροτοξικό οίδημα. Η απελευθέρωση θρομβίνης από το αιμάτωμα επίσης ενεργοποιεί τους

μηχανισμούς φλεγμονής και την έκφραση μεταλλοπρωτεϊνών που συμμετέχουν στην καταστροφή του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και στη δημιουργία περιεστιακού οιδήματος και ισχαιμίας. Κάποιες μελέτες υποστηρίζουν ότι ένας σημαντικός αριθμός ασθενών εμφανίζει ισχαιμικές βλάβες απομακρυσμένες από την περιοχή του αιματώματος.<sup>42</sup>

## Διάγνωση

### Κλινική Εικόνα

Η κλασική εκδήλωση ενός αυτόματου ενδοεγκεφαλικού αιματώματος είναι η οξεία εμφάνιση ενός εστιακού νευρολογικού ελλείμματος, που εγκαθίσταται μέσα σε λεπτά ή ώρες και συνοδεύεται συνήθως από συμπτωματολογία αυξημένης ενδοκρανιακής πίεσης, όπως κεφαλαλγία, ναυτία, έμετοι, ελαττωμένο επίπεδο συνείδησης και αυξημένη αρτηριακή πίεση. Ποσοστό 51-63% των ασθενών παρουσιάζουν μία σταδιακή και βραδεία εγκατάσταση της νευρολογικής συμπτωματολογίας και μόνο 34-38% έχουν εξαρχής τη μέγιστη ένταση των συμπτωμάτων, γεγονός που πιθανώς οφείλεται στη συνεχιζόμενη αιμορραγία και την αύξηση του μεγέθους του αιματώματος ή στην ανάπτυξη περιεστιακού οιδήματος. Συγκριτικά, μόνο το 5-20% των ισχαιμικών επεισοδίων και το 14-18% των υπαραχνοειδών αιμορραγιών παρουσιάζουν σταδιακή επιδείνωση των συμπτωμάτων.<sup>43</sup>

Η διαταραχή του επιπέδου συνείδησης είναι επίσης ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της κλινικής εικόνας του ενδοεγκεφαλικού αιματώματος. Είναι συνήθως αποτέλεσμα αυξημένης ενδοκρανιακής πίεσης ή άμεσης πίεσης του δικτυωτού σχηματισμού του θαλάμου ή του εγκεφαλικού στελέχους.<sup>44</sup> Το ποσοστό των ασθενών που παρουσιάζουν διαταραχή του επιπέδου συνείδησης κυμαίνεται από 50% ως 70% ανάλογα με τη μελέτη και χαρακτηριστικά παρατηρείται στα αιμορραγικά εγκεφαλικά επεισόδια, ενώ είναι ασυνήθιστο πρώιμο σημείο στα ισχαιμικά.<sup>2</sup> Εκτός από τη διαταραχή του επιπέδου συνείδησης, η αρχική εκδήλωση ενός ενδοεγκεφαλικού αιματώματος περιλαμβάνει και άλλα γενικά συμπτώματα. Η κεφαλαλγία είναι ένα σύμπτωμα που παρατηρείται στο 40% των ασθενών με αιμορραγία (σε σύγκριση με το 17% των ισχαιμιών) και αφορά κυρίως τις λοβαίες αιμορραγίες. Ειδικά, για τις αιμορραγίες του εγκεφαλικού στελέχους παρατηρείται χαρακτηριστική οπίσθια εντόπιση της κεφαλαλγίας. Ναυτία και έμετοι παρατηρούνται στο 49% των υπερσκηνιδίων αιματωμάτων (ξεπερνώντας τα παρατηρούμενα ποσοστά για έμφρακτο ή υπαραχνοειδή αιμορραγία στην ίδια περιοχή, που είναι 2% και 45%, αντίστοιχα), αλλά είναι χαρακτηριστικά και για

εγκεφαλικό επεισόδιο οποιουδήποτε τύπου στον οπίσθιο βόθρο.<sup>43</sup> Σπασμοί μπορεί επίσης να συμβούν είτε κατά τις αρχικές φάσεις του επεισοδίου (στις πρώτες 48 ώρες) είτε και αργότερα, το δε ποσοστό τους, που κυμαίνεται από 6% -7% ως και 15%<sup>43</sup> στο σύνολο των ενδοεγκεφαλικών αιματωμάτων, φαίνεται να φτάνει το 50% όσον αφορά στις λοβιαίες αιμορραγίες.<sup>14</sup> Εκτός, όμως, από την παραπάνω γενική συμπτωματολογία, ένα αυτόματο ενδοεγκεφαλικό αιμάτωμα ανάλογα με την εντόπιση και το μέγεθος του εκδηλώνεται και με μια συγκεκριμένη και χαρακτηριστική νευρολογική εικόνα. Στις αιμορραγίες του φακοειδούς πυρήνα κυριαρχούν κινητικά ελλείμματα και διαταραχές της αισθητικότητας. Οι αιμορραγίες του κερκοφόρου πυρήνα είναι συνήθως πιο «καλοήθειες» όσον αφορά στη συμπτωματολογία, συχνά όμως επεκτείνονται προς τις πλάγιες κοιλίες, προκαλώντας την ανάπτυξη υδροκεφαλίας. Η ειδική νευρολογική εικόνα των αιματωμάτων του θαλάμου περιλαμβάνει την ημιπάρεση, ελλείμματα αισθητικότητας, διαταραχές της οφθαλμοκινητικότητας και των κορών (που συνήθως οφείλονται είτε σε επέκταση στο εγκεφαλικό στέλεχος είτε σε υδροκεφαλία), δυσφασία, που χαρακτηρίζεται από διακύμανση, και παραφασία, αν έχει προσβληθεί το επικρατούν ημισφαίριο και αγνωσία, αν έχει προσβληθεί το μη επικρατούν ημισφαίριο. Επώδυνα θαλαμικά σύνδρομα και προσβολή της αισθητικότητας στο ένα ημιμόριο του σώματος, μπορεί επίσης να παρατηρηθούν.<sup>14</sup> Οι αιμορραγικές βλάβες της παρεγκεφαλίδας χαρακτηρίζονται από διαταραχές των κορών και της συζυγούς κίνησης των οφθαλμών, δυσαρθρία νυσταγμό και δυσμετρία, η δε κλασική τριάδα αταξία, ετερόπλευρη πάρεση των οφθαλμικών κινήσεων και περιφερική αδυναμία του προσωπικού νεύρου παρατηρείται συχνά. (Μάλιστα δύο από τα τρία αυτά συμπτώματα παρατηρούνται στο 75% των ασθενών). Τέλος, η προσβολή του εγκεφαλικού στελέχους περιλαμβάνει τα εξής συμπτώματα: διαταραχές της αναπνοής, του σφυγμού και της πίεσης του αίματος, υπερθερμία, κινητικές ανωμαλίες, που είναι συνήθως αμφοτερόπλευρες με χαρακτηριστικές στάσεις του σώματος και παράλυση, διαταραχές των κρνιακών νεύρων, που περιλαμβάνουν διαταραχές των κορών και της κινητικότητας των οφθαλμών, και δυσλειτουργία του αυτόνομου νευρικού συστήματος.

## Απεικόνιση

Αν και η κλινική εικόνα των αυτόματων ενδοεγκεφαλικών αιματωμάτων παρουσιάζει σημαντικές διαφορές με την αντίστοιχη εικόνα των ισχαιμικών επεισοδίων και των άλλων παθολογικών καταστάσεων του εγκεφαλικού παρεγχύματος, η διάγνωση του αιμορραγικού επεισοδίου δεν μπορεί να τεθεί με βεβαιότητα μόνο με τη λήψη ιστορικού και την αντικειμενική εξέταση. Απαραίτητος για τη διάγνωση είναι ο απεικονιστικός έλεγχος του εγκεφάλου, ο οποίος περιλαμβάνει την αξονική τομογραφία, το μαγνητικό συντονισμό και την ψηφιακή αγγειογραφία.

Η αξονική τομογραφία αποτελεί τη μέθοδο εκλογής για τη διάγνωση των αυτόματων ενδοεγκεφαλικών αιματωμάτων, με ευαισθησία της τάξης του 100%.<sup>9</sup> Πρόκειται για μία μέθοδο γρήγορη, αξιόπιστη, με ευρεία διαθεσιμότητα στα περισσότερα νοσοκομεία. Εκτός, όμως από τη διάκριση των αιμορραγικών από τα ισχαιμικά αγγειακά επεισόδια, σημαντική είναι η συμβολή της και στον προσδιορισμό της ακριβούς εντόπισης και του μεγέθους της αιμορραγίας καθώς και στην αποκάλυψη δομικών ανωμαλιών, όπως τα ανευρύσματα και οι αρτηριοφλεβώδεις δυσπλασίες, και δομικών επιπλοκών, όπως ο εγκολεασμός, η ενδοκοιλιακή αιμορραγία και η υδροκεφαλία. Η χορήγηση σκιαγραφικού μέσου μπορεί επιπλέον να αποκαλύψει αγγειακές ανωμαλίες, και ενδείκνυται σε ασθενείς < 40 ετών, χωρίς ιστορικό αρτηριακής υπέρτασης, με επιδείνωση της κλινικής εικόνας για πάνω από 4 ώρες, με ιστορικό νεοπλασίας, διαταραχής της πήξης, αγγειίτιδας ή βακτηριακής ενδοκαρδίτιδας, ή τέλος με παρουσία αίματος στον υπαραχνοειδή χώρο ή με ασυνήθη εντόπιση και εμφάνιση του θρόμβου. Τέλος, η αξονική τομογραφία μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντική για την πρόγνωση της αιμορραγικής βλάβης. Έχουν μάλιστα αναπτυχθεί συστήματα σταδιοποίησης των αιμορραγιών των βασικών γαγγλίων και του θαλάμου, βάσει της εικόνας της αξονικής τομογραφίας, που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της πρόγνωσής τους.<sup>14</sup>

Η εικόνα του αυτόματου ενδοεγκεφαλικού αιματώματος στην αξονική τομογραφία μεταβάλλεται ανάλογα με τη χρονική διάρκεια από την προσβολή. Η οξεία αιμορραγία χαρακτηρίζεται από αυξημένη πυκνότητα, η οποία οφείλεται στο πρωτεϊνικό τμήμα της αιμοσφαιρίνης. Η πυκνότητα του ολικού αίματος με αιματοκρίτη 45% είναι 56 (50-65) μονάδες Hounsfield (HU) και του εγκεφαλικού

φλοιού 37-40. Μερικές ώρες μετά την οξεία αιμορραγία, ο αιματοκρίτης υπολογίζεται γύρω στο 90%, ως αποτέλεσμα της συστολής του θρόμβου, που συνεχίζεται τις πρώτες ημέρες, με συνέπεια τη συνεχώς αυξανόμενη πυκνότητα του αιματώματος μέχρι την τρίτη ημέρα. ( 80-86 HU)<sup>19</sup> Εξαιρέση αποτελούν οι ασθενείς με σοβαρή αναιμία (αιματοκρίτης <20%), στους οποίους η αιμορραγική εστία είναι ισόπυκνη του εγκεφαλικού παρεγχύματος, όπως και οι ασθενείς με διαταραχή του πηκτικού μηχανισμού και κατ' επέκταση διαταραχή στο σχηματισμό και τη συστολή του θρόμβου. Συνήθως, γύρω από την υπέρπυκνη περιοχή της αιμορραγίας, υπάρχει μία άλως χαμηλής πυκνότητας, που αντανακλά το συνδυασμό οιδήματος και του ορού που εξέρχεται από το θρόμβο που συστέλλεται. Στις επόμενες ημέρες, η πυκνότητα του αιματώματος αρχίζει να ελαττώνεται, με ρυθμό 1,5 HU/ημέρα. Κατά την υποξεία φάση, παρατηρείται μία ελαφρώς ασαφής περιοχή, ενώ με τη σύγχρονη χορήγηση σκιαγραφικού μπορεί να παρατηρηθεί και ένας δακτύλιος με αυξημένη πρόσληψη γύρω από τη βλάβη, ενδεικτικό της διαταραχής του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και της διαρροής από τα νεοσχηματιζόμενα αγγεία.<sup>19</sup> Περίπου τρεις εβδομάδες από την αρχική προσβολή, το ενδοπαρεγχυματικό αιμάτωμα έχει πυκνότητα όμοια με αυτή του φυσιολογικού εγκεφαλικού ιστού, αλλά η απορρόφηση του αιματώματος και η αποκατάσταση του φαινομένου μάζας, καθυστερεί περισσότερο. Στην πρώιμη χρόνια φάση, το αιμάτωμα φαίνεται ως μια υπόπυκνη περιοχή, που δύσκολα προσδιορίζεται με σαφήνεια, ενώ μεταγενέστερα, ως μια περιοχή με πυκνότητα παρόμοια με αυτή του ENY και με τοπική απώλεια ιστού. Τελικά, σε ένα μικρό ποσοστό ασθενών παραμένουν περιοχές με κυστικά χαρακτηριστικά, ενώ σε ένα άλλο ποσοστό μπορεί να μην υπάρχουν καν εναπομένουσες εστίες βλάβης.

Ο μαγνητικός συντονισμός (μαγνητική τομογραφία) έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωση των αυτόματων ενδοεγκεφαλικών αιματωμάτων. Πρόκειται για μία μέθοδο που μπορεί να ανιχνεύσει το οξυ ενδοεγκεφαλικό αιμάτωμα όταν χρησιμοποιούνται T2 ακολουθίες παλμού όπως η Gradient Echo(GRE).<sup>45</sup> Μετά, πάντως, από την υπεροξεία και την οξεία φάση, η μαγνητική τομογραφία μπορεί όχι μόνο να καταδείξει το ενδοεγκεφαλικό αιμάτωμα αλλά και να προσδιορίσει την ηλικία του με μεγάλη ακρίβεια, με βάση κυρίως την εικόνα που δίνουν η αιμοσφαιρίνη και τα προϊόντα της αποδόμησης της. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα του μαγνητικού συντονισμού είναι ότι, με την εξαιρέση μικρών

ανευρυσμάτων και αγγειακών δυσπλασιών, μπορεί να ανιχνεύσει δομικές ανωμαλίες τόσο του εγκεφαλικού παρεγχύματος όσο και των αγγείων του και μάλιστα υπερτερεί ακόμα και της αγγειογραφίας στην περίπτωση των σπραγγωδών αγγειωμάτων. Επιπλέον, μπορεί να ανιχνεύσει παλιότερες αιμορραγίες ή πετεχειώδεις βλάβες του εγκεφαλικού παρεγχύματος, καταστάσεις που φαίνεται να παίζουν σημαντικό προγνωστικό ρόλο στους ασθενείς με αυτόματη ενδοεγκεφαλική αιμορραγία.



## Θεραπεία

Από τη στιγμή που θα αναπτυχθεί ένα αυτόματο ενδοεγκεφαλικό αιμάτωμα, οι διάφοροι θεραπευτικοί χειρισμοί έχουν ως σκοπό τον περιορισμό της πρωτογενούς και την πρόληψη της δευτερογενούς βλάβης. Η χειρισμοί αυτοί περιλαμβάνουν συντηρητικές και επεμβατικές παρεμβάσεις

**Αρχική αντιμετώπιση:** Το αυτόματο ενδοεγκεφαλικό αιμάτωμα είναι μια επείγουσα ιατρική κατάσταση. Αρχικά, όλες οι προσπάθειες στρέφονται προς τη διατήρηση των ζωτικών λειτουργιών του ασθενούς (αεροφόρος οδός, αναπνοή, κυκλοφορία) και την ανίχνευση εστιακών νευρολογικών ελλειμμάτων. Σημειώνεται ότι συχνά οι συνοδοί αναφέρουν πτώση στο έδαφος με διαταραχή του επιπέδου συνείδησης. Συνεπώς, επιπρόσθετη προσοχή πρέπει να δοθεί στην ανίχνευση σημείων δευτερογενούς κάκωσης, καθώς και στην αναζήτηση επιπλοκών, όπως πιεστικά έλκη, σύνδρομο διαμερίσματος και ραβδομύωση. Οι κατευθυντήριες οδηγίες του 2015 της αμερικανικής εταιρίας καρδιάς/εγκεφαλικών (AHA/ASA) συνιστούν αρχική νοσηλεία σε μονάδα εντατικής θεραπείας ή μονάδα εγκεφαλικών.<sup>46</sup>

**Αεραγωγοί και αερισμός:** Η προστασία των αεραγωγών και ο επαρκής αερισμός είναι υψίστης σημασίας. Ο μηχανικός αερισμός είναι απαραίτητος στους ασθενείς με ελαττωμένο επίπεδο συνείδησης ή σε ασθενείς των οποίων απειλείται η βατότητα των αεραγωγών. Περίπου 30% των ασθενών με υπερσκηνίδια αιμορραγία και σχεδόν όλοι οι ασθενείς με αιμορραγία του στελέχους ή της παρεγκεφαλίδας χρειάζονται μηχανική υποστήριξη της αναπνοής. Η απόφαση για τη διασωλήνωση πρέπει να καθοδηγείται από την πιθανότητα επικείμενης αναπνευστικής ανεπάρκειας και ενδείκνυται σε περιπτώσεις ανεπαρκούς αερισμού ( $pO_2 < 60 \text{ mmHg}$  ή  $pCO_2 > 50 \text{ mmHg}$ ) και σε εμφανή κίνδυνο εισρόφησης με ή χωρίς διαταραχή της αρτηριακής οξυγόνωσης.<sup>46</sup>

**Αναστροφή της αντιπηξίας:** Μεγάλη σημασία στην αντιμετώπιση του ασθενούς με αυτόματη ενδοεγκεφαλική αιμορραγία έχει η εκτίμηση της κατάστασης του πηκτικού μηχανισμού. Σε ασθενείς που βρίσκονται υπό αγωγή με αντιπηκτικούς ή θρομβολυτικούς παράγοντες απαιτείται η διακοπή της θεραπείας τους και πιθανώς η χορήγηση του κατάλληλου αναστολέα, για την πρόληψη της

επέκτασης της αιμορραγίας. Διαταραχές του αίματος, όπως η αναιμία και η θρομβοκυτοπενία πρέπει να αντιμετωπίζονται ανάλογα.

Αντιμετώπιση διαταραχών της αρτηριακής πίεσης: Ασθενείς με αυτόματο ενδοεγκεφαλικό αιμάτωμα συχνά εμφανίζονται με αυξημένη αρτηριακή πίεση, ακόμα και αυτοί που δεν έχουν ιστορικό προηγηθείσας αρτηριακής υπέρτασης. Η αύξηση αυτή της πίεσης είναι αποτέλεσμα είτε της μακροχρόνιας μη ελεγχόμενης υπέρτασης είτε δρα προστατευτικά ως απάντηση στο αιμάτωμα και την αυξημένη ενδοκρανιακή πίεση (φαινόμενο Cushing). Το ιδανικό επίπεδο αρτηριακής πίεσης βασίζεται σε ατομικούς παράγοντες, όπως τη χρόνια υπέρταση, την αυξημένη ενδοκρανιακή πίεση, την ηλικία, την πιθανή αιτία της αιμορραγίας και το χρονικό διάστημα από την προσβολή. Σκοπός της ελάττωσης της αρτηριακής πίεσης είναι η μείωση του κινδύνου συνέχισης της αιμορραγίας από τις ραγείσες μικρές αρτηρίες και τα αρτηριόλια. Η επιθετική, όμως, ελάττωση της πίεσης πρέπει να αποφεύγεται γιατί α) η ενδοκρανιακή πίεση αυξάνεται τοπικά ή σε ολόκληρο τον εγκέφαλο και η ελάττωση της αρτηριακής πίεσης μπορεί να ελαττώσει την CPP σε επίπεδα ισχαιμίας, β) οι μηχανισμοί αυτορρύθμισης στους χρόνιους υπερτασικούς έχουν μετακινήσει τις τιμές της αρτηριακής πίεσης σε υψηλότερα επίπεδα και η εγκεφαλική αιματική ροή μπορεί να μειωθεί σε φυσιολογικά επίπεδα πίεσης και γ) ασθενείς με αθηροσκληρυντική νόσο μπορεί να φέρουν τοπικές στενώσεις στα αγγεία τους, οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν σε κρίσιμη μείωση την αιματική ροή, αν η αρτηριακή πίεση είναι πολύ χαμηλή.<sup>27</sup> Σύμφωνα με τις προτάσεις των τρεχουσών κατευθυντήριων οδηγιών η συστολική αρτηριακή πίεση πρέπει να μειώνεται με στόχο τα 140 mmHg.<sup>46</sup>

Αντιμετώπιση της αυξημένης ICP: Με τον όρο αυξημένη ενδοκρανιακή πίεση εννοούμε ICP >20 mmHg για πάνω από 5 λεπτά. Ένας από τους σημαντικότερους στόχους της συντηρητικής θεραπείας ασθενών με αυτόματο ενδοεγκεφαλικό αιμάτωμα είναι η διατήρηση της ICP <20 mmHg και της CPP >70 mmHg. Ο προσδιορισμός της τιμής της ICP γίνεται με κάποια από τις μεθόδους (ενδοκοιλιακός ή ενδοπαραεγχυματικός καθετήρας) της επεμβατικής εγκεφαλικής παρακολούθησης (monitoring). Ένδειξη για την τοποθέτηση τέτοιων καθετήρων έχουν οι ασθενείς με αρχική GCS<8, ενδείξεις διασκηνιδιακού εγκολεασμού ή μεγάλης ενδοκοιλιακής αιμορραγίας.<sup>46</sup> Η αντιμετώπιση της ενδοκρανιακής υπέρτασης περιλαμβάνει: την ωσμωθεραπεία, τον υπεραερισμό τη καταστολή, τη

διατήρηση του προσκέφαλου σε ανοδική κλίση 30 μοιρών, τη χειρουργική εκκένωση και την αποσυμπιεστική καρανιεκτομία.

Η ωσμωθεραπεία αποτελεί ένα από τα πρώτα μέτρα κατά της αυξημένης ICP. Κύριος στόχος της μεθόδου είναι η δημιουργία ενός ωσμωτικού «πρανούς», με αποτέλεσμα τη μετακίνηση νερού από το εγκεφαλικό παρέγχυμα προς τον ενδαγγειακό χώρο. Για το σκοπό αυτό μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφοροι παράγοντες η μαννιτόλη, η φουροσεμίδη, η αλβουμίνη και τα υπέρτονα διαλύματα. Αρχικά, για την αύξηση της ωσμωτικότητας του ορού χρησιμοποιείται μαννιτόλη 20%, η δράση της οποίας είναι ταχύτατη. (παρατηρείται μείωση της ICP μέσα σε 30 λεπτά). Εκτός όμως από την αύξηση της ωσμωτικότητας του ορού, η μαννιτόλη βελτιώνει την αιματική ροή, πιθανώς μέσω ελάττωσης της γλοιότητας του αίματος. Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται κατά τη διακοπή της θεραπείας με μαννιτόλη, γιατί υπάρχει η πιθανότητα εκ νέου αύξησης της ICP, γεγονός που οφείλεται στην πρόωμη διακοπή της ουσίας. Παρόμοια δράση έχουν και τα διουρητικά της αγκύλης, όπως η φουροσεμίδη, και τα υπέρτονα διαλύματα. Στόχος της ωσμωτικής θεραπείας είναι σύμφωνα με τις οδηγίες η αύξηση της ωσμωτικότητας του αίματος στα 310-320 mosm/kg. Επειδή όμως μια τέτοια τιμή ωσμωτικότητας μπορεί να οδηγήσει σε ελάττωση του ενδαγγειακού όγκου, είναι απαραίτητη η χορήγηση ισότονων ή υπέρτονων διαλυμάτων, έτσι ώστε η κεντρική φλεβική πίεση να διατηρείται ίση περίπου με 10 mmHg. Ήπια υπερνατρίαμια είναι ανεκτή αλλά η σοβαρή υπερωσμωτικότητα θα πρέπει να αποφεύγεται κυρίως για την αποφυγή οξείας νεφρικής ανεπάρκειας.<sup>47</sup>

Ο υπεραερισμός είναι μια πολύ χρήσιμη μέθοδος για την ταχεία μείωση της ICP. Ο τρόπος με τον οποίο επιτυγχάνεται η ελάττωση της ICP είναι μέσω ελάττωσης της  $pCO_2$  και κατά συνέπεια αύξηση του pH του ENY. Οι μεταβολές αυτές έχουν ως αποτέλεσμα αγγειοσύσπαση και ελαττωμένη αιματική ροή. Για να επιτευχθεί ελάττωση της ICP, οι τιμές της  $pCO_2$  πρέπει να κυμαίνονται μεταξύ 30-35 mmHg, πράγμα που, με τη σειρά του, επιτυγχάνεται με αύξηση του κατά λεπτό αερισμού. Το αποτέλεσμα είναι μια μείωση της ICP κατά 25%-30%, στους περισσότερους ασθενείς, μέσα σε 30 περίπου λεπτά από την έναρξη του υπεραερισμού. Η δράση αυτή της υποκαπνίας είναι βραχυχρόνια. Εφόσον οι τιμές της ICP αποκατασταθούν σε φυσιολογικά επίπεδα, θα πρέπει να αρθεί ο υπεραερισμός λόγω των παρενεργειών που μπορεί να έχει, π.χ. αλκάλωση. Λόγω, όμως, του φαινομένου, η

επάνοδος της  $pCO_2$  σε φυσιολογικές τιμές πρέπει να γίνει σταδιακά, μέσα σε διάστημα 24-48 ωρών. Η προφυλακτική χρήση του υπεραερισμού δε συνιστάται. Εκτός από τις προαναφερθείσες θεραπευτικές δυνατότητες, μείωση της αυξημένης ICP, μπορεί να πραγματοποιηθεί και με τη χρήση ήπιας καταστολής και αναλγησίας η χρήση τους συνιστάται ειδικά στους διασωληνομένους ασθενείς.<sup>43</sup> Μικρή βοήθεια μπορεί επίσης να προσφέρει η ανύψωση του προσκέφαλου του ασθενούς κατά 30° και διατήρηση ουδέτερης στάσης του κορμού. Με τον τρόπο αυτό γίνεται μέγιστη η φλεβική επιστροφή και αποφεύγεται η στάση στις σφαγίτιδες.<sup>46</sup>

Τέλος, αν όλες οι προηγηθείσες προσπάθειες δεν αποδώσουν, είναι δυνατό να χορηγηθούν βαρβιτουρικά για την πρόκληση βαρβιτουρικού κώματος. Προτιμώνται κυρίως βαρβιτουρικά βραχείας δράσης, όπως η θειοπεντάλη. Ο κύριος μηχανισμός δράσης είναι η ελάττωση της αιματικής ροής και του κυκλοφορούντος όγκου αίματος.<sup>48</sup>

Η παρουσία ενδοκοιλιακού αίματος συχνά απαιτεί την άμεση παροχέτευση του, πράγμα που επιτυγχάνεται με την τοποθέτηση εξωτερικών καθετήρων για απλή παροχέτευση. Η ταυτόχρονη χορήγηση θρομβολυτικών παραγόντων ενδοκοιλιακά, αν και έχει παρουσιάσει ενθαρρυντικά αποτελέσματα δεν συνιστάται ακόμη ευρέως.<sup>48</sup>

Πρόληψη των επιληπτικών κρίσεων: Συνιστάται η προφυλακτική χορήγηση αντιεπιληπτικών φαρμάκων σε όλους τους ασθενείς που προσέρχονται στο τμήμα επειγόντων περιστατικών και εμφάνισαν τουλάχιστον ένα επεισόδιο σπασμών. Οι κυρίως χρησιμοποιούμενες ουσίες είναι η φαινυτοΐνη και το βαλπροϊκό νάτριο, με διάρκεια αγωγής 1 μήνα για τους ασθενείς που δεν εμφάνισαν άλλο επεισόδιο κατά τη διάρκεια της αγωγής.<sup>46</sup>

Υγρά και ηλεκτρολύτες: Κύριος σκοπός της θεραπείας είναι η ευογκαιμία. Για την αποφυγή της υπογκαιμίας και των συνεπειών της, πρέπει η κεντρική φλεβική πίεση να διατηρείται μεταξύ 5 και 12 mmHg ή η πίεση ενσφήνωσης στην πνευμονική αρτηρία μεταξύ 10 και 14 mmHg. Η ισορροπία μεταξύ χορηγούμενων και αποβαλλόμενων υγρών προσδιορίζεται με τον υπολογισμό της ημερήσιας διούρησης και της αδήλου αναπνοής. Οι ηλεκτρολύτες (κάλιο, νάτριο, ασβέστιο, μαγνήσιο) πρέπει να ελέγχονται συχνά και να ρυθμίζονται σύμφωνα με τις φυσιολογικές τους τιμές, όπως επίσης και η οξεοβασική ισορροπία.

Ρύθμιση της θερμοκρασίας του σώματος: Η διατήρηση της θερμοκρασίας του σώματος σε φυσιολογικές τιμές είναι επίσης ένας από τους στόχους της θεραπείας. Δεδομένου ότι η υψηλή θερμοκρασία του σώματος σχετίζεται με αυξήσεις της ICP, θεωρείται απαραίτητη η χορήγηση παρακεταμόλης και η επεμβατική ψύξη σε θερμοκρασίες >38,5° C. Σε όλους τους ασθενείς με πυρετό πρέπει να λαμβάνονται όλες οι απαραίτητες καλλιέργειες και να χορηγούνται αντιβιοτικά φάρμακα, εάν υπάρχει ένδειξη για κάτι τέτοιο. Η χρήση μέτριας υποθερμίας δεν έχει γίνει αποδεκτή προς το παρόν.<sup>46</sup>

Χειρουργική αντιμετώπιση: Σκοπός της χειρουργικής αντιμετώπισης ενός αυτόματου ενδοεγκεφαλικού αιματώματος είναι η απομάκρυνση όσο το δυνατόν μεγαλύτερου τμήματος του θρόμβου, στο μικρότερο δυνατό χρονικό διάστημα από το συμβάν και με το μικρότερο δυνατό τραυματισμό του εγκεφαλικού παρεγχύματος από την επέμβαση αυτή καθ' εαυτή. Επίσης, αν είναι δυνατόν θα πρέπει η επέμβαση να αφαιρεί την υποκείμενη αιτία του αιματώματος, όπως μια αρτηριοφλεβώδη δυσπλασία, και να προλαμβάνει την ανάπτυξη επιπλοκών, όπως η υδροκεφαλία.

Η απόφαση για την πραγματοποίηση ή όχι χειρουργικής επέμβασης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως το μέγεθος και η εντόπιση του αιματώματος, το χρονικό διάστημα από την εμφάνιση των συμπτωμάτων, η επιδείνωση της κλινικής εικόνας και η προεγχειρητική γενική κατάσταση του ασθενούς. Λόγω, όμως, της έλλειψης επαρκών τυχαιοποιημένων κλινικών δοκιμών και της έλλειψης σαφών κατευθυντήριων γραμμών, υπάρχει μεγάλη ποικιλομορφία ως προς την αντιμετώπιση μιας ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας, σε παγκόσμιο επίπεδο. Τα ποσοστά χειρουργικής επέμβασης κυμαίνονται από 3% στην Ουγγαρία μέχρι 90% στη Λιθουανία.

Οι χειρουργικές επεμβάσεις που μπορούν να πραγματοποιηθούν στην περίπτωση ενός ενδοεγκεφαλικού αιματώματος είναι η κраниοτομία, η κраниεκτομία, η απλή αναρρόφηση, η στερεοτακτική αναρρόφηση με βελόνη και η στερεοτακτική, ενδοσκοπική αναρρόφηση. Εκτός από την απλή αναρρόφηση που έχει ήδη εγκαταλειφθεί από το 1950, επειδή δεν είχε καλά αποτελέσματα, οι υπόλοιπες τεχνικές χρησιμοποιούνται σήμερα. Η εκκένωση του αιματώματος πραγματοποιείται ως θεραπεία διάσωσης. Η αποσυμπιεστική κраниεκτομία με ή χωρίς την εκκένωση του αιματώματος μπορεί να έχει ευνοϊκά αποτελέσματα σε

μεγάλο μέγεθος αιματώματος με παρεκτόπιση της μέσης γραμμής με διαταραχή του επιπέδου συνείδησης που δεν ανταποκρίνονται στη συντηρητική θεραπεία.<sup>46</sup>

Ασθενείς με παρεγκεφαλιδική αιμορραγία, που επιδεινώνονται νευρολογικά ή που έχουν συμπτωματολογία πίεσης του στελέχους ή υδροκεφαλία λόγω απόφραξης στο κοιλιακό σύστημα, πρέπει να υποβληθούν σε επέμβαση αφαίρεσης του αιματώματος το συντομότερο δυνατό.<sup>46</sup>

Στην προσπάθεια για ελαχιστοποίηση των δυσμενών επιδράσεων της ανοιχτής επέμβασης, άρχισαν να χρησιμοποιούνται οι τεχνικές της στερεοτακτικής παροχέτευσης. Τα κυριότερα πλεονεκτήματα των νεότερων αυτών μεθόδων είναι ο μικρότερος χρόνος επέμβασης, η δυνατότητα χρήσης τοπικής αναισθησίας, ελαττωμένη χειρουργική νοσηρότητα, δυνατότητα προσέγγισης σε περιοχές του εγκεφαλικού παρεγχύματος, που είναι απρόσιτες με τις κλασσικές εγχειρητικές μεθόδους και η δυνατότητα ελέγχου της ποσότητας του θρόμβου που παροχετεύεται και των πιθανών επιπλοκών. Εκτός από την αδυναμία της στερεοτακτικής μεθόδου να αντιμετωπίσει και την υποκείμενη δομική βλάβη, όπως μια δυσπλασία, που είναι και το σημαντικότερο μειονέκτημά της, η συχνότητα των επιπλοκών της είναι σχετικά μικρή. επιχειρήθηκε επίσης η χορήγηση με τη βοήθεια καθετήρων, διάφορων ινωδολυτικών παραγόντων, όπως της ουροκινάσης και του (rtPA-ενεργοποιητή του πλασμινογόνου), τόσο μέσα στον όγκο της ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας όσο και ενδοκοιλιακά. Η αποτελεσματικότητα αυτών των μεθόδων δεν έχει εδραιωθεί.<sup>49</sup>

## Κλινική Πορεία-Πρόγνωση

Μετά τη δημιουργία και αρχική εκδήλωση του αυτόματου ενδοεγκεφαλικού αιματώματος, η κλινική εικόνα του ασθενούς που υπέστη την προσβολή μπορεί να παρουσιάσει βελτίωση ή επιδείνωση. Για την επιδείνωση της κλινικής πορείας έχουν ενοχοποιηθεί, όπως έχει ήδη αναφερθεί, η αύξηση μεγέθους του αιματώματος, η ανάπτυξη οιδήματος και η εμφάνιση επιπλοκών.

Η αύξηση του μεγέθους του αιματώματος είναι ένα αρκετά συνηθισμένο φαινόμενο, που αφορά στο 14-14,3% των περιπτώσεων και το οποίο παρατηρείται κυρίως σε άνδρες. Οι κύριοι προγνωστικοί παράγοντες της αύξησης του αιματώματος είναι: α) η μικρή χρονική διάρκεια μεταξύ της προσβολής και της διάγνωσης, πιθανώς λόγω της συνέχισης αιμορραγίας κατά τις πρώτες ώρες μετά την προσβολή, β) η καθ' έξιν χρήση αλκοολούχων ποτών, μέσω της διαταραχής της ηπατικής λειτουργίας και κατ' επέκταση του ηπαιδικού μηχανισμού, γ) το ακανόνιστο σχήμα του αιματώματος στην αρχική αξονική τομογραφία, δ) το εξ' αρχής μεγάλο μέγεθος του αιματώματος, ε) η διαταραχή του επιπέδου συνείδησης κατά την προσαγωγή του ασθενούς και στ) τα χαμηλά επίπεδα ινωδογόνου του αίματος.<sup>50</sup> Μία μελέτη σε 183 ασθενείς με ενδοπαρεγχυματική αιμορραγία κατέδειξε ως πιθανό προγνωστικό δείκτη για την αύξηση του μεγέθους του αιματώματος και την παρουσία φλεγμονώδους αντίδρασης, προσδιοριζόμενη από τα αυξημένα επίπεδα ουσιών όπως η IL-6, η μεταλλοπρωτεϊνάσες (κυρίως MMP-9), ο TNF-α και η κυτταρική ινονεκτίνη (c-Fn) στο αίμα αυτών των ασθενών.<sup>51</sup>

Η ανάπτυξη οιδήματος γύρω από το σχηματιζόμενο θρόμβο, όπως ήδη αναφέρθηκε, είναι ένα από τα σημαντικότερα γεγονότα, που σχετίζονται με τη δευτερογενή βλάβη του εγκεφαλικού παρεγχύματος. Ο σχηματισμός οιδήματος φαίνεται να εξαρτάται από το μέγεθος και την εντόπισή του θρόμβου, μπορεί μάλιστα μερικές φορές ο όγκος του οιδήματος να είναι μεγαλύτερος από τον όγκο του ίδιου του αιματώματος. Η ανάπτυξη οιδήματος σχετίζεται με την επιδείνωση του ασθενούς (24-48 ώρες μετά την αιμορραγία), φαίνεται δε να αποτελεί το σημαντικότερο αν όχι το μοναδικό παράγοντα που ευθύνεται γι' αυτό στην περίπτωση μιας όψιμης επιδείνωσης (2<sup>η</sup>-3<sup>η</sup> εβδομάδα από την προσβολή).

Από τους ασθενείς με αυτόματο ενδοεγκεφαλικό αιμάτωμα ένα πολύ μεγάλο ποσοστό που μπορεί να φτάσει το 66% τελικά δεν επιζεί και στο 1/3 των ασθενών παραμένει μια σοβαρή αναπηρία.<sup>52</sup> Διάφορες παράμετροι που σχετίζονται με τον ασθενή ή με το αιμάτωμα αυτό καθ' εαυτό φαίνεται να έχουν προγνωστική αξία, καταδεικνύοντας τους ασθενείς με αυξημένο κίνδυνο θανάτου. Προγνωστικοί δείκτες θνητότητας στις 30 ημέρες μετά την προσβολή είναι: α) το επίπεδο συνείδησης κατά την προσαγωγή του ασθενούς, β) το μέγεθος του αιματώματος > 30 -60cm, γ) το ιστορικό προηγηθείσας καρδιακής νόσου και δ) η παρουσία ενδοκοιλιακής επέκτασης της αιμορραγίας. (Μάλιστα, θεωρείται ότι όγκος αίματος μέσα στις κοιλίες ίσος με 20cc θεωρείται «θανατηφόρος».)<sup>54,55</sup> Από τις προαναφερθείσες αυτές παραμέτρους τη μεγαλύτερη συσχέτιση με τη θνητότητα στις πρώτες 30 ημέρες έχουν το αρχικό επίπεδο συνείδησης και το μέγεθος του αιματώματος. Ασθενείς με αρχική Κλίμακα Κώματος Γλασκώβης (GCS) <9 και όγκο αιματώματος >60 cm<sup>3</sup>, είχαν 90% θνητότητα τον πρώτο μήνα, ενώ ασθενείς με GCS>9 και όγκο αιματώματος <30cm<sup>3</sup>, είχαν θνητότητα 17%. Όσον αφορά στη θνητότητα στους 6 μήνες, το αρχικό επίπεδο συνείδησης και ο όγκος του αιματώματος εξακολουθούν να έχουν προγνωστική αξία, φαίνεται όμως πως ιδιαίτερη σημασία αποκτά και η ηλικία του ασθενούς. Έτσι, ηλικία >65 ετών είναι ένας εξίσου σημαντικός προγνωστικός παράγοντας. Τέλος, προγνωστικοί δείκτες θνητότητας κατά τη διάρκεια ενός έτους από την αιμορραγία είναι: α) το επίπεδο συνείδησης κατά την προσαγωγή του ασθενούς, β) η ηλικία >75-80 ετών, γ) η εντόπιση του αιματώματος (οι αιμορραγίες του στελέχους έχουν τη μεγαλύτερη θνητότητα, που μπορεί να φτάνει το 80%, ενώ τη μικρότερη θνητότητα έχουν οι λοβαίες αιμορραγίες και οι αιμορραγίες της παρεγκεφαλίδας), δ) η ενδοκοιλιακή επέκταση της αιμορραγίας, ε) η χειρουργική αντιμετώπιση του αιματώματος, (αν και αυτό μπορεί να επηρεάζεται από τις ενδείξεις για τη χειρουργική επέμβαση) και στ) η αρτηριακή υπέρταση, ως μοναδική αιτιολογία της αιμορραγίας.<sup>55</sup>

Από τους επιζώντες από ένα αυτόματο ενδοεγκεφαλικό αιμάτωμα, ένα σημαντικό ποσοστό παρουσιάζει τελικά κάποια μορφή αναπηρίας. Μάλιστα, το ποσοστό αυτό μπορεί να φτάνει το 52%, σε διάστημα ενός εξαμήνου από την αρχική προσβολή. Η αναπηρία αυτή αφορά σε διάφορους τομείς, όπως η κινητικότητα, η φυσική ανεξαρτησία (ανεξαρτησία στην καθημερινή δραστηριότητα, η ικανότητα προσανατολισμού, η επανένταξη στο κοινωνικό



σύνολο, η ικανότητα επαγγελματικής επανένταξης και ενασχόλησης με διάφορες δραστηριότητες αναψυχής και η οικονομική επάρκεια). Ο σημαντικότερος βαθμός, όμως, αναπηρίας παρατηρείται στους τομείς της καθημερινής ανεξαρτησίας και της επαγγελματικής επανένταξης. Οι παράμετροι που φαίνεται ότι μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες για τους ασθενείς με αυτόματο ενδοεγκεφαλικό αιμάτωμα, όσον αφορά στην αναπηρία τους είναι: α) η μεγάλη ηλικία, β) το επίπεδο συνείδησης του ασθενούς κατά την προσαγωγή του, γ) ο όγκος του αιματώματος, δ) η ενδοκοιλιακή αιμορραγία, ε) η κατανάλωση αλκοολούχων ποτών (γραμμάρια /εβδομάδα),στ) η παρουσία υποσκληριδίου αιματώματος ή παρεγκεφαλιδικής αιμορραγίας (αντίστροφα), ζ) η εν τω βάθει εντόπιση της αιμορραγίας και η) η προ της προσβολής κατάσταση του ασθενούς.<sup>54</sup>

Τέλος, ιδιαίτερα σημαντικό είναι το γεγονός ότι οι επιζώντες από ένα αυτόματο ενδοεγκεφαλικό αιμάτωμα εμφανίζουν αυξημένο ρυθμό επαναιμορραγίας ή ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου. Ο ετήσιος ρυθμός επαναιμορραγίας και ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου είναι 2,4% και 3%, αντίστοιχα, με τάση μείωσης με την πάροδο του χρόνου. Ο συνολικός κίνδυνος ενός νέου αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου είναι 10 ανά 100 ασθενείς-έτη.<sup>56</sup>

## Γενετικές μελέτες σε ασθενείς με ενδοεγκεφαλική αιμορραγία

Το γονιδίωμα του ανθρώπου αποτελείται από 23 ζεύγη χρωμοσωμάτων. Το DNA των χρωμοσωμάτων αυτών περιέχει περίπου 6 δισεκατομμύρια ζεύγη βάσεων. Το γονιδίωμα περιλαμβάνει εξόνια (Exon) που αποτελεί το 1,5% του συνόλου και εσόνια (Intron). Στα εξόνια περιλαμβάνονται περίπου 25 χιλιάδες γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση 100 χιλιάδων πρωτεϊνών στους ανθρώπους.<sup>60</sup>

### Γενετική διαφοροποίηση

Η Γενετική διαφοροποίηση στους ανθρώπους είναι το αποτέλεσμα πολλών διεργασιών.

Μπορεί να είναι αλλαγή στο DNA του γονιδιώματος αλλά και επιγενετικοί παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση των γονιδίων μέσω της μεθυλίωσης ή μέσω της τροποποίησης πρωτεϊνών όπως οι ιστόνες. Οι αλλαγές μπορεί να είναι από μικροσκοπικές (που παρατηρούνται στην μικροσκοπική εξέταση των χρωμοσωμάτων) και υπομικροσκοπικές. Οι μικρότερες μοριακές αλλαγές μπορούν να αφορούν στην μεταβολή ενός και μόνο ζεύγους νουκλεοτιδίων και ονομάζονται σημειακοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί [Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)]. Έχουν περιγράψει μέχρι στιγμής περίπου 80 εκατομμύρια SNP από τα διεθνή προγράμματα που βρίσκονται σε εξέλιξη, ένα μικρό ποσοστό δηλαδή στο σύνολο του ανθρώπινου γονιδιώματος. Η σύγχρονη κλινική μοριακή έρευνα εστιάζει ιδιαίτερα στα SNP, θα πρέπει όμως κανείς να έχει υπόψη και άλλα αίτια γενετικής διαφοροποίησης.<sup>61</sup>

Μία γενετική διαφοροποίηση μπορεί να έχει από μηδαμινή έως ισχυρή φαινοτυπική επίπτωση. Σε πολλές περιπτώσεις μπορεί να συμμετέχει σε μια φαινοτυπική εκδήλωση (νόσο) με πολύπλοκη κληρονομικότητα και σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες ή γενετικές διαφοροποιήσεις.

Πριν από 2 δεκαετίες οι μοριακές γενετικές μελέτες ήταν κυρίως μελέτες σύνδεσης τις οποίες ακλούθησαν οι μελέτες συσχέτισης υποψήφιων γονιδίων (candidate gene association studies, CGAS). Η θεωρία πίσω από αυτές τις μελέτες υποστηρίζει ότι μπορεί να τεθεί η υποψία για το ρόλο ενός γονιδίου στην εμφάνιση

μιας νόσου, βάση της προϋπάρχουσας γνώσης. Για τη μελέτη του γονιδίου χρησιμοποιούνται συνήθως συγκεκριμένα SNP της περιοχής του γονιδιώματος που το αφορά.

Την τελευταία δεκαετία εκτελούνται μελέτες στη κλίμακα του συνολικού γονιδιώματος (genome wide association studies GWAS). Σε αυτές, η προσέγγιση είναι αγνωστική και εξετάζονται SNP τις τάξης των εκατομμυρίων και αναγνωρίζονται αυτά που μπορεί να συσχετίζονται με την εμφάνιση ενός χαρακτηριστικού ή νόσου. Επειδή εξετάζεται ταυτόχρονα μεγάλος αριθμός SNP γίνεται προσαρμογή για πολλαπλές δοκιμασίες και συνήθως τίθεται όριο επίπεδου σημαντικότητας σε τιμές  $p < 5 \times 10^{-8}$ .<sup>63</sup>

### **Γενετικοί προγνωστικοί δείκτες**

Την τελευταία δεκαετία ερευνάται η ύπαρξη προγνωστικών για τη βαρύτητα και την έκβαση των ενδοεγκεφαλικών αιμορραγιών, γενετικών δεικτών. Η APO E ε2 μετάλλαξη που έχει μελετηθεί περισσότερο, φαίνεται να συμβάλει σε μεγαλύτερα αρχικά αιματώματα και υψηλότερη θνητότητα. Αλλά πιθανά γονίδια στόχοι της έρευνας αυτής φαίνεται να είναι τα γονίδια της Aquaporin 4, των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs), της IL-6, της κυτταρικής ινονεκτίνης (c-Fn), του TNF, του παράγοντα XIII, και πολλών άλλων.<sup>30, 31, 32, 33, 35, 36, 40, 57, 58, 59</sup>

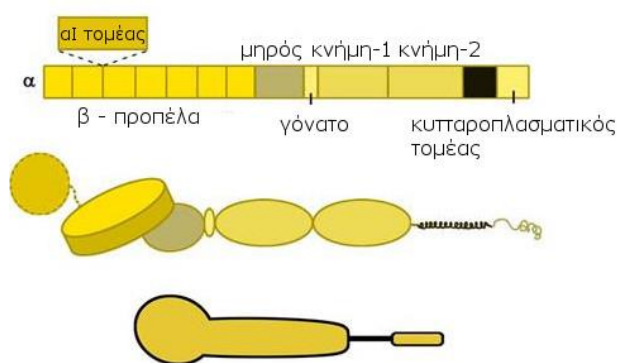
## Οι ιντεγκρίνες

Οι ιντεγκρίνες είναι πρωτεΐνες που λειτουργούν μηχανικά, με την προσάρτηση του κυτταρικού σκελετού στην εξωκυττάρια μήτρα (ECM), και βιοχημικά, ανιχνεύοντας εάν έχει επιτευχθεί η προσκόλληση. Η οικογένεια των πρωτεϊνών αυτών αποτελείται από άλφα και βήτα υποτύπους, οι οποίες σχηματίζουν διαμεμβρανικά ετεροδιμερή. Λειτουργούν ως υποδοχείς προσκόλλησης (adhesion receptors) για εξωκυτταρικούς συζευκτές (ligands) και μεταγουν βιοχημικά σήματα μέσα στο κύτταρο, μέσω πρωτεϊνικών τελεστών στην απόληξή τους. Αξίζει να σημειωθεί ότι, λειτουργούν αμφίδρομα, που σημαίνει ότι μπορούν να μεταδίδουν πληροφορίες τόσο προς τα εντός, όσο και προς τα εκτός του κυττάρου.<sup>64</sup>

### Δομή

Κάθε ετεροδιμερές ιντεγκρίνης αποτελείται από μια άλφα (α) και μια βήτα (β) υπομονάδα που συνδέονται με μη ομοιοπολικούς δεσμούς μεταξύ τους, σχηματίζοντας μια εξωκυττάρια κεφαλή σύνδεσης, δύο πόδια που αποτελούνται από πολλαπλούς τομείς, δύο διαμεμβρανικές έλικες μονής διέλευσης και δύο βραχείες κυτταροπλασματικές ουρές. Οι ομάδες α και β δεν δείχνουν κάποια ομολογία μεταξύ τους.

Το πόδι της α υπομονάδας αποτελείται από έναν τομέα που ονομάζεται μηρός και 2 τομείς που ονομάζονται κνήμες. Αυτοί υποστηρίζουν την κεφαλή σύνδεσης που σχηματίζεται από έναν τομέα β-έλικας με 7 επαναλήψεις που σχηματίζουν τα πτερύγια. Μερικοί από τους τομείς των λεπίδων περιέχουν EF-hand πεδία σύνδεσης ασβεστίου στην κάτω πλευρά τους. Αυτά

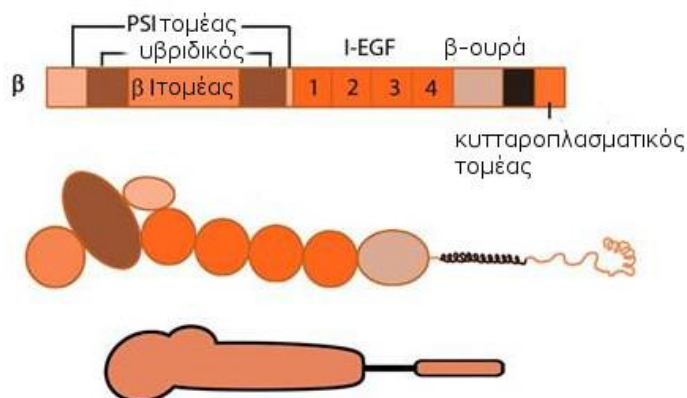


Εικόνα. Αλυσίδα άλφα ιντεγκρίνης:  
Κορυφή: Γραμμική τοποθέτηση των τομέων.  
Μέση: Η σφαιρική δομή.  
Κάτω: απλοποιημένη εκδοχή της υπομονάδας της ιντεγκρίνης α.  
Ο τομέας αΙ είναι παρόν σε ορισμένες υποτύπους της υπομονάδας α.

(Προσαρμοσμένη από: [www.mechanobio.info](http://www.mechanobio.info),  
Άδεια: Creative Commons Attribution-NonCommercial  
4.0 International License)

επηρεάζουν αλλοστερικά τις συνδέσεις με τα συζευκτικά μόρια. Μία πρόσθετη περιοχή αΙ (interactive) που περιέχει περίπου 200 αμινοξέα είναι παρούσα σε ορισμένες υπομονάδες α των σπονδυλωτών και σε εννέα ανθρώπινους υπότυπους μεταξύ των επαναλήψεων της έλικας 2 και 3. Αυτή περιέχει μια θέση σύνδεσης, εξαρτώμενη από ιόντα μετάλλου (MIDAS), η οποία είναι σημαντική για τη σύνδεση με συζευκτικά μόρια της ιντεγκρίνης.<sup>65</sup>

Η υπομονάδα β αποτελείται από 4 πλούσιες σε κυστεΐνη επαναλήψεις του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF), έναν υβριδικό τομέα (split in sequence), έναν I



Εικόνα. Αλυσίδα βήτα ιντεγκρίνης:  
 Κορυφή: Γραμμική τοποθέτηση των τομέων.  
 Μέση: Η σφαιρική δομή.  
 Κάτω: απλοποιημένη εκδοχή της υπομονάδας της ιντεγκρίνης β.  
 (Προσαρμοσμένη από: [www.mechanobio.info](http://www.mechanobio.info),  
 Άδεια: Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License)

(interactive) τομέα, τον βI και έναν τομέα πλεξίνης-σεμαφορίνης-ιντεγκρίνης (PSI). Παρόμοια με τον αI, η βI περιοχή περιέχει μία θέση MIDAS για σύνδεση με συζευκτικά μόρια που ενεργοποιείται με  $Mn^{+2}$  και μια πρόσθετη ρυθμιστική περιοχή "δίπλα στο MIDAS» ή ADMIDAS, που αναστέλλεται από  $Ca^{+2}$ .<sup>66</sup>

### Προσκόλληση

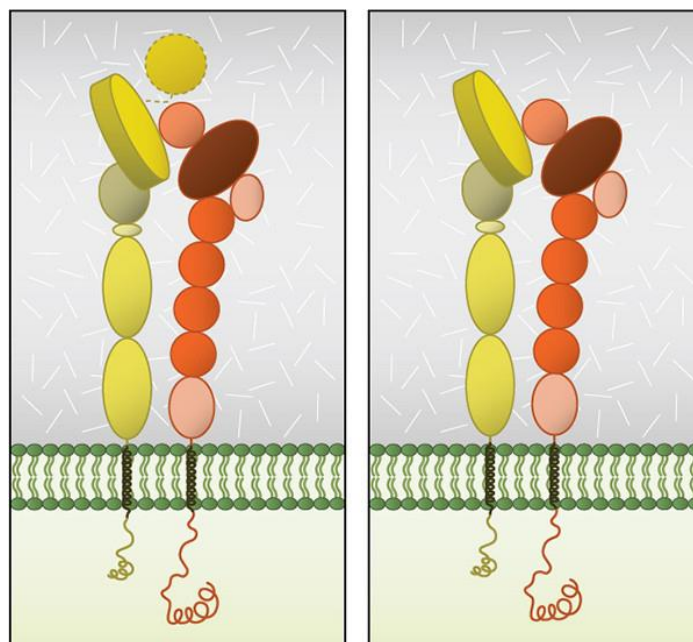
Το σημείο πρόσδεσης των ιντεγκρινών με τα διάφορα συζευκτικά μόρια σχηματίζεται στη συμβολή του β-έλικα της α υπομονάδας με τον βI τομέα της υπομονάδας β, με την αλυσίδα α να είναι κεντρική για τον προσδιορισμό ειδικότητας στην προσκόλληση. Οι ιντεγκρίνες που φέρουν περιοχή αΙ συνδέονται μέσω της περιοχής αυτής, επηρεάζοντας παράλληλα και τη διαμόρφωση της β υπομονάδας.<sup>67</sup> Στα μόρια πρόσδεσης των ιντεγκρινών περιλαμβάνονται η ινονεκτίνη, η βιτρονεκτίνη, τα κολλαγόνα και η λαμινίνη.

## Διμερισμός

Ο διμερισμός των ιντεγκρινών λαμβάνει χώρα εντός του κυτταρόπλασματος, μέσω της επιφάνειας της β-έλικας στην αλυσίδα α και την υβριδική περιοχή της αλυσίδας β<sup>68</sup>. Οι αλληλουχίες σε αυτές τις αλληλεπιδρούσες

επιφάνειες φαίνεται να ελέγχουν την επιλογή αλυσίδας. Τα διμερή σταθεροποιούνται και

παραμένουν αδρανή με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και ηλεκτροστατικούς δεσμούς άλατος στην έξω και έσω επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης αντίστοιχα<sup>69</sup>.



Εικόνα. Δομή του διμερούς ιντεγκρίνης:  
Το σημείο πρόσδεσης σχηματίζεται στη συμβολή του β-έλικας της α υπομονάδας, με τον β1 τομέα της υπομονάδας β. Οι ιντεγκρίνες που φέρουν περιοχή α1 συνδέονται μέσω της περιοχής αυτής.  
(Προσαρμοσμένη από: [www.mechanobio.info](http://www.mechanobio.info), Άδεια: Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License)

## Αλληλεπιδράσεις

Οι ιντεγκρίνες λειτουργούν ως διαμεμβρανικοί συνδετήρες, μεσολαβώντας στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυτταροσκελετού και εξωκυττάριας μήτρας προκειμένου τα κύτταρα να προσδεθούν στον εξωκυττάριο πλέγμα. Οι περισσότερες ιντεγκρίνες συνδέονται ενδοκυτταρικά με δεσμίδες νηματίων ακτίνης. Μετά την σύνδεση μιας τυπικής ιντεγκρίνης στο συνδετικό της μόριο της εξωκυττάριας μήτρας, η κυτταροπλασματική ουρά της υπομονάδας β μπορεί να συνδέθει με διάφορες ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες άγκυρωσης (anchor proteins). Αυτές οι πρωτεΐνες μπορούν να προσκολλώνται απευθείας στην ακτίνη ή διαμέσου άλλων πρωτεϊνών άγκυρωσης όπως η βινκουλίνη, συνδέοντας έτσι την ιντεγκρίνη με τα νημάτια ακτίνης στο κυτταρικό φλοιό. Υπό κατάλληλες συνθήκες, αυτή η σύνδεση οδηγεί σε μια ομαδοποίηση των ιντεγκρινών και τον σχηματισμό συμφύσεων μεταξύ κυττάρων και της εξωκυττάριας μήτρας, όπως συζητήθηκε νωρίτερα.<sup>70</sup>

Ειδικότερα οι πρωτεϊνικοί προσαρμογείς που συνδέονται με τις κυτταροπλασματικές περιοχές των ιντεγκρίνων περιλαμβάνουν :

*Διαρθρωτικοί προσαρμογείς (Structural adaptors)*. (π.χ. ταλίνη, τενσίνη) που παρέχουν σύνδεση των ιντεγκρινών απευθείας στον κυτταροσκελετό. Προσαρμογείς κριωμάτων (Scaffolding adaptors) (π.χ. παξιλλίνη, kindlin) που σχηματίζουν γέφυρες μεταξύ των πρωτεϊνών άγκυρωσης.

*Καταλυτικοί προσαρμογείς (Catalytic adaptors)*. Όπως η κινάση εστιακής προσκόλλησης (focal adhesion kinase – FAK), integrin-linked kinase, Src, που διαβιβάζουν σήματα από τις περιοχές συγκόλλησης. Οι αλληλεπιδράσεις μέσω της α-ουράς δεν έχουν πλήρως ταυτοποιηθεί λόγω μεταβλητότητας στην αλληλουχία, ωστόσο, η α-ουρά εμπλέκεται στην ειδική, κατά κυτταρικό τύπο, ενεργοποίηση των ιντεγκρινών μέσω σύνδεσης με πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη σηματοδότηση.<sup>71</sup> Ο βαθμός φωσφορυλίωσης των κυτταροπλασματικών περιοχών διαμορφώνουν τον ανταγωνισμό μεταξύ των διαφόρων προσαρμογέων για σύνδεση και επομένως τις μετέπειτα αλληλεπιδράσεις των ιντεγκρινών με τον κυτταροσκελετό.<sup>72</sup>

### **Ειδικότητα στην πρόσδεση των ιντεγκρινών**

Οι άνθρωποι έχουν τουλάχιστον 18 α υποτύπους και 8 β υποτύπους που παράγουν από κοινού 24 γνωστά ζεύγη ετεροδιμερων ιντεγκρινών.<sup>73</sup> Η α υπομονάδα του ετεροδιμερούς της ιντεγκρίνης και ειδικά ο τομέας α1 καθορίζει την ειδικότητα στη σύνδεση του κυττάρου με την εξωκυττάρια μήτρα. Το χαρακτηριστικό των ιντεγκρινών είναι η ικανότητά τους να δεσμεύουν ποικίλα συνδεδετικά μόρια της εξωκυτταρικής μήτρας που τους προσδίδεται από την ετερογένεια των μονομερών που τις απαρτίζουν.

Η αλληλουχία αμινοξέων: αργινίνη-γλυκίνη-ασπαρτικό οξύ, ή αλλιώς RGD μοτίβο, είναι κοινώς αποδεκτό ως το γενικό πρότυπο μοτίβο σύνδεσης των ιντεγκρινών επί των συνδεδετικών μορίων και επαρκώς μελετημένο. Ωστόσο, συγκεκριμένες ιντεγκρίνες μπορούν επίσης να αναγνωρίσουν άλλα πρωτεϊνικά μοτίβα.<sup>72,73</sup>

Συνήθη συστατικά της εξωκυτταρικής μήτρας στα οποία προσκολλώνται οι ιντεγκρίνες (με την αντίστοιχη αλληλουχία αναγνώρισης) είναι τα εξής:

Ινονεκτίνη (Fibronectin) (RGD, LDV), Κολλαγόνο (τριπλή έλικα GFOGER), Λαμινίνη (Laminin) (RGD), Ινωδογόνο (RGD), Θρομβοσπονδίνη (Thrombospondin), Γλυκοπρωτεϊνες (π.χ. tenascin C, osteopontin, nefronectin)

Ανοσολογικά σημαντικά συνδετικά ιντεγκρίνης είναι τα διακυτταρικά μόρια προσκόλλησης (inter-cellular adhesion molecules - ICAMs), που ανήκουν στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών και παράγονται από το φλεγμένον ενδοθήλιο και τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα.

Οι ιντεγκρίνες χωρίζονται συνήθως σε 4 γενικές κατηγορίες σε σχέση με την ειδικότητα τους ως προς τα συνδετικά μόρια:<sup>74</sup>

1. Υποδοχείς RGD ( $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha V\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 5$ ,  $\alpha V\beta 6$ ,  $\alpha V\beta 8$ , and  $\alpha IIb\beta 3$ )
2. Υποδοχείς λαμινίνης ( $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$ ,  $\alpha 7\beta 1$ , and  $\alpha 6\beta 4$ )
3. Υποδοχείς λευκοκυτταρων ( $\alpha L\beta 2$ ,  $\alpha M\beta 2$ ,  $\alpha X\beta 2$ , and  $\alpha D\beta 2$ )
4. Υποδοχείς κολλαγόνου ( $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 10\beta 1$ , and  $\alpha 11\beta 1$ )

#### **Εντοπισμός των ιντεγκρινών**

Οι  $\beta$  υπομονάδες εμφανίζουν γενικά υψηλή συγκέντρωση, ενώ οι  $\alpha$  υπομονάδες είναι ο παράγοντας περιορισμού της ποσότητας ετεροδιμερών που εντοπίζονται επί της μεμβράνης.<sup>75</sup>

Οι ιντεγκρίνες απαντώνται σε εξειδικευμένες συμφύσεις μεταξύ κυττάρων και στις περισσότερες συμφύσεις μεταξύ εξωκυττάριας μήτρας και των στατικών κυττάρων. Απαντώνται επίσης σε δομές που σχετίζονται με την κινητικότητα των κυττάρων (όπως filopodia, lamellipodia, podosomes). Ενώ η υποοικογένεια  $\beta 1$  βρίσκεται συνήθως σε μια ευρεία ποικιλία κυττάρων, ορισμένες ιντεγκρίνες περιορίζονται σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων ή ιστών.<sup>73</sup>

#### **Η λειτουργία των ιντεγκρινών ως μεταγωγείς σημάτων**

Για να μπορέσουν οι προσκολλημένες ιντεγκρίνες να λειτουργήσουν ως αμφίδρομοι μεταγωγείς σήματος:

1. Οι ιντεγκρίνες υποβάλλονται σε μια διαδικασία που ονομάζεται ενεργοποίηση, κατά την οποία αλλαγές στη διαμόρφωσή τους εκθέτουν το τεμάχιο



κεφαλής (βι και υβριδικό τομέα) για δέσμευση με τον συζευκτή τους.<sup>76</sup> Αυτό μπορεί να πυροδοτείται είτε από την σύνδεση με πρωτεϊνικούς προσαρμογείς ενδοκυτταρικά ή από τη σύνδεση με τις συνδετικές εξωκυττάρια ουσίες.

2. Οι πρωτεϊνικοί προσαρμογείς προσκολλώνται στις κυτταροπλασματικές περιοχές των ιντεγκρινών, συνδέοντας τες έτσι στον κυτταρικό σκελετό.

3. Οι ιντεγκρίνες σχηματίζουν συναθροίσεις προκειμένου να συνδεθούν αποτελεσματικότερα στην εξωκυττάρια ουσία.

Μετά την ενεργοποίηση τους, οι ιντεγκρίνες είναι ικανές να διεγείρουν μια ποικιλία διαδικασιών μεταγωγής σήματος. Ανάλογα με τον συνδυασμό των α και β υποτύπων, θα επηρεαστούν διαφορετικές λειτουργίες του κυττάρου. Όπως αποδεικνύεται κυρίως από μελέτες knock-out γονιδίων σε ποντίκια, αυτές περιλαμβάνουν τη συμπεριφορά των κυττάρων και την οργάνωση ιστών.<sup>77</sup>

Το ποιο μονοπάτι σηματοδότησης εκκινείται μετά από την ενεργοποίηση των ιντεγκρινών, βασίζεται στο βιολογικό πλαίσιο, καθώς και στα μόρια που συνδέονται με αυτές (συστατικά μήτρας / αυξητικοί παράγοντες). Ανάλογα με το συνδυασμό αυτών των παραγόντων, μια ποικιλία βραχυπρόθεσμων και μακροπρόθεσμων αποκρίσεων μπορεί να εκλυθεί.<sup>78</sup> Ο βαθμός ακαμψίας του υποστρώματος έχει επίσης αποδειχθεί ότι επηρεάζει ανεξάρτητα τον τύπο της δομής πρόσφυσης που σχηματίζουν οι ιντεγκρίνες μετά την ενεργοποίησή τους. Μπορούν έτσι να μεταφέρουν και πληροφορίες για τις μηχανικές ιδιότητες του υποστρώματος στο κύτταρο.<sup>79</sup>

Συνοψίζοντας τα παραπάνω μπορούμε να πούμε ότι οι ιντεγκρίνες είναι οι κύριοι υποδοχείς που χρησιμοποιούνται από τα κύτταρα των ζωικών οργανισμών για να συνδεθούν στην εξωκυττάρια μήτρα. Είναι ετεροδιμερή και λειτουργούν ως διαμεμβρανικοί συνδετήρες μεταξύ της εξωκυττάριας μήτρας και των νημάτων ακτίνης του κυτταροσκελετού. Τα κύτταρα μπορούν να ρυθμίσουν τη συγκολλητική δραστηριότητα των ιντεγκρινών τους. Οι ιντεγκρίνες λειτουργούν επίσης ως μετατροπείς σήματος, ενεργοποιώντας διάφορες ενδοκυττάρια οδούς σηματοδότησης, όταν ενεργοποιούνται από τη δέσμευση τους με τη μήτρα. Οι ιντεγκρίνες μαζί με άλλους συμβατικούς υποδοχείς σηματοδότησης, συχνά

συνεργάζονται, για την προώθηση της ανάπτυξης, την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

### **Ο ρόλος των ιντεγκρινών στο ΚΝΣ, όπως διαμορφώνεται από μελέτες σε Integrin - Null πειραματόζωα**

Επειδή η απουσία έκφρασης των  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 8$  και  $\beta 1$  υπομονάδων της ιντεγκρίνης έχει ως αποτέλεσμα τον θάνατο σε εμβρυϊκό στάδιο των κατασκευασμένων knock-out ποντικών, δεν έχει τεκμηριωθεί αν οι λειτουργίες τους απαιτούνται για τη διατήρηση της ακεραιότητας του αίματοεγκεφαλικού φραγμού. Διαγραφές των  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 9$ ,  $\beta 4$ , ή  $\beta 8$  υπομονάδων ιντεγκρίνης είναι θανατηφόρες κατά την περιγεννητική περίοδο έως τους 5 πρώτους μήνες ζωής. Σημαντικό είναι ότι διαγραφές των υπομονάδων ιντεγκρίνης  $\alpha 6$ ,  $\alpha 9$ , και  $\beta 8$  επιδεικνύουν έναν σαφή φαινότυπο στο ΚΝΣ.<sup>80,81</sup>

#### **Ιντεγκρίνες $\alpha 9$ και $\beta 8$**

Εντός του ΚΝΣ, το ενδοθήλιο ή οι μικροαγγειακές δομές που σχετίζονται με το ενδοθήλιο εξαρτώνται από την ιντεγκρίνη  $\alpha 9 \beta 8$  με τρόπο που δεν φαίνεται να ισχύει για τα αιμοφόρα αγγεία εκτός ΚΝΣ.

#### **Ιντεγκρίνη $\alpha 9$**

Οι πρώτες μελέτες με έμβρυα ποντικού γενετικά μηδενισμένων για όλες τις  $\alpha 9$  ιντεγκρίνες (genetically null), κατέδειξαν ότι αυτά αναπτύσσουν ενδοεγκεφαλική αιμορραγία λόγω ελαττωματικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αιμοφόρων αγγείων και των κύτταρων του εγκεφαλικού παρεγχύματος.<sup>82</sup> Μια πιο πρόσφατη μελέτη χρησιμοποίησε τεχνολογία knockout γονιδίων υπό συνθήκες, προκειμένου να ανιχνεύσει κατά πόσον η εγκεφαλική αιμορραγία οφείλεται σε πρωτογενή ελαττώματα των αγγειακών ή των νευρικών κυττάρων. Οι ερευνητές απέδειξαν ότι η αποτροπή της έκφρασης της  $\alpha 9$  ιντεγκρίνης στο αγγειακό ενδοθήλιο δεν έχει ανιχνεύσιμη επίδραση στην ανάπτυξη των εγκεφαλικών αιμοφόρων αγγείων. Αντίθετα η κατάργηση της έκφρασης της  $\alpha 9$  στα νευρογλοιακά κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος οδηγεί σε εμβρυϊκή και νεογνική εγκεφαλική αιμορραγία. Η υπό συνθήκες διαγραφή της ιντεγκρίνης τόσο στα νευρογλοία όσο

και στους νευρώνες του κεντρικού νευρικού συστήματος οδηγεί επίσης σε εγκεφαλική αιμορραγία, αλλά επιπλέον και σε άλλα σοβαρά νευρολογικά ελαττώματα.<sup>83</sup>

### **Ιντεγκρίνη β8**

Έμβρυα ποντικών με διαγραμμένη την β8 ιντεγκρίνη εμφανίζουν εκτεταμένες ενδοεγκεφαλικές αιμορραγίας. Εξέταση του εγκεφαλικού ιστού των εμβρύων αυτών αποκαλύπτει ανώμαλη αγγειακή μορφογένεση που καταλήγει σε διογκωμένα τριχοειδή αγγεία επιρρεπή σε διαρροές, καθώς και παρεκκλίνουσα διάταξη των τριχοειδών αυτών. Επιπλέον, σε αυτούς τους μεταλλαγμένους εγκεφάλους ανευρίσκεται υπερπλασία των ενδοθηλιακών κυττάρων.<sup>84</sup>

Σε πιο πρόσφατες μελέτες οι ερευνητές κατάφεραν να δημιουργήσουν ομόζυγους για την εξάλειψη του γονιδίου της β8 ποντικούς, που επιβίωσαν έως και 5 μήνες. Μελετήσανε έτσι τις λειτουργίες της ιντεγκρίνης αυτής στον ενήλικο εγκέφαλο. Κατέδειξαν ότι τα ενήλικα β8 - / - ποντίκια, εμφανίζουν εκτεταμένες βλάβες στην ομοιόσταση της νευρο-αγγειακής μονάδας, που συμπεριλαμβάνουν την αύξηση του αριθμού των ενδοεγκεφαλικών αιμοφόρων αγγείων και εμφανίζουν έντονη περιαγγειακή αστρογλοίωση. Επιπλέον, στις φωλέες νευρογέννησης του εγκεφάλου των ενηλίκων, όπου τα νευρικά προγονικά κύτταρα (Neural Progenitor Cells – NPCs) σχηματίζουν συναθροίσεις γύρω από τα αιμοφόρα αγγεία, η ιντεγκρίνη β8 είναι απαραίτητη για τον φυσιολογικό έλεγχο του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης των NPCs.<sup>80</sup>

Τα παραπάνω αναδεικνύουν έναν πιθανό ρόλο της β8 ιντεγκρίνης στην συχνότητα των αιμορραγικών εγκεφαλικών επεισοδίων αλλά και στην μακροπρόθεσμη έκβασή τους.

### **Η στόχευση των Ιντεγκρινων ως σημεία πιθανών θεραπευτικών παρεμβάσεων**

Μέχρι στιγμής 2 μηχανισμοί διαμεσολαβούμενοι από ιντεγκρίνες έχουν εξεταστεί σε νευρολογικές ασθένειες: (1) Η διήθηση λευκοκυττάρων στο νευροπιλήμα και (2) Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων κατά τη διάρκεια εγκεφαλικού επεισοδίου.

Τα λευκοκύτταρα εισχωρούν στο νευροπιλήμα κατά τη διάρκεια της κυτταρικής φλεγμονώδους φάσεις της πολλαπλής σκλήρηνσης και των ισχαιμικών αγγειακών επεισοδίων. Όπως έχει καταδειχτεί από μελέτες σε πειραματόζωα, οι ιντεγκρίνες α4 και σε μικρότερο βαθμό οι β2 ιντεγκρίνες επί των λευκοκυττάρων μεσολαβούν στην προσκόλληση τους στο ενδοθήλιο και στην ακόλουθη μετανάστευσή τους, Βάσει των ελπιδοφόρων δεδομένων από τις πειραματικές μελέτες, οι κλινικές δοκιμές απέδειξαν ότι η έγχυση ενός εξανθρωπισμένου μονοκλωνικού αντισώματος κατά της υπομονάδας α4 ιντεγκρίνης σε ασθενείς με την υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα μορφή της πολλαπλής σκλήρυνσης μειώνει σημαντικά τόσο την συχνότητα υποτροπής όσο και τον αριθμό των νέων απομυελινωτικών βλαβών.<sup>85</sup> Ωστόσο, ο συνολικός αποκλεισμός της εισόδου των λευκοκυττάρων στο ΚΝΣ μπορεί να είναι ένα μη επιθυμητό αποτέλεσμα για τον ασθενή. Πιο αποτελεσματική μπορεί να είναι η τιτλοποίηση της υπέρμετρης απόκρισης των λευκοκυττάρων που παράλληλα επιτρέπει κάποια ενδογενή προστασία.<sup>81</sup>

Ο αποκλεισμός των β2-ιντεγκρινών των λευκοκυττάρων νωρίς κατά τη διάρκεια του αποκλεισμού της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας στα πρωτεύοντα θηλαστικά μειώνει σημαντικά την εστία μη επαναϊμάτωσης (no-reflow). Περαιτέρω, σε αλλά πειραματικά μοντέλα, ο αποκλεισμός του υποδοχέα ινωδογόνου των αιμοπεταλίων αIIbβ3 αυξάνει την βατότητα των μικρών αγγείων και μειώνεται ο όγκος της βλάβης μετά τον αποκλεισμό της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας.<sup>86</sup> Μια κλινικά σημαντική δοσοεξαρτώμενη αύξηση της αιμορραγικής μετατροπής εντός των ισχαιμικών περιοχών μπορεί να συμβεί με αυτές τις ουσίες. Κατόπιν της παρατήρησης ότι η αναστολή της αIIbβ3 ιντεγκρίνης μπορεί να προάγει την αιμορραγία εντός του ισχαιμικού έδαφος σε ζωικά μοντέλα, μια προοπτική πανευρωπαϊκή μελέτη φάσης III, ενός αναστολέα της β3 των αιμοπεταλίων σε ασθενείς με ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο έχει τερματιστεί εξαιτίας ανησυχιών για την ασφάλεια. Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι, παρά τα ευεργετικά αποτελέσματα του αποκλεισμού των ιντεγκρινών στις αγγειακές διεπαφές, χρειαζόμαστε μια πληρέστερη κατανόηση των μηχανισμών σύμφωνα με την οποία οι συγκολλητικοί μηχανισμοί ρυθμίζουν την ακεραιότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού.<sup>81</sup>

Γενικεύοντας, είναι λογικό όσο η γενετική και οι μηχανισμοί δράσης των ιντεγκρινών ερμηνεύονται βαθύτερα, να προσμένουμε αύξηση της στόχευσής τους ως σημεία θεραπευτικών παρεμβάσεων.

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Όπως περιγράφηκε στο γενικό μέρος, πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν την συμβολή των ιντεγκρινών αν και β8 στην ακεραιότητα της εγκεφαλικής μικροκυκλοφορίας.<sup>79,80,81</sup> Επίσης διαταραχές της έκφρασης των γονιδίων τους σε πειραματόζωα έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση εγκεφαλικής αιμορραγίας.<sup>82,83</sup>

Υποτέθηκε ότι γενετικοί πολυμορφισμοί των γονιδίων των ιντεγκρινών αν και β8 που θα διαφοροποιούσαν την δομή και τη λειτουργικότητα τους θα μπορούσαν να επηρεάσουν την επίπτωση της αυτόματης ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας στους ανθρώπους.

Η παρούσα μελέτη σύνδεσης υποψήφιου γονιδίου πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς – μάρτυρες προκειμένου να διερευνηθούν οι πιθανές επιδράσεις των πολυμορφισμών της περιοχής των γονιδίων των ITGAV και ITGB8 στον κίνδυνο και στην ηλικία εμφάνισης ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας.

## Υλικά και Μέθοδοι

### Ασθενείς

Ο πληθυσμός της μελέτης αποτελείται από δύο ανεξάρτητες ομάδες Καυκάσιων. Η πρώτη ομάδα αποτελείται από 500 (49.3 %) Έλληνες συμμετέχοντες (250 στην ομάδα έλεγχου και 250 μη σχετιζόμενοι ασθενείς με ενδοεγκεφαλική αιμορραγία) που εισήχθησαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Λάρισας και η δεύτερη από 515 (50.7 %) Πολωνούς (322 στην ομάδα έλεγχου και 193 μη σχετιζόμενοι ασθενείς με ενδοεγκεφαλική αιμορραγία) που εισήχθησαν στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Κρακοβίας. Η επιλογή των ασθενών με πρωτοπαθή ενδοεγκεφαλική αιμορραγία πραγματοποιήθηκε προοπτικά; Περιπτώσεις με ενδοεγκεφαλική αιμορραγία οφειλόμενη σε δευτεροπαθή αίτια (τραύμα, αντιπηκτική αγωγή, χρήση κοκαΐνης κλπ) αποκλείστηκαν.

Χρησιμοποιώντας την αρχική υπολογιστική τομογραφία του εγκεφάλου, οι ασθενείς υποκατηγοριοποιήθηκαν περεταίρω, ως πάσχοντες από λοβώδη (συμμετοχή του φλοιού και της υποκείμενης λευκής ουσίας) ή μη λοβώδη (εντοπιζόμενη στα βασικά γάγγλια, θάλαμο, παρεγκεφαλίδα ή στέλεχος) ενδοεγκεφαλική αιμορραγία. Η κατηγοριοποίηση των αιμορραγιών σε λοβώδεις και μη λοβώδεις πραγματοποιήθηκε από ειδικευμένους ακτινολόγους με τον βαθμό του επιμελητή και άνω, που δεν γνώριζαν τα βασικά χαρακτηριστικά των ασθενών και τα ευρήματα των γενετικών μελετών.

Οι 250 Έλληνες ασθενείς, αναζητήθηκαν 6 μήνες μετά την εμφάνιση ΕΕΑ προκειμένου να αξιολογηθεί η λειτουργική αποκατάστασή τους με βάση την τροποποιημένη κλίμακα του Rankin (mRS)<sup>101</sup>. Συνελέγησαν πλήρη δεδομένα για 211 από αυτούς. Δεν υπήρξαν δεδομένα για 39 περιπτώσεις.

Στρατολογήθηκε επίσης σε κάθε νοσοκομείο μια μη σχετιζόμενη ομάδα ελέγχου, αντιστοιχισμένη ως προς την ηλικία και το φύλο, κυρίως από επισκέπτες ασθενών (όχι απαραίτητα των ασθενών της μελέτης) ή εργαζόμενους στο νοσοκομείο. Κριτήριο επιλεξιμότητας για τους υγιείς μάρτυρες ήταν η απουσία ιστορικού σχετιζόμενου με οποιοδήποτε νευρολογικό νόσημα. (Πίνακας 1)

**Πίνακας 1. Βασικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης (n=1015).**

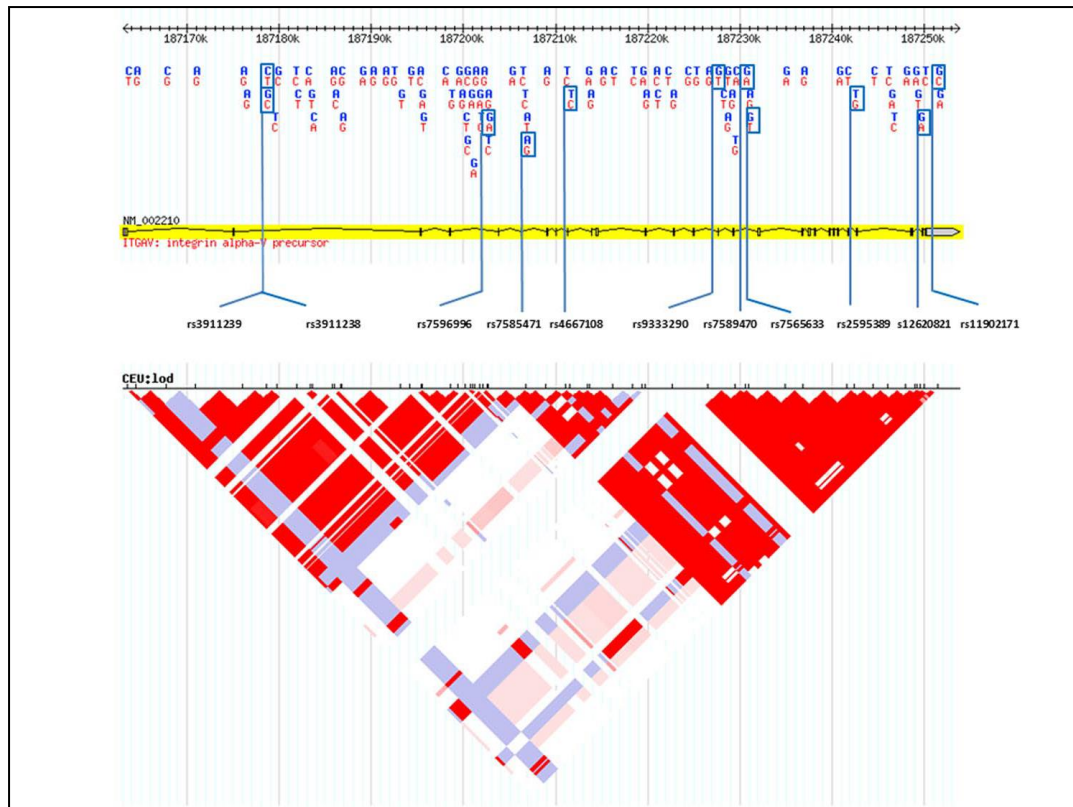
Χαρακτηριστικά	Όλες οι ΕΕΑ (n=443)	Λοβώδεις ΕΕΑ (n=147)	Μη- Λοβώδεις ΕΕΑ (n=268)	Ομάδα Ελέγχου (n=572)
<b>Ηλικία(έτη)</b>				
Μέση	64.47	66.05	63.52	59.41
SD	13.199	13.430	13.028	15.440
Εύρος	68	68	63	82
	n, (%)	n, (%)	n, (%)	n, (%)
Άρρενες	248 (56.0)	88 (59.9)	157 (58.6)	290 (50.7)
Θήλυες	170 (38.4)	59 (40.1)	111 (41.4)	273 (47.7)
Υπέρταση	327 (73.8)	97 (66.0)	229 (85.4)	224 (39.2)
Ισχαιμική καρδ/θεια	82 (18.5)	32 (21.8)	50 (18.7)	80 (14.0)
Διαβήτης	65 (14.7)	18 (12.2)	47 (17.5)	67 (11.7)
Κάπνισμα	83 (18.7)	33 (22.4)	50 (18.7)	123 (21.5)
Αλκοόλ	87 (19.6)	25 (17.0)	62 (23.1)	108 (18.9)
Υπερλιπιδαιμία	114 (32.5)	44 (29.9)	99 (36.9)	165 (28.8)
Έλληνες	250 (56.4)	83 (56.5)	167 (62.3)	250 (43.7)
Πολωνοί	193 (43.6)	64 (43.5)	101 (37.7)	322 (56.3)

ΕΕΑ, ενδοεγκεφαλική αιμορραγία; SD, τυπική απόκλιση.

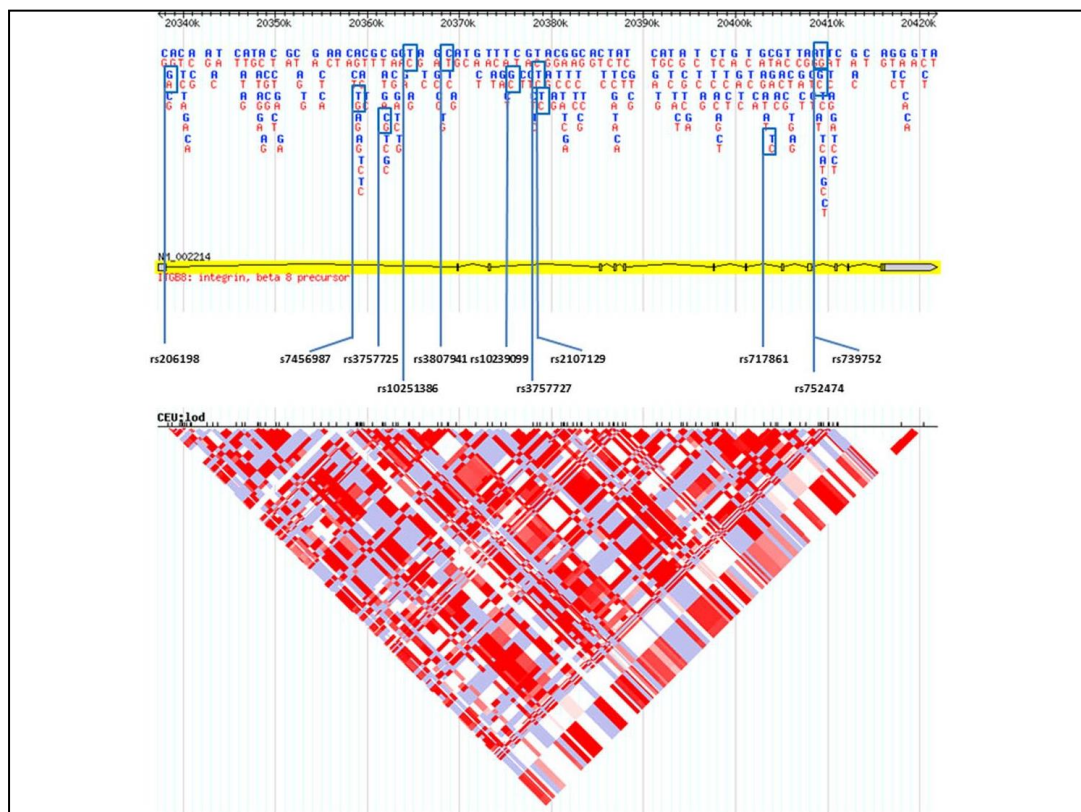
### Επιλογή πολυμορφισμών

Έγινε προσπάθεια να καλυφθεί το μεγαλύτερο μέρος της γενετικής ποικιλότητας σε όλη την έκταση του γονιδίου ITGAV (μια περιοχή 90.83-kbp, με 30 εξόνια στο χρωμόσωμα 2: θέση 187,163,045–187,253,872) και παρόμοια στο γονίδιο ITGB8 (μια περιοχή 84.65-kbp, με 14 εξόνια στο χρωμόσωμα 7: θέση 20,337,250–20,421,903). Τα SNPs σήμανσης (tag SNPs) εντοπίστηκαν με βάση την ανισορροπία σύνδεσης τμημάτων σύμφωνα με το project HarMap (<http://harmap.ncbi.nlm.nih.gov>) με το πρόγραμμα γενετικής σήμανσης του Broad Institute (<http://www.broadinstitute.org/mpg/tagger>). Η επιλογή των προς μελέτη SNPs βασίστηκε στους πληθυσμούς CEU του HarMap project (Utah residents with ancestry from northern and western Europe, Release 27, Phase II+III, Feb09, on NCBI B36 assembly, dbSNP b126) χρησιμοποιώντας τα παρακάτω κριτήρια:  $r^2$  μεγαλύτερο ή ίσο με 0.8 και συχνότητα του ελάσσονος αλληλομόρφου μεγαλύτερη από 0.05. . Συνολικά 11 SNPs επιλέχθηκαν, για το καθένα από τα δύο γονίδια, τα οποία καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος της μεταβλητότητας αυτών σύμφωνα με τη βάση δεδομένων του HarMap. Οι θέσεις τους στην περιοχή των γονιδίων ITGAV και ITGB8 αποτυπώνεται στις εικόνες 1 και 2 αντίστοιχα.





Εικόνα 1. Διάγραμμα ανισορροπίας σύνδεσης και επιλογή SNPs, συμφωνα με το HarMap για το ITGAV



Εικόνα 2. Διάγραμμα ανισορροπίας σύνδεσης και επιλογή SNPs, συμφωνα με το HarMap για το ITGB8

Λεπτομέρειες για κάθε SNP των ITGAV και ITGB8 που επιλέχτηκαν παρουσιάζονται στους πίνακες 1 και 2 αντίστοιχα.

**Πίνακας 1:** Χαρακτηριστικά των tag SNP του ITGAV που αναλύθηκαν.

SNP	rs κωδικός	Θέση στο χρωμόσωμα	Θέση στο γονίδιο	Λειτουργία	MAF-CEU
1.	rs3911239	187178556	Intron 2-3	no coding	C (0.319)
2.	rs3911238	187178589	Intron 2-3	no coding	C (0.283)
3.	rs7596996	187202672	Intron 4-5	no coding	G (0.225)
4.	rs7585471	187206807	Intron 6-7	no coding	G (0.265)
5.	rs4667108	187211471	Intron 10-11	no coding	C (0.385)
6.	rs9333290	187227583	Intron 15-16	no coding	T (0.305)
7.	rs7589470	187230651	Intron 17-18	no coding	G (0.415)
8.	rs7565633	187230926	Intron 17-18	no coding	G (0.342)
9.	rs2595389	187242428	Intron 25-26	no coding	G (0.442)
10.	rs12620821	187249563	Intron 28-29	no coding	G (0.491)
11.	rs11902171	187251472	exon 30	3'-UTR	C(0.271)

SNP, (single nucleotide polymorphism) μονήρης νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός; ITGAV, ιντεγκρίνη AV; MAF, (minor allele frequency) συχνότητα ελασσόνων αλληλόμορφων; CEU, πληθυσμός της Γιούτα με ευρωπαϊκή καταγωγή.

**Πίνακας 2:** Χαρακτηριστικά των tag SNP του ITGB8 που αναλύθηκαν

SNP	rs κωδικός	Θέση στο χρωμόσωμα	Θέση στο γονίδιο	Λειτουργία	MAF-CEU
1.	rs206198	20338283	Intron 1-2	no-coding	A (0.412)
2.	rs7456987	20358821	Intron 1-2	no-coding	G (0.464)
3.	rs3757725	20361879	Intron 1-2	no-coding	C (0.203)
4.	rs10251386	20364432	Intron 1-2	no-coding	C (0.279)
5.	rs3807941	20368663	Intron 1-2	no-coding	T (0.425)
6.	rs10239099	20375399	Intron 3-4	no-coding	C (0.347)
7.	rs3757727	20378422	Intron 3-4	no-coding	C (0.425)
8.	rs2107129	20378725	Intron 3-4	no-coding	C (0.407)
9.	rs717861	20403818	Intron 8-9	no-coding	T (0.402)
10.	rs752474	20408988	Intron 10-11	no-coding	G (0.492)
11.	rs739752	20409153	Intron 10-11	no-coding	T (0.259)

SNP, (single nucleotide polymorphism) μονήρης νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός; ITGAV, ιντεγκρίνη AV; MAF, (minor allele frequency) συχνότητα ελασσόνων αλληλόμορφων; CEU, πληθυσμός της Γιούτα με ευρωπαϊκή καταγωγή.

Όλοι οι SNP αναλυθήκαν γονοτυπικά μην την μέθοδο διάκρισης συγκεκριμένου αλληλόμορφου TaqMan (TaqMan allele-specific discrimination assays) στο σύστημα ανίχνευσης αλληλουχίας ABI Prism 7900 και αναλύθηκαν με τη χρήση του λογισμικού SDS (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), από προσωπικό του εργαστηρίου που δεν γνώριζε τα κλινικά δεδομένα. Ο ενιαίος

συντελεστής της γονοτυπικής ανάλυσης ήταν 96.7 %. Προκειμένου να ελεγχθεί η αναπαραγωγικότητα των αναλύσεων, ένα τυχαίο 10% του δείγματος επανυποβλήθηκε σε γονοτύπηση με 100% σύμπτωση των αποτελεσμάτων.

## Εργαστηριακές τεχνικές

1. Απομόνωση DNA
2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR: Polymerase Chain Reaction)
3. Γονοτύπηση με τη μέθοδο κατά Taqman

### 1.Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση του DNA εφαρμόστηκε η μέθοδος της εξαλάτωσης. Είναι σημαντικό το DNA να είναι ελεύθερο προσμίξεων και να μην είναι διασπασμένο σε πολύ μικρά κομμάτια που δεν μπορούν να ενισχυθούν και να αναλυθούν. Η απομόνωση γενωμικού DNA γίνεται από εμπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος (πυρήνες λευκοκυττάρων). Για τη διαδικασία αυτή διενεργείται αιμοληψία 10ml αίματος συνολικά, που τοποθετούνται σε σωληνάριο, παρουσία αντιπηκτικού Na<sub>2</sub>EDTA. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του γενωμικού DNA είναι:

- 1) Διάλυμα διάσπασης των πυρήνων [Lysis I: NH<sub>4</sub>Cl (155mM), KHCO<sub>3</sub> (10mM), EDTA (1mM), pH=7.4 και Lysis II : Tris (10mM), NaCl (400mM), di-Na EDTA (2mM), pH=8.2],
- 2) διάλυμα πρωτεΐνάσης K (10mg/ml),
- 3) Διάλυμα 10% w/v SDS (sodium dodecyl sulfate: δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο),
- 4) κορεσμένο διάλυμα NaCl (6M),
- 5) απόλυτη αιθανόλη,
- 6) CH<sub>3</sub>COONa (3M),
- 7) πηκτή αγαρόζης 1%

Για την απομόνωση του DNA με τη μέθοδο της εξαλάτωσης ακολουθούμε την διαδικασία που παρουσιάζεται παρακάτω:

#### 1η μέρα

1.Τοποθέτηση του αίματος σε σωληνάριο πολυπροπυλενίου των 15ml και αραιώνουμε ως 12ml με ddH<sub>2</sub>O (δισ αποσταγμένο νερό). Ακολουθεί καλή ανάδευση (ούτως ώστε να επιτευχθεί λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων).

2.Φυγοκέντρηση για 15min στις 3500rpm, στους 40C (απομόνωση των εμπύρηνων κυττάρων).

3.Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο απορρίπτεται και η διαδικασία συνεχίζεται με το ίζημα. Τα κύτταρα αραιώνονται σε ddH<sub>2</sub>O έως 12ml και ανακινούμε σε vortex.

4.Φυγοκέντρηση για 15min στις 3500rpm, στους 40C.

5.Αφαίρεση του υπερκείμενου και συνεχίζουμε με το ίζημα. Προσθέτουμε το διάλυμα lysis I μέχρι τα 12ml.

6. Φυγοκέντρηση για 15min στις 3500rpm, στους 40C.

7.Επαναληψη των σταδίων 5 και 6 με lysis I.

8. Αφαίρεση του υπερκείμενου και συνέχιση με το ίζημα. Προσθήκη το διαλύματος lysis II μέχρι τα 6ml (τα λυτικά διαλύματα lysis I και lysis II διευκολύνουν τη διάσπαση των πυρηνικών μεμβρανών για την απελευθέρωση του DNA. Επίσης, όπως φαίνεται παραπάνω, περιέχουν EDTA που δεσμεύει τα δισθενή κατιόντα (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) που θεωρούνται απαραίτητα για τη δράση των νουκλεασών. Έτσι, τα ένζυμα αυτά απενεργοποιούνται, γεγονός που εξυπηρετεί στην αποφυγή της διάσπασης του DNA). Ισχυρή ανακίνηση και επώαση για 15-30min, σε θερμοκρασία δωματίου.

9.Προσθήκη 750μl SDS (10% w/v) και 100μl πρωτεϊνάσης K (10mg/ml) (το SDS είναι ένα ανιονικό αποδιατακτικό που δεσμεύει τα λιπίδια και καταστρέφει τη δομή της μεμβράνης του πυρήνα, ενώ συμμετέχει στην αποδιάταξη της χρωματίνης και των πρωτεϊνών. Επίσης, με την πρωτεϊνάση K επιτυγχάνεται η διάσπαση και η πέψη των πρωτεϊνών, με τις οποίες είναι συνδεδεμένο το DNA).

10.Επώαση στους 370C για 16-18hrs (overnight-O/N).

### 2η μέρα

Προσθήκη 2ml 6M κεκορεσμένου διαλύματος NaCl. Ισχυρή ανάδευση για 15sec (με τη διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα η κατακρήμνιση των αποδιαταγμένων πρωτεϊνών).

1.Φυγοκέντρηση για 15min στις 3500rpm, στους 40C.

2.Στο υπερκείμενο υπάρχει το DNA. Μετάγγιση του υπερκείμενου σε καθαρό σωληνάριο και απόρριψη του ιζήματος. Ισχυρή ανάδευση.

3. Φυγοκέντρηση για 15min στις 3500rpm, στους 40C.

4. Μετάγγιση του υπερκείμενου σε καθαρό σωληνάριο των 50ml και απόρριψη του ιζήματος.

5. Ακολουθεί καταβύθιση του νουκλεϊκού οξέος, που βρίσκεται στο υπερκείμενο διάλυμα, με 2 όγκους απόλυτης αιθανόλης (2πλάσιο όγκο σε σχέση με το αρχικό διάλυμα) και CH<sub>3</sub>COONa σε ποσότητα ίση με το 1/10 του όγκου του αρχικού διαλύματος. Σε περίπτωση που η αρχική ποσότητα του δείγματος του αίματος είναι αρκετή, δεν χρειάζεται να προσθέσουμε CH<sub>3</sub>COONa

6. Επώαση στους 200C O/N.

### 3η μέρα

1. Φυγοκέντρηση για 50min στις 3500rpm, στους 40C.

2. Απόρριψη του υπερκείμενου. Το DNA που συλλέγεται «ξεπλένεται» με διάλυμα αιθανόλης 70% και εισάγεται σε σωληνάριο τύπου erpendorf (το συγκεκριμένο βήμα καθαρισμού χρειάζεται για την απομάκρυνση του άλατος που έχει παραμείνει στο διάλυμα).

3. Φυγοκέντρηση για 30min στις 12000rpm, στους 40C.

4. Επανάληψη του σταδίου 2 άλλες δύο φορές, με τη διαφορά ότι η διάρκεια της φυγοκέντρησης είναι 20min.

5. Αφαίρεση όλου του υπερκείμενου (αιθανόλη) προσεκτικά, (αφήνουμε μόνο το ίζημα-DNA) και καλύπτουμε το σωληνάριο με παραφίλμ, το οποίο τρυπάμε με μικροσκοπική καρφίτσα (με τον τρόπο αυτό διευκολύνεται η εξάτμιση της αιθανόλης που έχει παραμείνει στο σωληνάριο).

6. Επώαση σε θερμοκρασία ψυγείου.

7. Το DNA φυλάσσεται στους 40C (για συχνή χρήση) ή στους -200C (για μεγάλο χρονικό διάστημα).

### *Προσδιορισμός ποιότητας και συγκέντρωσης του DNA*

#### A. Έλεγχος σε πηκτή αγαρόζης

Με μικρή ποσότητα DNA πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (1%) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και το DNA γίνεται ορατό με υπεριώδη ακτινοβολία σε συσκευή UV. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται ο έλεγχος της ποιότητας του DNA.

#### B. Μέτρηση συγκέντρωσης

Μετά το πέρας της διαδικασίας απομόνωσης του DNA ακολουθεί ο προσδιορισμός της συγκέντρωσής του. Το DNA ανιχνεύεται και προσδιορίζεται ποσοτικά με πολλούς τρόπους. Η απλούστερη μέθοδος περιλαμβάνει τον υπολογισμό της

συγκέντρωσής του με φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ιδιότητα του DNA να απορροφά εκλεκτικά ακτινοβολία μήκους κύματος 260nm.

Συγκεκριμένα, μετράται η οπτική πυκνότητα (OD) υδατικού διαλύματος DNA (αραιωμένο διάλυμα DNA 1:100) σε μήκος κύματος 260nm και 280 nm σε κυψελίδα χαλαζία με διαδρομή φωτός 1cm. Η απορρόφηση στα 260nm αντιστοιχεί στο νουκλεϊκό οξύ που περιέχεται στο διάλυμα, ενώ η απορρόφηση στα 280 nm αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες και άλλες προσμίξεις που έχουν παραμείνει στο διάλυμα. Η καθαρότητα του DNA εκτιμάται με βάση το λόγο OD260/OD280. Τιμές του λόγου μεταξύ 1,7 και 1,9 υποδηλώνουν παρουσία επαρκώς καθαρού DNA, τιμές μικρότερες του 1,7 φανερώνουν ότι το διάλυμα του DNA περιέχει πρωτεΐνες, ενώ τιμές μεγαλύτερες του 1,9 υποδηλώνουν πρόσμιξη με RNA.

Έχει αποδειχθεί ότι σε μήκος κύματος 260nm τιμή OD ίση με 1 αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 50μg/ml δίκλωνου DNA. Βάσει αυτού του δεδομένου μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση του DNA μετά τη φωτομέτρηση ως εξής:

Συγκέντρωση DNA (μg/ml)=αραίωση x 50 x τιμήOD<sub>260</sub>

Η μέθοδος αυτή είναι αρκετά ευαίσθητη και μπορεί να ανιχνεύσει ποσότητες DNA μέχρι και 0,2μg DNA/ml διαλύματος.

## 2.Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR: Polymerase Chain Reaction)

Ο ενζυμικός πολλαπλασιασμός (in vitro) επιλεγμένων αλληλουχιών DNA (DNA-στόχου), από ελάχιστη αρχική ποσότητα δείγματος γίνεται με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR: Polymerase Chain Reaction), η οποία ουσιαστικά, εκμεταλλεύεται δύο χαρακτηριστικά της αντιγραφής του DNA:

1.Το μονόκλωνο DNA χρησιμοποιείται ως εκμαγείο από την Taq DNA πολυμεράση για τη σύνθεση ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου. Για το λόγο αυτό καθίσταται απαραίτητη η αποδιάταξη του DNA

2.Για να τη σύνθεση του κλώνου αυτού, η Taq DNA πολυμεράση χρειάζεται ένα μικρό τμήμα δίκλωνου DNA, πράγμα που σημαίνει ότι αν μετά το διαχωρισμό των δύο αλυσίδων ενός μορίου DNA χρησιμοποιηθεί ένας εκκινητής που υβριδίζεται σε ένα σημείο της μιας αλυσίδας, τότε θα αρχίσει η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας από το σημείο που υβριδίστηκε ο εκκινητής (primer).

Με επιλογή λοιπόν δύο εκκινητών που υβριδίζονται εκατέρωθεν της αλληλουχίας-στόχου (όπου ο κάθε εκκινητής είναι συμπληρωματικός προς κάθε μια από τις δύο αλυσίδες DNA και οι δύο μαζί καθορίζουν τα άκρα του επιθυμητού προϊόντος) μπορούμε να ενισχύσουμε οποιοδήποτε τμήμα δίκλωνου DNA. Η τεχνική της PCR αποτελείται από επαναλαμβανόμενους κύκλους, όπου ο κάθε κύκλος περιλαμβάνει τρία στάδια. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται εξολοκλήρου *in vitro*, σε ένα σωληνάριο τύπου *erpendorf* με τη χρήση θερμικού κυκλοποιητή.

#### Στάδια των κύκλων της PCR

Στάδιο 1: Θερμική αποδιάταξη του DNA-εκμαγείου, όπου το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο (denaturation)

Στάδιο 2: σύνδεση εκκινητών, όπου οι δύο εκκινητές υβριδίζονται με τις δύο συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA-στόχου (primer annealing)

Στάδιο 3: σύνθεση DNA, όπου παρουσία Taq DNA πολυμεράσης και dNTPs, οι συμπληρωματικές βάσεις προστίθενται στα 3' άκρα των εκκινητών με βάση την αλυσίδα DNA-εκμαγείο και οι νέες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες επεκτείνονται (extension). Η σύνθεση DNA γίνεται πάντοτε προς την κατεύθυνση 5' → 3'.

Η τεχνική της PCR περιλαμβάνει μία επαναλαμβανόμενη εναλλαγή θερμοκρασιών (υψηλή, σχετικά χαμηλή και ενδιάμεση). Αναλυτικότερα, υψηλή θερμοκρασία για το διαχωρισμό των αλυσίδων του DNA, μια σχετικά χαμηλή θερμοκρασία για τον υβριδισμό των εκκινητών με συμπληρωματικές περιοχές του DNA-στόχου και μια ενδιάμεση θερμοκρασία για την επέκταση των εκκινητών.

### 3. Γονοτύπηση με τη μέθοδο κατά Taqman

Για τον προσδιορισμό πολυμορφισμών σε συγκεκριμένο τμήμα του DNA, χρησιμοποιείται η γονοτύπηση με τη μέθοδο κατά Taqman, η οποία στη ουσία είναι μια Real-Time PCR. Ένας Taqman ιχνηθέτης (ο οποίος είναι συμπληρωματικός με τον υπό έλεγχο πολυμορφισμό) περιέχει δύο χρωστικές. Η μία χρωστική είναι φθορίζουσα και η δεύτερη χρωστική απορροφά και εξουδετερώνει το σήμα που προέρχεται από την πρώτη όταν είναι σε εγγύτητα. Αν τώρα, ο υπό εξέταση πολυμορφισμός υπάρχει, ο ιχνηθέτης θα υβριδισθεί στο αντίστοιχο τμήμα του DNA αλλά κατά τη διάρκεια της επέκτασης (extension) του PCR προϊόντος ο ιχνηθέτης θα υδρολυθεί από την Taq πολυμεράση. Συνέπεια αυτού είναι η αποκοπή του άκρου του, και κατ' επέκταση η διακοπή της αλληλεξουδετέρωσης του σήματος, με τελικό

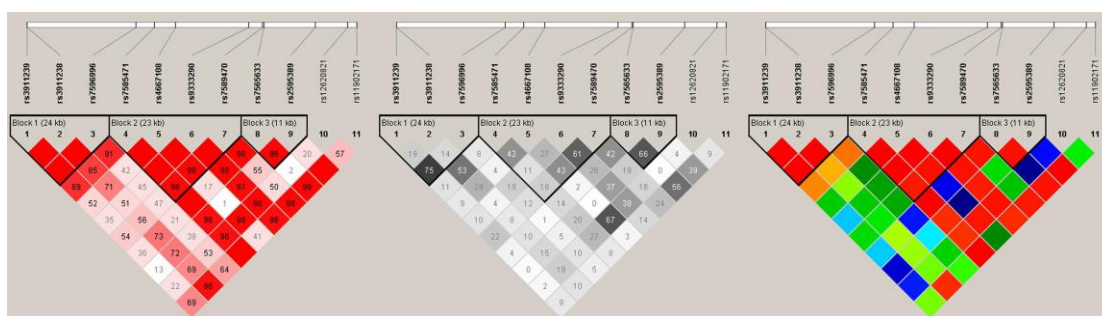


αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού. Αν ο υπό εξέταση πολυμορφισμός δεν υπάρχει, ο ιχνηθέτης θα παραμείνει ανέπαφος και έτσι δεν θα παρατηρηθεί φθορισμός. Με αυτό τον τρόπο και ανάλογα με την ένταση φθορισμού καθίσταται φανερός ο γονότυπος στο συγκεκριμένο σημείο. Η γονοτύπωση με τη μέθοδο κατά Taqman πραγματοποιήθηκε σε ABI PRISM® 7900 Sequence Detection System και η ανάλυση έγινε με το SDS λογισμικό (Applied Biosystems, Foster City, USA).

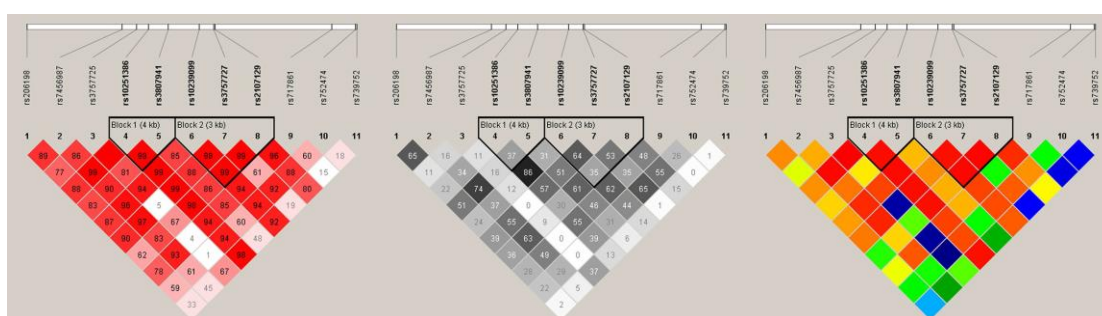
## Στατιστική ανάλυση

Η ισορροπία Hardy–Weinberg ελέγχθηκε με το Fisher’s exact test. Η ανάλυση της ισχύος της μελέτης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού Quanto (<http://hydra.usc.edu/GxE>, version 1.2.4) που υπολογίζει μέγεθος δείγματος ή δύναμη για γενετικές μελέτες συσχέτισης.<sup>87</sup>

Οι τιμές  $D'$ ,  $r^2$  και η δημιουργία τμημάτων ανισορροπίας σύνδεσης μεταξύ των SNPs υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα Harpoview έκδοση 4.2 (<https://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/programs/medical-and-population-genetics/harpoview/harpoview>).<sup>88,89</sup> Οι τιμές αυτές φαίνονται στις εικόνες 3 και 4.



Εικόνα 3



Εικόνα 4

Για να μπορέσουμε να ελέγξουμε την υπόθεση συσχέτισης των πολυμορφισμών και του κίνδυνου εμφάνισης διαφορετικών κλινικών φαινοτύπων ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας (ενδοεγκεφαλική αιμορραγία, λοβώδης ΕΕΑ, μη λοβώδης ΕΕΑ) εφαρμόσαμε μια ανάλυση με δίτιμη λογιστική παλινδρόμηση (binary logistic regression). Οι συγκρίσεις διορθώθηκαν για τις παρακάτω μεταβλητές:

φύλο, ηλικία, χωρά προέλευσης και ιστορικό υπέρτασης. Εφαρμόσαμε γραμμική παλινδρόμηση προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση των SNPs στην ηλικία εμφάνισης ΕΕΑ αφού διορθώθηκαν για τη χωρά προέλευσης. Η ανωτέρω αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το SNPStats (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>).<sup>90</sup>

Ο λόγος πιθανοτήτων [Odds Ratios (ORs)] και τα 95% διαστήματα αξιοπιστίας [Confidence Intervals (CIs)] για τους υπό μελέτη πολυμορφισμούς υπολογίστηκαν υποθέτοντας το συγκυριαρχικό (γονοτυπικό) μοντέλο κληρονόμησης ([AA] vs [Ab] vs [bb]) με δύο βαθμούς ελευθερίας, μια γενίκευση που φαίνεται ότι καλύπτει τα υπόλοιπα μοντέλα, χωρίς τη ανάγκη για περαιτέρω διόρθωση για πολλαπλές συγκρίσεις υποθέτοντας πολλαπλά μοντέλα κληρονόμησης.<sup>91</sup>

Στατιστικά σημαντικό θεωρήθηκε το  $P < 0.05$ . Εφαρμόστηκε η διόρθωση κατά Bonferroni λόγω της διενέργειας πολλαπλών συσχετίσεων με δείκτη σημαντικότητας  $P < 0.05/11 < 0.0045$  λόγω του ότι μελετήσαμε 11 SNPs για κάθε γονίδιο. Έτσι, στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν μόνο οι τιμές  $p$  που ήταν μικρότερες από 0.0045. Τέλος, η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό SPSS version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Για να ελέγξουμε την συσχέτιση των πολυμορφισμών με την έκβαση της ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας υπολογίστηκε ο γενικευμένος λόγος πιθανοτήτων<sup>102</sup> με τη χρήση του λογισμικού ORGGASMA<sup>103</sup>.

## Αποτελέσματα

Ο πληθυσμός της μελέτης αποτελούνταν από 1015 συμμετέχοντες. Ο συνολικός αριθμός ασθενών με πρωτοπαθή ενδοεγκεφαλική αιμορραγία ήταν 443 (μέση ηλικία 64,47 +/- 13,2 χρόνια, 38,4% γυναίκες) και ο αριθμός των υγιών (ομάδα ελέγχου) 572 (μέση ηλικία 59,41 +/- 14,44 χρόνια, 47,7% γυναίκες). Τα κύρια δημογραφικά δεδομένα και η κατηγοριοποίηση των συμμετεχόντων περιλαμβάνονται στον πίνακα 3.

**Πίνακας 3:** Δημογραφικά χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων στη μελέτη

Χαρακτηριστικά	Συνολικές ΕΕΑ (n=443)	Λοβώδεις ΕΕΑ (n=147)	Μη Λοβώδεις (n=268)	Ομ. Ελέγχου (n=572)
<b>Ηλικία</b>				
Μέση	64.47	66.05	63.52	59.41
SD	13.199	13.430	13.028	15.440
Εύρος	68	68	63	82
	n, (%)	n, (%)	n, (%)	n, (%)
Άρρεν	248 (56.0)	88 (59.9)	157 (58.6)	290 (50.7)
Θήλυ	170 (38.4)	59 (40.1)	111 (41.4)	273 (47.7)
Υπέρταση	327 (73.8)	97 (66.0)	229 (85.4)	224 (39.2)
Ισχαιμική Καρδιοπάθεια	82 (18.5)	32 (21.8)	50 (18.7)	80 (14.0)
Διαβήτης	65 (14.7)	18 (12.2)	47 (17.5)	67 (11.7)
Κάπνισμα	83 (18.7)	33 (22.4)	50 (18.7)	123 (21.5)
Αλκοόλ	87 (19.6)	25 (17.0)	62 (23.1)	108 (18.9)
Υπερλιπιδαιμία	114 (32.5)	44 (29.9)	99 (36.9)	165 (28.8)
Έλληνες	250 (56.4)	83 (56.5)	167 (62.3)	250 (43.7)
Πολωνοί	193 (43.6)	64 (43.5)	101 (37.7)	322 (56.3)

ΕΕΑ, ενδοεγκεφαλική αιμορραγία; SD, τυπική απόκλιση

Ο έλεγχος για την ισορροπία Hardy–Weinberg κατέδειξε ότι τα rs3911239 ( $p = 0.0049$ ) και rs3757727 ( $p = 0.037$ ) παρουσίαζαν μια απόκλιση από την ισορροπία HW στις περιπτώσεις ΕΕΑ αλλά όχι στην ομάδα έλεγχου ( $p = 0.067$  και  $p = 0.06$ , αντίστοιχα) και για το λόγο αυτό δεν αφαιρέθηκαν από την ανάλυση.<sup>92</sup> Κανένα άλλο SNP δεν έδειξε απόκλιση από τη ισορροπία HW ( $p > 0,05$ ). Οι συχνότητες των αλληλίων και των γονοτύπων όλων των περιπτώσεων ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας, λοβώδους και μη λοβώδους καθώς και της ομάδας ελέγχου παραθέτονται στον πίνακα 4 για το γονίδιο ITGAV και στον πίνακα 5 για το γονίδιο ITGB8. Συμφώνα με την ανάλυση της ισχύος της μελέτης ο αριθμός των

συμμετεχόντων ήταν ικανός να ανιχνεύσει ένα διαγώνιο πηλίκο (OR) 1,32 για τα tag SNPs του ITGAV και ITGB8 με μια στατιστική ισχύ >80%, θεωρώντας ένα πολλαπλασιαστικό μοντέλο κληρονομής (AA=k, Ab=rk, bb=r<sup>2</sup>k),, μια συχνότητα του ελάσσονος αλληλίου 20% (στο rs7585471) και επίπεδο σημαντικότητας 0,05.

**Πίνακας 4:** Συχνότητες των αλληλίων και γονοτύπων των tag-SNPs του ITGAV

SNPs	Γονότυποι/ Αλληλίοι	Σύνολο ΕΕΑ	Λοβώδεις ΕΕΑ	Μη Λοβώδεις ΕΕΑ	Έλεγχος
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<b>rs3911239</b>					
Γονότυπος	C/C	68 (0.16)	24 (0.17)	37 (0.14)	62 (0.11)
	T/C	182 (0.42)	57 (0.4)	116 (0.44)	281 (0.5)
	T/T	183 (0.42)	61 (0.43)	110 (0.42)	224 (0.4)
Αλληλίοι	T	548 (0.63)	179 (0.63)	336 (0.64)	729 (0.64)
	C	318 (0.37)	105 (0.37)	190 (0.36)	405 (0.36)
<b>rs3911238</b>					
Γονότυπος	C/C	19 (0.04)	7 (0.05)	12 (0.04)	40 (0.07)
	G/C	166 (0.38)	47 (0.33)	108 (0.4)	225 (0.4)
	G/G	254 (0.58)	90 (0.62)	147 (0.55)	299 (0.53)
Αλληλίοι	G	674 (0.77)	227 (0.79)	402 (0.75)	823 (0.73)
	C	204 (0.23)	61 (0.21)	132 (0.25)	305(0.27)
<b>rs7596996</b>					
Γονότυπος	A/A	221 (0.5)	71 (0.49)	135 (0.51)	271 (0.47)
	A/G	178 (0.4)	60 (0.41)	108 (0.4)	255 (0.45)
	G/G	42 (0.1)	15 (0.1)	24 (0.09)	46 (0.08)
Αλληλίοι	A	620 (0.7)	202 (0.69)	378 (0.71)	797 (0.7)
	G	262 (0.3)	90 (0.31)	156 (0.29)	347 (0.3)
<b>rs7585471</b>					
Γονότυπος	A/A	266 (0.62)	94 (0.68)	157 (0.61)	355 (0.64)
	A/G	148 (0.35)	40 (0.29)	95 (0.37)	180 (0.32)
	G/G	12(0.03)	5 (0.04)	7 (0.03)	23 (0.04)
Αλληλίοι	A	680 (0.8)	228 (0.82)	409 (0.79)	890 (0.8)
	G	172 (0.2)	50 (0.18)	109 (0.21)	226 (0.2)
<b>rs4667108</b>					
Γονότυπος	C/C	60 (0.14)	19 (0.13)	37 (0.14)	73 (0.13)
	T/C	200 (0.46)	55 (0.38)	133 (0.5)	272 (0.48)
	T/T	176 (0.4)	69 (0.48)	95 (0.36)	223 (0.39)
Αλληλίοι	T	552 (0.63)	193 (0.67)	323 (0.61)	718 (0.63)
	C	320 (0.37)	93 (0.33)	207 (0.39)	418 (0.37)
<b>rs9333290</b>					
Γονότυπος	G/G	207 (0.48)	67 (0.47)	127 (0.48)	252 (0.45)
	G/T	177 (0.41)	52 (0.37)	113 (0.43)	262 (0.47)
	T/T	48 (0.11)	23 (0.16)	23 (0.09)	48 (0.09)
Αλληλίοι	G	591 (0.68)	186 (0.65)	367 (0.7)	766 (0.68)
	T	273 (0.32)	98 (0.35)	159 (0.3)	358 (0.32)
<b>rs7589470</b>					
Γονότυπος	A/A	149 (0.36)	51 (0.37)	89 (0.35)	172 (0.3)
	A/G	188 (0.45)	52 (0.38)	124 (0.49)	292 (0.52)
	G/G	80 (0.19)	35 (0.25)	39 (0.15)	101 (0.18)
Αλληλίοι	A	486 (0.58)	154 (0.56)	302 (0.6)	636 (0.56)
	G	348 (0.42)	122 (0.44)	202 (0.4)	494 (0.44)
<b>rs7565633</b>					
Γονότυπος	A/A	180 (0.42)	65 (0.47)	104 (0.4)	221 (0.4)
	A/G	175 (0.41)	45 (0.33)	116 (0.45)	271 (0.49)
	G/G	70 (0.16)	28 (0.2)	39 (0.15)	66 (0.12)
Αλληλίοι	A	535 (0.63)	175 (0.63)	324 (0.63)	713 (0.64)
	G	315 (0.37)	101 (0.37)	194 (0.37)	403 (0.36)
<b>rs2595389</b>					
Γονότυπος	G/G	92 (0.21)	38 (0.27)	51 (0.19)	109 (0.2)
	T/G	218 (0.5)	55 (0.39)	145 (0.55)	294 (0.53)
	T/T	122 (0.28)	49 (0.35)	67 (0.25)	155 (0.28)
Αλληλίοι	T	462 (0.53)	153 (0.54)	279 (0.53)	604 (0.54)
	G	402 (0.47)	131 (0.46)	247 (0.47)	512 (0.46)
<b>rs12620821</b>					
Γονότυπος	A/A	131(0.3)	53 (0.37)	72 (0.27)	157 (0.28)
	A/G	217 (0.5)	66 (0.46)	136 (0.51)	283 (0.51)
	G/G	89 (0.2)	25 (0.17)	58 (0.22)	117 (0.21)
Αλληλίοι	A	479 (0.55)	53 (0.37)	72 (0.27)	597 (0.54)
	G	395 (0.45)	66 (0.46)	136 (0.51)	517 (0.46)
<b>rs11902171</b>					
Γονότυπος	C/C	34 (0.08)	25 (0.17)	20 (0.07)	33 (0.06)
	G/C	156 (0.36)	47 (0.33)	97 (0.36)	213 (0.38)
	G/G	249 (0.57)	83 (0.58)	150 (0.56)	313 (0.56)
Αλληλίοι	G	654 (0.74)	213 (0.74)	397 (0.74)	839 (0.75)
	C	224 (0.26)	75 (0.26)	137 (0.26)	279 (0.25)

SNP, Σημειακός νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός; ITGAV, ιντεγρίνη AV; ΕΕΑ, Ενδοεγκεφαλική αιμορραγία.

**Πίνακας 5:** Συχνότητες των αλληλίων και γονοτύπων των tag-SNPs του ITGB8

SNPs	Γονότυποι/ Αλληλίοι	Σύνολο ΕΕΑ n (%)	Λοβώδεις ΕΕΑ n (%)	Μη Λοβώδεις ΕΕΑ n (%)	Έλεγχος n (%)
<b>rs206198</b>					
Γονότυπος	A/A	77 (0.18)	28 (0.2)	46 (0.18)	94 (0.17)
	G/A	193 (0.45)	57 (0.4)	117 (0.45)	261 (0.46)
	G/G	161 (0.37)	57 (0.4)	98 (0.38)	207 (0.37)
Αλληλίοι	G	515 (0.6)	171 (0.6)	313 (0.6)	675 (0.6)
	A	347 (0.4)	113 (0.4)	209 (0.4)	449 (0.4)
<b>rs7456987</b>					
Γονότυπος	G/G	90 (0.21)	35 (0.24)	51 (0.2)	100 (0.18)
	T/G	222 (0.52)	69 (0.48)	134 (0.52)	282 (0.5)
	T/T	115 (0.27)	39 (0.27)	71 (0.28)	182 (0.32)
Αλληλίοι	T	452 (0.53)	147 (0.51)	276 (0.54)	646 (0.57)
	G	402 (0.47)	139 (0.49)	236 (0.46)	482 (0.43)
<b>rs3757725</b>					
Γονότυπος	C/C	21 (0.05)	7 (0.05)	14 (0.05)	28 (0.05)
	G/C	147 (0.34)	49 (0.34)	88 (0.33)	185 (0.33)
	G/G	268 (0.61)	89 (0.61)	161 (0.61)	350 (0.62)
Αλληλίοι	G	683 (0.78)	227 (0.78)	410 (0.78)	885 (0.79)
	C	189 (0.22)	63 (0.22)	116 (0.22)	241 (0.21)
<b>rs10251386</b>					
Γονότυπος	C/C	30 (0.07)	9 (0.06)	21 (0.08)	52 (0.09)
	T/C	184 (0.42)	58 (0.4)	108 (0.4)	253 (0.45)
	T/T	226 (0.51)	78 (0.54)	138 (0.52)	263 (0.46)
Αλληλίοι	T	636 (0.72)	214 (0.74)	384 (0.72)	779 (0.69)
	C	244 (0.28)	76 (0.26)	150 (0.28)	357 (0.31)
<b>rs3807941</b>					
Γονότυπος	C/C	111 (0.25)	35 (0.24)	70 (0.26)	158 (0.28)
	C/T	223 (0.51)	72 (0.5)	134 (0.5)	302 (0.53)
	T/T	105 (0.24)	38 (0.26)	62 (0.23)	109 (0.19)
Αλληλίοι	C	445 (0.51)	142 (0.49)	274 (0.52)	618 (0.54)
	T	433 (0.49)	148 (0.51)	258 (0.48)	520 (0.46)
<b>rs10239099</b>					
Γονότυπος	C/C	34 (0.08)	11 (0.08)	23 (0.09)	62 (0.11)
	G/C	197 (0.45)	61 (0.43)	118 (0.45)	259 (0.46)
	G/G	203 (0.47)	70 (0.49)	124 (0.47)	240 (0.43)
Αλληλίοι	G	603 (0.69)	201 (0.71)	366 (0.69)	739 (0.66)
	C	265 (0.31)	83 (0.29)	164 (0.31)	383 (0.34)
<b>rs3757727</b>					
Γονότυπος	C/C	60 (0.14)	17 (0.12)	39 (0.15)	96 (0.17)
	T/C	231 (0.53)	76 (0.52)	139 (0.53)	301 (0.53)
	T/T	145 (0.33)	53 (0.36)	84 (0.32)	169 (0.3)
Αλληλίοι	T	521 (0.6)	182 (0.62)	307 (0.59)	639 (0.56)
	C	351 (0.4)	110 (0.38)	217 (0.41)	493 (0.44)
<b>rs2107129</b>					
Γονότυπος	C/C	77 (0.18)	28 (0.19)	45 (0.18)	97 (0.17)
	T/C	217 (0.51)	67 (0.46)	137 (0.53)	268 (0.48)
	T/T	134 (0.31)	50 (0.34)	75 (0.29)	197 (0.35)
Αλληλίοι	T	485 (0.57)	167 (0.58)	287 (0.56)	662 (0.59)
	C	371 (0.43)	123 (0.42)	227 (0.44)	462 (0.41)
<b>rs717861</b>					
Γονότυπος	C/C	154 (0.35)	53 (0.37)	93 (0.35)	181 (0.32)
	C/T	225 (0.52)	67 (0.47)	139 (0.53)	280 (0.5)
	T/T	55 (0.13)	22 (0.15)	32 (0.12)	102 (0.18)
Αλληλίοι	C	533 (0.61)	173 (0.61)	325 (0.62)	642 (0.57)
	T	335 (0.39)	111 (0.39)	203 (0.38)	484 (0.43)
<b>rs752474</b>					
Γονότυπος	C/C	96 (0.22)	30 (0.2)	57 (0.22)	123 (0.22)
	G/C	232 (0.53)	82 (0.56)	140 (0.53)	303 (0.54)
	G/G	112 (0.25)	35 (0.24)	68 (0.26)	132 (0.24)
Αλληλίοι	G	456 (0.52)	152 (0.52)	276 (0.52)	567 (0.51)
	C	424 (0.48)	142 (0.48)	254 (0.48)	549 (0.49)
<b>rs739752</b>					
Γονότυπος	G/G	238 (0.55)	78 (0.54)	146 (0.55)	323 (0.58)
	G/T	173 (0.4)	53 (0.37)	107 (0.4)	196 (0.35)
	T/T	25 (0.06)	13 (0.09)	12 (0.05)	38 (0.07)
Αλληλίοι	G	649 (0.74)	209 (0.73)	399 (0.75)	842 (0.76)
	T	223 (0.26)	79 (0.27)	131 (0.25)	272 (0.24)

SNP, Σημειακός νουκλεοτεϊδικός πολυμορφισμός; ITGAV, ιντεγρίνη AV; ΕΕΑ, Ενδοεγκεφαλική αιμορραγία.

Τα tag SNPs του γονιδίου ITGAV που αναγνωριστήκανε στο δείγμα μας ήταν κατανεμημένα σε 3 διαφορετικά τμήματα ανισορροπίας σύνδεσης (LD blocks): rs3911239, rs3911238 and rs7596996 στο πρώτο τμήμα, rs7585471, rs4667108, rs9333290 and rs7589470 στο δεύτερο τμήμα και rs7565633 and rs2595389 στο τρίτο. Η κατά ζεύγη ανισορροπία σύνδεσης (LD) μεταξύ των tagSNPs του ITGAV

γονιδίου ( $D'$ ,  $r^2$ , και GOLD heatmap), καθώς και τα διαφορετικά τμήματα ανισορροπίας σύνδεσης, παραθέτονται στην εικόνα 3.

Τα tag SNPs του γονιδίου ITGB8 που αναγνωριστήκανε στο δείγμα μας ήταν κατανεμημένα σε 2 διαφορετικά τμήματα ανισορροπίας σύνδεσης (LD blocks): rs10251386 και rs3807941 στο πρώτο τμήμα και rs10239099, rs3757727, rs2107129 στο δεύτερο. Η κατά ζεύγη ανισορροπία σύνδεσης (LD) μεταξύ των tagSNPs του ITGB8 γονιδίου ( $D'$ ,  $r^2$ , και GOLD heatmap), καθώς και τα διαφορετικά τμήματα ανισορροπίας σύνδεσης, παραθέτονται στην εικόνα 4.

Η ανάλυση με δίτιμη λογιστική παλινδρόμηση κατέδειξε ότι η υπέρταση σχετιζόταν με αυξημένο κίνδυνο EEA [OR 5.130, 95 % CI (3.733–7.050),  $p < 0.001$ ], λοβώδους EEA [2.325 (1.527–3.540),  $p < 0.001$ ] και μη λοβώδους EEA [10.347 (6.659–16.079),  $p < 0.001$ ], ενώ η ηλικία σχετιζόταν με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης λοβώδους EEA [1.025 (1.009–1.041),  $p = 0.002$ ]. Η ανάλυση με πολυπαραμετρική παλινδρόμηση για την πιθανότητα συσχέτισης των tag SNPs και της EEA, λοβώδους και μη λοβώδους EEA κατέδειξε ότι η ετεροζυγωτία του rs7565633 στο γονίδιο ITGAV σχετιζόταν με μειωμένο κίνδυνο λοβώδους EEA σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. [OR 0.56; 95 % CI 0.36–0.86,  $p = 0.0013$ ]. Κανένα άλλο tag SNP των γονιδίων ITGAV και ITGB8 δεν βρέθηκε να επηρεάζει τον κίνδυνο εμφάνισης EEA ή των υποτύπων της. (Πίνακες 6 και 7)

**Πίνακας 7.** Μονοπαραμετρική και πολυπαραμετρική (σταθμισμένη για ηλικία, φύλο, ιστορικό υπέρτασης και χώρα προέλευσης) ανάλυση συσχέτισης μονήρους γονιδιακής θέσης με ΕΕΑ, λοβώδους ΕΕΑ και μη λοβώδους ΕΕΑ, για τα SNPs του ITGAV, σε ένα συγκυριαρχικό (γονοτυπικό) μοντέλο κληρονομικότητας [AA vs Ab vs bb].

SNPs	Γονότυπος	Περιπτώσεις εν. Ελέγχου				Λοβώδης ΕΕΑ εν. Ελέγχου				Μη Λοβώδης ΕΕΑ εν. Ελέγχου			
		Μονο/μετρική ανάλυση		Πολυπαραμετρική ανάλυση		Μονο/τρική ανάλυση		Πολυπαραμετρική ανάλυση		Μονο/τρική ανάλυση		Πολ/μετρική ανάλυση	
		OR(95%CI)	P	OR(95%CI)	p	OR(95%CI)	p	OR(95%CI)	P	OR(95%CI)	p	OR(95%CI)	p
rs3911239	T/T	1.00	0.021	1.00	0.13	1.00	0.061	1.00	0.13	1.00	0.25	1.00	0.4
	C/T	0.79 (0.61-1.04)		0.81 (0.60-1.10)		0.74 (0.50-1.11)		0.74 (0.49-1.12)		0.84 (0.61-1.15)		0.83 (0.58-1.18)	
	C/C	1.34 (0.90-1.99)		1.24 (0.80-1.94)		1.42 (0.82-2.46)		1.26 (0.71-2.25)		1.22 (0.76-1.94)		1.13 (0.67-1.91)	
rs3911238	G/G	1.00	0.099	1.00	0.32	1.00	0.11	1.00	0.13	1.00	0.33	1.00	0.32
	G/C	0.87 (0.67-1.13)		0.90 (0.67-1.21)		0.69 (0.47-1.03)		0.67 (0.44-1.01)		0.98 (0.72-1.32)		1.11 (0.79-1.57)	
	C/C	0.56 (0.32-0.99)		0.63 (0.33-1.19)		0.58 (0.25-1.34)		0.66 (0.28-1.56)		0.61 (0.31-1.20)		0.62 (0.29-1.34)	
rs7596996	A/A	1.00	0.36	1.00	0.59	1.00	0.6	1.00	0.77	1.00	0.52	1.00	0.79
	G/A	0.86 (0.66-1.11)		0.89 (0.67-1.20)		0.90 (0.61-1.32)		0.91 (0.61-1.35)		0.85 (0.63-1.15)		0.90 (0.64-1.27)	
	G/G	1.12 (0.71-1.76)		1.13 (0.68-1.87)		1.24 (0.66-2.36)		1.14 (0.59-2.23)		1.05 (0.61-1.79)		1.05 (0.57-1.92)	
rs7585471	A/A	1.00	0.43	1.00	0.64	1.00	0.67	1.00	0.78	1.00	0.32	1.00	0.23
	G/A	1.10 (0.84-1.44)		1.12 (0.82-1.52)		0.84 (0.56-1.27)		0.86 (0.56-1.32)		1.19 (0.87-1.63)		1.33 (0.93-1.89)	
	G/G	0.70 (0.34-1.42)		0.82 (0.37-1.80)		0.82 (0.30-2.22)		0.93 (0.33-2.63)		0.69 (0.29-1.64)		0.78 (0.29-2.04)	
rs4667108	T/T	1.00	0.8	1.00	0.98	1.00	0.11	1.00	0.16	1.00	0.63	1.00	0.41
	T/C	0.93 (0.71-1.22)		1.03 (0.76-1.40)		0.65 (0.44-0.97)		0.67 (0.44-1.02)		1.15 (0.84-1.58)		1.27 (0.89-1.82)	
	C/C	1.04 (0.70-1.55)		1.01 (0.65-1.57)		0.84 (0.47-1.49)		0.87 (0.48-1.58)		1.19 (0.75-1.89)		1.09 (0.65-1.85)	
rs9333290	G/G	1.00	0.14	1.00	0.046	1.00	0.013	1.00	0.009	1.00	0.61	1.00	0.21
	T/G	0.82 (0.63-1.07)		0.76 (0.56-1.03)		0.75 (0.50-1.12)		0.68 (0.45-1.04)		0.86 (0.63-1.16)		0.77 (0.54-1.08)	
	T/T	1.22 (0.78-1.89)		1.33 (0.81-2.18)		1.80 (1.02-3.17)		1.76 (0.97-3.20)		0.95 (0.55-1.63)		1.16 (0.62-2.18)	
rs7589470	A/A	1.00	0.11	1.00	0.13	1.00	0.01	1.00	0.017	1.00	0.35	1.00	0.3
	G/A	0.74 (0.56-0.99)		0.72 (0.52-0.99)		0.60 (0.39-0.92)		0.57 (0.37-0.89)		0.82 (0.59-1.14)		0.76 (0.52-1.11)	
	G/G	0.91 (0.63-1.32)		0.83 (0.55-1.25)		1.17 (0.71-1.92)		1.03 (0.61-1.73)		0.75 (0.48-1.17)		0.73 (0.44-1.21)	
rs7565633	A/A	1.00	0.029	1.00	0.017	1.00	<b>0.0012</b>	1.00	<b>0.0013</b>	1.00	0.38	1.00	0.25
	G/A	0.79 (0.60-1.04)		0.73 (0.54-1.00)		<b>0.56 (0.37-0.86)</b>		<b>0.56 (0.36-0.86)</b>		0.91 (0.66-1.25)		0.80 (0.56-1.14)	
	G/G	1.30 (0.88-1.92)		1.31 (0.85-2.02)		1.44 (0.86-2.43)		1.48 (0.85-2.55)		1.26 (0.79-1.99)		1.16 (0.69-1.96)	
rs2595389	T/T	1.00	0.73	1.00	0.47	1.00	0.011	1.00	0.017	1.00	0.76	1.00	0.88
	G/T	0.94 (0.70-1.27)		0.84 (0.60-1.17)		0.59 (0.38-0.91)		0.59 (0.38-0.92)		1.14 (0.80-1.62)		1.02 (0.69-1.52)	
	G/G	1.07 (0.74-1.54)		1.00 (0.66-1.50)		1.10 (0.68-1.80)		1.07 (0.64-1.79)		1.08 (0.70-1.68)		0.91 (0.56-1.50)	
rs12620821	A/A	1.00	0.83	1.00	0.75	1.00	0.13	1.00	0.15	1.00	0.93	1.00	0.93
	G/A	0.92 (0.69-1.23)		0.93 (0.67-1.29)		0.69 (0.46-1.04)		0.68 (0.44-1.05)		1.05 (0.74-1.48)		1.07 (0.73-1.59)	
	G/G	0.91 (0.64-1.31)		0.85 (0.57-1.28)		0.63 (0.37-1.08)		0.63 (0.36-1.10)		1.08 (0.71-1.65)		1.02 (0.64-1.64)	
rs11902171	G/G	1.00	0.43	1.00	0.32	1.00	0.19	1.00	0.26	1.00	0.66	1.00	0.78
	G/C	0.92 (0.71-1.20)		0.94 (0.70-1.27)		0.83 (0.56-1.24)		0.89 (0.59-1.35)		0.95 (0.70-1.29)		0.98 (0.69-1.39)	
	C/C	1.30 (0.78-2.15)		1.47 (0.83-2.59)		1.60 (0.82-3.13)		1.67 (0.83-3.39)		1.26 (0.70-2.28)		1.25 (0.64-2.44)	

SNP, Σημειακός νουκλεοτεϊδικός πολυμορφισμός; ITGAV, ιντεγρίνη AV; ΕΕΑ, Ενδοεγκεφαλική αιμορραγία.; CI, διάστημα αξιοπιστίας; OR, διαγώνιο πληίκο; Στατιστικά σημαντικές τιμές εμφανίζονται με έντονη γραμματοσειρά



**Πίνακας 8.** Μονοπαραμετρική και πολυπαραμετρική (σταθμισμένη για ηλικία, φύλο, ιστορικό υπέρτασης και χώρα προέλευσης) ανάλυση συσχέτισης μονήρους γονιδιακής θέσης με ΕΕΑ, λοβώδους ΕΕΑ και μη λοβώδους ΕΕΑ, για τα SNPs του ITGB8, σε ένα συγκριτικό (γονοτυπικό) μοντέλο κληρονομικότητας [AA vs Ab vs bb].

SNPs	Γον/πος	Περυττώσεις εν. Ελέγχου				Λοβώδους ΕΕΑ εν. Ελέγχου				Μη Λοβώδους ΕΕΑ εν. Ελέγχου			
		Μονο/μετρική ανάλυση		Πολυπαραμετρική ανάλυση		Μονο/μετρική ανάλυση		Μονο/τρική ανάλυση		Πολ/μετρική ανάλυση		Μονο/μετρική ανάλυση	
		OR(95%CI)	P	OR(95%CI)	p	OR(95%CI)	p	OR(95%CI)	p	OR(95%CI)	p	OR(95%CI)	P
<b>rs206198</b>	G/G	1.00	0.84	1.00	0.63	1.00	0.38	1.00	0.37	1.00	0.9	1.00	0.83
	G/A	0.95 (0.72-1.25)		0.86 (0.63-1.17)		0.79 (0.53-1.20)		0.75 (0.49-1.15)		0.95 (0.68-1.31)		0.93 (0.64-1.34)	
	A/A	1.05 (0.73-1.52)		0.93 (0.62-1.40)		1.08 (0.65-1.81)		0.98 (0.58-1.68)		1.03 (0.67-1.58)		0.87 (0.54-1.39)	
<b>rs7456987</b>	T/T	1.00	0.14	1.00	0.33	1.00	0.17	1.00	0.25	1.00	0.4	1.00	0.43
	T/G	1.25 (0.93-1.67)		1.20 (0.87-1.66)		1.14 (0.74-1.76)		1.07 (0.68-1.69)		1.22 (0.86-1.72)		1.29 (0.88-1.89)	
	G/G	1.42 (0.99-2.06)		1.35 (0.89-2.03)		1.63 (0.97-2.74)		1.54 (0.90-2.64)		1.31 (0.85-2.02)		1.19 (0.73-1.93)	
<b>rs3757725</b>	G/G	1.00	0.96	1.00	0.83	1.00	0.98	1.00	0.99	1.00	0.96	1.00	0.8
	G/C	1.04 (0.79-1.36)		1.10 (0.81-1.48)		1.04 (0.70-1.54)		1.03 (0.68-1.55)		1.03 (0.75-1.42)		1.12 (0.78-1.60)	
	C/C	0.98 (0.54-1.76)		1.06 (0.56-2.02)		0.98 (0.42-2.32)		1.04 (0.43-2.55)		1.09 (0.56-2.12)		1.15 (0.55-2.42)	
<b>rs10251386</b>	T/T	1.00	0.18	1.00	0.1	1.00	0.21	1.00	0.22	1.00	0.34	1.00	0.21
	T/C	0.85 (0.65-1.10)		0.79 (0.59-1.06)		0.77 (0.53-1.13)		0.82 (0.55-1.21)		0.81 (0.60-1.10)		0.78 (0.55-1.10)	
	C/C	0.67 (0.41-1.09)		0.61 (0.36-1.04)		0.58 (0.28-1.24)		0.54 (0.25-1.18)		0.77 (0.45-1.33)		0.65 (0.36-1.20)	
<b>rs3807941</b>	C/C	1.00	0.18	1.00	0.2	1.00	0.18	1.00	0.19	1.00	0.39	1.00	0.58
	T/C	1.05 (0.78-1.42)		1.06 (0.76-1.47)		1.08 (0.69-1.68)		1.04 (0.65-1.65)		1.00 (0.71-1.42)		1.11 (0.75-1.64)	
	T/T	1.37 (0.96-1.97)		1.41 (0.94-2.11)		1.57 (0.94-2.65)		1.56 (0.91-2.68)		1.28 (0.84-1.95)		1.28 (0.80-2.05)	
<b>rs10239099</b>	G/G	1.00	0.17	1.00	0.16	1.00	0.27	1.00	0.33	1.00	0.41	1.00	0.28
	G/C	0.90 (0.69-1.17)		0.83 (0.62-1.11)		0.81 (0.55-1.19)		0.84 (0.56-1.26)		0.88 (0.65-1.20)		0.83 (0.59-1.17)	
	C/C	0.65 (0.41-1.03)		0.64 (0.39-1.06)		0.61 (0.30-1.22)		0.60 (0.29-1.24)		0.72 (0.42-1.21)		0.65 (0.36-1.16)	
<b>rs3757727</b>	T/T	1.00	0.28	1.00	0.22	1.00	0.15	1.00	0.17	1.00	0.68	1.00	0.57
	T/C	0.89 (0.68-1.18)		0.85 (0.62-1.16)		0.81 (0.54-1.20)		0.79 (0.52-1.20)		0.93 (0.67-1.29)		0.91 (0.63-1.31)	
	C/C	0.73 (0.49-1.08)		0.68 (0.44-1.06)		0.56 (0.31-1.03)		0.57 (0.30-1.05)		0.82 (0.52-1.29)		0.76 (0.46-1.26)	
<b>rs2107129</b>	T/T	1.00	0.46	1.00	0.51	1.00	0.85	1.00	0.78	1.00	0.22	1.00	0.17
	T/C	1.19 (0.90-1.58)		1.20 (0.88-1.65)		0.98 (0.65-1.48)		0.92 (0.60-1.41)		1.34 (0.96-1.88)		1.43 (0.98-2.08)	
	C/C	1.17 (0.81-1.69)		1.16 (0.77-1.76)		1.14 (0.67-1.92)		1.11 (0.64-1.92)		1.22 (0.78-1.90)		1.19 (0.73-1.95)	
<b>rs717861</b>	C/C	1.00	0.057	1.00	0.12	1.00	0.47	1.00	0.61	1.00	0.082	1.00	0.053
	T/C	0.94 (0.72-1.25)		0.95 (0.70-1.30)		0.82 (0.54-1.23)		0.84 (0.55-1.28)		0.97 (0.70-1.33)		1.01 (0.71-1.45)	
	T/T	0.63 (0.43-0.94)		0.65 (0.42-1.00)		0.74 (0.42-1.28)		0.77 (0.43-1.38)		0.61 (0.38-0.98)		0.57 (0.34-0.96)	
<b>rs752474</b>	G/G	1.00	0.8	1.00	0.86	1.00	0.91	1.00	0.91	1.00	0.82	1.00	0.91
	G/C	0.90 (0.67-1.22)		0.96 (0.68-1.35)		1.02 (0.65-1.59)		1.03 (0.65-1.64)		0.90 (0.63-1.28)		0.95 (0.64-1.41)	
	C/C	0.92 (0.64-1.33)		0.89 (0.59-1.35)		0.92 (0.53-1.59)		0.93 (0.53-1.64)		0.90 (0.59-1.38)		0.90 (0.56-1.45)	
<b>rs739752</b>	G/G	1.00	0.32	1.00	0.42	1.00	0.58	1.00	0.55	1.00	0.2	1.00	0.19
	T/G	1.20 (0.92-1.56)		1.22 (0.90-1.64)		1.12 (0.76-1.66)		1.15 (0.76-1.73)		1.21 (0.89-1.64)		1.30 (0.92-1.84)	
	T/T	0.89 (0.52-1.52)		1.02 (0.57-1.83)		1.42 (0.72-2.79)		1.45 (0.71-2.93)		0.70 (0.35-1.38)		0.75 (0.36-1.58)	

SNP, Σημειακός νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός; ITGB8, ιντεγρίνη Β8; ΕΕΑ, Ενδοεγκεφαλική αιμορραγία.; CI, διάστημα αξιοπιστίας; OR, διαγώνιο πηλίκου; Στατιστικά σημαντικές τιμές εμφανίζονται με έντονη γραμματοσειρά

Η ανάλυση με γραμμική παλινδρόμηση της επίδρασης των tag SNPs στην ηλικία που εμφανίζεται η ΕΕΑ και οι υποτύποι της, κατέδειξε ότι άτομα με τον TC γονότυπο του rs10251386 στο ITGB8 γονίδιο είχαν σημαντικά χαμηλότερη ηλικία κατά την εμφάνιση ΕΕΑ σε σύγκριση με το συνήθη γονότυπο [μέση ηλικία 62.27 έναντι 66.18 χρόνια, αντίστοιχα;  $p = 0.004$ ; συντελεστή παλινδρόμησης (b) -3.884 (95 % CI -6.519,-1.249);  $p = 0.0039$ ].

Παρομοίως ασθενείς με ΕΕΑ και τον GC γονότυπο του rs10239099 στο ITGB8 γονίδιο ήταν σημαντικά νεότεροι του συγκρινόμενοι με τον γονότυπο αναφοράς [μέση ηλικία 62.22 εν 66.75 χρόνια αντίστοιχα;  $p = 0.001$ ; b -4.502 (95 % CI -7.159, -1.845);  $p = 0.0009$ ]. (Πίνακες 9 και 10)

Πίνακας 9: Ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης της εστιακής μετάλλαξης για τα SNPs του ITGAV με την ηλικία εμφάνισης ΕΕΑ(και υποτύπων)													
SNPs	Γονότυποι	ICH				Lobar ICH				Non-lobar ICH			
		B	95%CI		p	B	95%CI		p	B	95%CI		p
			Κατώτερο όριο	Ανώτερο όριο			Κατώτερο όριο	Ανώτερο όριο			Κατώτερο όριο	Ανώτερο όριο	
rs3911239	T/T	Ref.				Ref.				Ref.			
	C/T	0.029	-2.799	2.856	0.984	0.283	-4.664	5.230	0.910	-0.152	-3.598	3.293	0.931
rs3911238	C/C	0.328	-3.565	4.221	0.869	4.884	-1.587	11.354	0.138	-2.918	-7.839	2.002	0.244
	G/G	Ref.				Ref.				Ref.			
rs7596996	G/C	-0.593	-3.260	2.074	0.662	-2.716	-7.432	2.001	0.257	0.910	-2.346	4.166	0.583
	C/C	-7.604	-13.769	-1.439	0.016	-12.281	-22.565	-1.997	0.020	-4.673	-12.387	3.040	0.234
rs7585471	A/A	Ref.				Ref.				Ref.			
	G/A	-0.182	-2.881	2.516	0.894	-0.869	-5.550	3.813	0.714	0.233	-3.087	3.554	0.890
rs4667108	G/G	-1.576	-6.065	2.912	0.490	-0.419	-8.005	7.167	0.913	-2.794	-8.492	2.903	0.335
	T/T	Ref.				Ref.				Ref.			
rs9333290	T/C	-2.711	-5.468	0.045	0.054	-1.519	-6.369	3.331	0.537	-2.929	-6.359	0.500	0.094
	C/C	-5.358	-9.360	-1.357	0.009	-4.384	-11.336	2.567	0.214	-5.591	-10.539	-0.644	0.027
rs7589470	G/G	Ref.				Ref.				Ref.			
	T/G	-0.029	-2.762	2.704	0.983	1.442	-3.356	6.241	0.553	-0.594	-3.941	2.754	0.727
rs7565633	T/T	0.224	-4.019	4.466	0.918	-1.913	-8.188	4.362	0.548	1.770	-4.097	7.636	0.553
	A/A	Ref.				Ref.				Ref.			
rs2595389	G/A	0.575	-2.374	3.524	0.702	2.916	-2.376	8.208	0.278	-0.454	-4.035	3.127	0.803
	G/G	1.406	-2.346	5.157	0.462	0.779	-5.115	6.673	0.794	1.718	-3.232	6.668	0.495
rs12620821	A/A	Ref.				Ref.				Ref.			
	G/A	-0.100	-2.955	2.755	0.945	1.744	-3.517	7.004	0.513	-0.735	-4.175	2.706	0.674
rs11902171	G/G	0.422	-3.332	4.176	0.825	0.977	-5.155	7.109	0.753	-0.077	-4.861	4.707	0.975
	T/T	Ref.				Ref.				Ref.			
rs12620821	G/T	1.464	-1.569	4.496	0.343	3.011	-2.272	8.294	0.262	0.874	-2.898	4.646	0.649
	G/G	0.953	-2.711	4.618	0.609	4.265	-1.548	10.078	0.149	-1.517	-6.262	3.228	0.530
rs11902171	A/A	Ref.				Ref.				Ref.			
	G/A	-2.406	-5.351	0.540	0.109	-0.867	-5.810	4.077	0.729	-3.255	-6.971	0.461	0.086
rs11902171	G/G	-3.649	-7.318	0.019	0.051	0.470	-6.033	6.973	0.887	-5.468	-9.967	-0.970	0.017
	G/C	-0.294	-3.049	2.461	0.834	-1.854	-6.749	3.040	0.455	0.530	-2.825	3.884	0.756
rs11902171	C/C	1.872	-2.912	6.656	0.442	3.342	-4.405	11.088	0.395	0.617	-5.513	6.746	0.843

SNP, Σημειακός νουκλεοτεϊδικός πολυμορφισμός; ITGAV, ιντεγρίνη AV; ΕΕΑ, Ενδοεγκεφαλική αιμορραγία.; CI, διάστημα αξιοπιστίας; B, συντελεστής παλινδρόμησης; Ref, γονότυπος αναφοράς (Wt/Wt); Στατιστικά σημαντικές τιμές εμφανίζονται με έντονη γραμματοσειρά

Πίνακας 10: Ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης της εστιακής μετάλλαξης για τα SNPs του ITG8B με την ηλικία εμφάνισης ΕΕΑ(και υποτύπων)													
SNPs	Γονότυποι	ICH				Lobar ICH				Non-lobar ICH			
		B	95%CI		p	B	95%CI		p	B	95%CI		p
			Κατώτερο όριο	Ανώτερο όριο			Κατώτερο όριο	Ανώτερο όριο			Κατώτερο όριο	Ανώτερο όριο	
rs206198	G/G	Ref.				Ref.				Ref.			
	G/A	1.657	-1.200	4.514	0.255	2.807	-2.214	7.828	0.271	1.051	-2.452	4.553	0.555
rs7456987	A/A	3.978	0.313	7.643	0.033	2.987	-3.199	9.172	0.341	4.547	-0.025	9.118	0.051
	T/T	Ref.				Ref.				Ref.			
rs3757725	T/G	-0.378	-3.391	2.635	0.805	-0.784	-6.081	4.513	0.770	-0.257	-3.935	3.420	0.891
	G/G	3.356	-0.313	7.025	0.073	0.869	-5.287	7.025	0.781	4.761	0.162	9.360	0.043
rs10251386	G/C	Ref.				Ref.				Ref.			
	C/C	-0.763	-3.518	1.992	0.586	1.343	-3.395	6.081	0.576	-2.027	-5.429	1.374	0.242
rs3807941	T/T	5.153	-0.753	11.059	0.087	3.976	-6.480	14.432	0.453	5.854	-1.295	13.004	0.108
	T/C	Ref.				Ref.				Ref.			
rs10239099	C/C	-3.910	-6.540	-1.281	0.003655	-4.911	-9.324	-0.497	0.029	-3.354	-6.636	-0.072	0.045
	T/C	-0.680	-5.655	4.296	0.788	5.474	-3.487	14.436	0.229	-3.017	-9.000	2.967	0.322
rs3757727	C/C	Ref.				Ref.				Ref.			
	T/T	0.327	-2.768	3.423	0.835	-2.518	-7.993	2.957	0.365	1.563	-2.203	5.329	0.414
rs717861	T/T	2.657	-0.956	6.270	0.149	0.094	-6.130	6.318	0.976	3.822	-0.632	8.275	0.092
	G/G	Ref.				Ref.				Ref.			
rs752474	G/C	-4.532	-7.182	-1.882	0.000848	-6.215	-10.803	-1.626	0.008	-3.567	-6.835	-0.299	0.033
	C/C	-2.572	-7.337	2.193	0.289	-1.918	-10.415	6.578	0.656	-2.608	-8.376	3.161	0.374
rs2107129	T/T	Ref.				Ref.				Ref.			
	T/C	-3.544	-6.370	-0.717	0.014	-3.951	-8.703	0.801	0.102	-3.141	-6.702	0.419	0.083
rs717861	C/C	-3.648	-7.757	0.462	0.082	-3.491	-10.892	3.911	0.353	-3.282	-8.274	1.710	0.197
	T/T	Ref.				Ref.				Ref.			
rs752474	T/C	-1.115	-4.010	1.781	0.450	-3.221	-8.211	1.768	0.204	0.299	-3.277	3.876	0.869
	C/C	3.245	-0.517	7.007	0.091	0.337	-5.965	6.640	0.916	5.191	0.496	9.886	0.030
rs739752	T/T	Ref.				Ref.				Ref.			
	T/C	-3.795	-6.589	-1.002	0.008	-4.009	-8.928	0.911	0.109	-3.754	-7.171	-0.337	0.031
rs739752	T/T	-4.144	-8.265	-0.023	0.049	-1.977	-8.764	4.811	0.566	-5.770	-10.998	-0.542	0.031
	G/G	Ref.				Ref.				Ref.			
rs739752	G/C	-4.004	-7.072	-0.937	0.011	-2.166	-7.549	3.218	0.428	-5.046	-8.808	-1.283	0.009
	C/C	-3.946	-7.699	-0.193	0.039	-2.214	-8.848	4.420	0.510	-4.735	-9.305	-0.164	0.042
rs739752	G/G	Ref.				Ref.				Ref.			
	T/G	-0.034	-2.713	2.645	0.980	3.114	-1.574	7.802	0.191	-1.637	-4.910	1.636	0.326
rs739752	T/T	6.258	0.787	11.729	0.025	9.026	1.137	16.915	0.025	3.221	-4.503	10.946	0.412

SNP, Σημειακός νουκλεοτεϊδικός πολυμορφισμός; ITG8B, ιντεγρίνη Β8; ΕΕΑ, Ενδοεγκεφαλική αιμορραγία.; CI, διάστημα αξιοπιστίας; B, συντελεστής παλινδρόμησης; Ref, γονότυπος αναφοράς (Wt/Wt); Στατιστικά σημαντικές τιμές εμφανίζονται με έντονη γραμματοσειρά

Ο υπολογισμός του γενικευμένου λόγου πιθανοτήτων για την ανίχνευση επίδρασης του ελάσσονος αλληλόμορφου στο mRS εξαμήνου ανέδειξε ότι ο C αλληλόμορφος στο rs3911238 του ITGAV γονιδίου σχετίζεται με στατιστικά σημαντικά χαμηλότερο mRS εξαμήνου. Σε αντιδιαστολή, η παρουσία του αλληλόμορφου C στην rs752474 θέση του ITGB8 γονιδίου, σχετίστηκε με δυσμενέστερη έκβαση. (Πίνακες 11 και 12)

**Πίνακας 11:** Γενικευμένος λόγος πιθανοτήτων για δυσμενέστερο mRS 6μήνου, για τους ελλάσσονες αλληλίου των SNPs του ITGAV γονιδίου

SNPs	Ελάσσων αλληλίου	OR <sub>G</sub>	Κατώτερο όριο	Ανώτερο όριο
rs3911239	C	1.321	0.961	1.01
rs3911238	C	<b>0.63</b>	<b>0.427</b>	<b>0.929</b>
rs7596996	G	1.2	0.873	1.663
rs7585471	G	0.789	0.533	1.167
rs4667108	C	1.068	0.733	1.476
rs9333290	T	1.307	0.924	1.85
rs7589470	G	1.134	0.822	1.565
rs7565633	G	1.16	0.845	1.601
rs2595389	T	1.153	0.843	1.578
rs12620821	G	1.20	0.862	1.696
rs11902171	C	0.941	0.664	1.336

SNP, Σημειακός νουκλεοτεϊδικός πολυμορφισμός; ITGAV, ιντεγρίνη AV ; OR<sub>G</sub>: Γενικευμένος λόγος πιθανοτήτων; Στατιστικά σημαντικές τιμές εμφανίζονται με έντονη γραμματοσειρά

**Πίνακας 12:** Γενικευμένος λόγος πιθανοτήτων για δυσμενέστερο mRS 6μήνου, για τους ελλάσσονες αλληλίου των SNPs του ITGB8 γονιδίου

SNPs	Ελάσσων αλληλίου	OR <sub>G</sub>	Κατώτερο όριο	Ανώτερο όριο
rs206198	A	0.934	0.671	1.99
rs7456987	G	0.873	0.625	1.22
rs3757725	C	1.276	0.881	1.84
rs10251386	C	1.368	0.953	1.964
rs3807941	C	0.827	0.59	1.159
rs10239099	C	1.187	0.83	1.698
rs3757727	C	0.766	0.528	1.112
rs2107129	T	0.733	0.519	1.033
rs717861	T	1.323	0.93	1.883
rs752474	C	<b>1.576</b>	<b>1.114</b>	<b>2.229</b>
rs739752	T	1.242	0.866	1.78

SNP, Σημειακός νουκλεοτεϊδικός πολυμορφισμός; ITGB8, ιντεγρίνη B8 ; OR<sub>G</sub>: Γενικευμένος λόγος πιθανοτήτων; Στατιστικά σημαντικές τιμές εμφανίζονται με έντονη γραμματοσειρά

## Συζήτηση

Η παρούσα διατριβή, αξιολόγησε ένα σχετικά μεγάλο πληθυσμό και κατέδειξε ότι δυο συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί του ITGB8 γονιδίου οι rs10251386 και rs10239099, επηρεάζουν σημαντικά την ηλικία εμφάνισης ΕΕΑ. Επιπρόσθετα το rs7565633 tag SNP του ITGAV γονιδίου φάνηκε να επηρεάζει τον κίνδυνο εμφάνισης λοβώδους ΕΕΑ. Σύμφωνα με όσα γνωρίζουμε καμία άλλη μελέτη δεν έχει εξετάσει την επίδραση των πολυμορφισμών των γονιδίων αυτών στον κίνδυνο εμφάνισης ΕΕΑ. Οι προηγούμενες γενετικές μελέτες στην ΕΕΑ έχουν εντοπίσει γονιδιακές παραλλαγές που προδιαθέτουν σε ΕΕΑ επιδρώντας στα αγγειακά τοιχώματα, στο μεταβολισμό των λιπιδίων, στη φλεγμονή, στην πήξη και στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης.<sup>32,34,35,63</sup> Η παρούσα διατριβή εστίασε σε γενετικές παραλλαγές που επηρεάζουν τις δομικές ιδιότητες των εγκεφαλικών αγγείων. Οι ιντεγκρίνες AV και B8 συγκεκριμένα εμπλέκονται σε αρκετούς σχετικούς μηχανισμούς όπως η σταθερότητα των ενδοθηλιακών κυτταρικών συνδέσεων, η συγκόλληση του ενδοθηλίου στους περιαγγειακούς ποδίσκους των αστροκυττάρων και στη λειτουργική και δομική ακεραιότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού.<sup>80,81</sup>

Ένας ικανός αριθμός διαφορετικών μελετών αναφέρει ότι πειραματόζωα στα οποία τα γονίδια ITGAV και ITGB8 έχουν τεθεί εκτός λειτουργίας αναπτύσσουν ελαττωματική αγγειογέννηση και αγγειακές δυσπλασίες που τελικά οδηγούν σε ΕΕΑ στις εν τω βάθει εγκεφαλικές δομές αλλά και στο φλοιό.<sup>82,83,84</sup> Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης το γεγονός ότι η στοχευμένη διαγραφή των γονιδίων ITGAV και ITGB8 μόνο στα νευρικά και γλοιακά κύτταρα και όχι στα ενδοθηλιακά είχε σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση ΕΕΑ. Από τις μελέτες αυτές υποδεικνύεται ότι η κύρια συνεισφορά των ιντεγκρινών AV και B8 στην δομική ακεραιότητα της εγκεφαλικής μικροκυκλοφορίας διαμεσολαβείται από την παρουσία των ιντεγκρινών αυτών στα γλοιακά και νευροεπιθηλιακά κύτταρα.<sup>83,93</sup>

Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο παραλλαγές των γονιδίων ITGAV και ITGB8 επηρεάζουν την παθοφυσιολογία της ΕΕΑ, δεν έχει πλήρως διαφωτιστεί. Υπάρχει μόνο ένας περιορισμένος αριθμός μελετών που διερευνά τον ρόλο των ιντεγκρινών AV και B8 σε συγκεκριμένα νοσήματα και στην ακεραιότητα των

αγγείων. Σε μία πρόσφατη μελέτη σε ασθενείς με εγκεφαλικές αρτηριοφλεβικές δυσπλασίες οι ερευνητές εξέτασαν την επίδραση των πολυμορφισμών των tag SNP στην περιοχή του εσόνιου 1 του γονιδίου ITGB8 που αποτυπώνουν τη ποικιλομορφία της περιοχής του υποκινητή του γονιδίου.<sup>94</sup> Περιέγραψαν δυο πολυμορφισμούς του γονιδίου τον rs10486391 και τον rs11982847 που είχανε σημαντική επίδραση στην εμφάνιση εγκεφαλικών δυσπλασιών, μεταβάλλοντας τα επίπεδα έκφρασης της B8 στους ιστούς. Η ίδια περιοχή του ITGB8 γονιδίου και συγκεκριμένα η rs10251386 εντός του εσόνιου 1, αναδείχτηκε ως σημαντική και στη δική μας μελέτη. Η περιοχή αυτή έχει έκταση 24,4 kb (χιλιάδες βάσεις), έχει άκρα στα rs11982847 και rs10251386 που βρίσκονται σε πλήρη ανισορροπία σύνδεσης ( $D' = 1$ ,  $r^2 = 0.836$ ) σύμφωνα με το HarMap και φαίνεται ότι αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό τμήμα του ITGB8 γονιδίου που ρυθμίζει την έκφραση του.<sup>94</sup> Είναι πιθανό, παραλλαγές σε αυτή την περιοχή να καθιστούν τα υποκείμενα πιο επιρρεπή στην εμφάνιση μικροαγγειακών διαταραχών στον εγκέφαλο και κατ' επέκταση στην εμφάνιση ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας σε νεότερη ηλικία.

Ο rs10239099 πολυμορφισμός που βρήκαμε ότι σχετίζεται με την ηλικία έναρξης της ΕΕΑ, βρίσκεται στο εσόνιο 3 του δευτέρου τμήματος (LD block) του δείγματος μας και σε πλήρη ανισορροπία σύνδεσης ( $D' = 1$ ) με τα 3 SNP του εσόνιου 1 (rs10486391, rs11982847, rs10251386), οπότε πιθανότατα δεν αντιπροσωπεύει κάποιο ανεξάρτητο σήμα.

Η παρούσα μελέτη κατέδειξε επίσης μια συσχέτιση μεταξύ της λοβώδους εγκεφαλικής αιμορραγίας και του rs7565633 που εντοπίζεται στο εσόνιο 17-18 του γονιδίου ITGAV. Το γεγονός ότι το rs7565633 επηρέασε μόνο τον κίνδυνο λοβώδους ΕΕΑ συνηγορεί υπέρ της ύπαρξης διαφορετικών παθοφυσιολογικών μηχανισμών μεταξύ λοβώδους και μη λοβώδους ΕΕΑ.<sup>95</sup> Το κύριο ιστοπαθολογικό χαρακτηριστικό στους ασθενείς με λοβώδη ΕΕΑ είναι η αμυλοειδική αγγειοπάθεια. Στην βιβλιογραφία υπάρχουν ορισμένες αναφορές για τις πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της AV ιντεγκρίνης και του β-αμυλοειδούς. Αξίζει να σημειωθεί ότι η AV ιντεγκρίνη έχει εμπλακεί ως ένας κρίσιμος διαμεσολαβητής της τοξικής επίδρασης των αντισωμάτων στους νευρώνες και στις συνάψεις.<sup>96,97</sup> Είναι λοιπόν πιθανό παραλλαγές του ITGAV να προδιαθέτουν σε αυξημένη τοξικότητα των εναποθέσεων αμυλοειδούς στο αγγειακό δίκτυο του εγκεφάλου και συνεπακόλουθα αυξημένο

κίνδυνο λοβώδους ΕΕΑ. Συνεπάγεται ότι η ITGAV θα μπορούσε να αποτελέσει στόχο για μελλοντικές θεραπευτικές παρεμβάσεις.

Ο ρόλος των ιντεγκρινών στην αποκατάσταση της νευρωνικής βλάβης αποτελεί πεδίο εντατικής μελέτης την τελευταία δεκαετία.<sup>104</sup> Η λειτουργία τους ή των υποδοχέων τους αποκαλύπτεται σταδιακά και πολλές από αυτές αποτελούν ήδη θεραπευτικούς στόχους.<sup>104,105,106</sup> Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, πολυμορφισμοί του rs3911238 που βρίσκεται στο εσόνιο 2-3 του ITGAV γονιδίου και του rs752474 εντός του εσονίου 10-11 του ITGB8 γονιδίου, επιδρούν στη έκβαση της ΕΕΑ. Οι συγκεκριμένες ιντεγκρίνες δεν έχουν ακόμα μελετηθεί διεξοδικά σε μοντέλα νευρωνικής βλάβης. Ενδεχομένως θα μπορούσαν να αποτελέσουν αντικείμενο μελλοντικών ερευνών.

Σύμφωνα με την ισχυρή συσχέτιση που ανακύπτει στην παρούσα διατριβή, θα περιμέναμε ότι οι μελέτες συσχέτισης γονιδιωματικής κλίμακας (Genome Wide Association Studies, GWAS), θα είχαν αποκαλύψει την συμβολή των γονιδίων ITGAV και ITGB8 στην εμφάνιση ΕΕΑ. Υπάρχουν πάραυτα αρκετές πιθανές εξηγήσεις για αυτή την ασυμφωνία, όπως για παράδειγμα τα πολύ αυστηρά όρια σημαντικότητας που ισχύουν για τις μελέτες αυτού του τύπου ( $\leq 5 \times 10^{-8}$ ) και η ποικιλομορφία των αλληλίων μεταξύ διαφορετικών εθνοτικών ομάδων. Επίσης θα πρέπει να αναφερθεί το γεγονός ότι σύμφωνα με δοκιμαστικές προσμοιάσεις στις GWAS μελέτες το μέγεθος του πληθυσμού θα πρέπει να είναι ιδιαίτερα μεγάλο (~10,000 άτομα ανά ομάδα) προκειμένου να μεγιστοποιηθεί η ικανότητα ανίχνευσης πραγματικών συσχετίσεων για τους συνήθεις πολυμορφισμούς.<sup>98</sup>

Η παρούσα διατριβή φέρει συγκεκριμένους περιορισμούς. Είναι μια γενετική μελέτη ασθενών-μαρτύρων που φέρει όλους τους εγγενείς περιορισμούς μιας αναδρομικής ανάλυσης προοπτικά συλλεγόμενων δεδομένων. Επιπλέον, η πιθανότητα συστηματικού σφάλματος επιλογής (selection bias), σε ασθενείς και μάρτυρες δεν μπορεί να αποκλειστεί. Τέλος τα αποτελέσματά μας θα ήταν στιβαρότερα εάν είχαν επιβεβαιωθεί σε ένα ανεξάρτητο δείγμα ή σε μια υπολογιστική μετά-ανάλυση μιας GWA μελέτης.

Εν κατακλείδι η διατριβή αυτή προσφέρει ενδείξεις για μια πιθανή επίδραση των σημειακών νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών στα γονίδια ITGAV και ITGB8 στον κίνδυνο εμφάνισης λοβώδους ΕΕΑ και στην πρώιμη εμφάνιση ΕΕΑ αντίστοιχα.

Οι συσχετίσεις αυτές μπορεί να έχουν φαρμακογενετικές εφαρμογές, καθώς η αναστολή των ιντεγκρινών και η αναστολή της αδρανοποίησης τους έχουν προταθεί σαν πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι.<sup>99,100</sup>

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τον αναδρομικό σχεδιασμό της παρούσας ανάλυσης, τα ευρήματα αυτά θα πρέπει να αναπαραχθούν σε άλλους πληθυσμούς και περαιτέρω μελέτες, ειδικά σε πειραματικά μοντέλα, ούτως ώστε να κατανοήσουμε καλύτερα τον ρολό των πολυμορφισμών των ITGAV και ITGB8 γονιδίων στην παθοφυσιολογία της αγγειακής βλάβης και της ενδοεγκεφαλικής αιμορραγίας



## BIBΛIOΓPAΦIA

1. Sacco S, Marini C, Toni D, Olivieri L, Carolei A. Incidence and 10-year survival of intracerebral hemorrhage in a population-based registry. *Stroke*. 2009 Feb;40(2):394-9.
2. Taylor TN, Davis PH, Tornos JC: "Projected number of stroke by subtype in the year 2050 in the United States." *Stroke* 1998;29:322
3. Skidmore CT, Andrefsky J: "Spontaneous intracerebral hemorrhage: epidemiology, pathophysiology and medical management." *Neurosurg Clin North Am* 2000;13(3):282-288
4. Broderick JP, Brott T, Tomsick T, Huster G, Miller R: "The risk of subarachnoid and intracerebral hemorrhages in blacks as compared with whites." *N Engl J Med* 1992;326:733-6
5. Garcia JH<sup>1</sup>, Ho KL. Pathology of hypertensive arteriopathy. *Neurosurg Clin N Am*. 1992 Jul;3(3):497-507.
6. Fazekas F<sup>1</sup>, Kleinert R, Roob G, Kleinert G, Kapeller P, Schmidt R, Hartung HP. Histopathologic analysis of foci of signal loss on gradient-echo T2\*-weighted MR images in patients with spontaneous intracerebral hemorrhage: evidence of microangiopathy-related microbleeds. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1999 Apr;20(4):637-42.
7. Cordonnier C<sup>1</sup>, Al-Shahi Salman R, Wardlaw J. Spontaneous brain microbleeds: systematic review, subgroup analyses and standards for study design and reporting. *Brain*. 2007 Aug;130(Pt 8):1988-2003.
8. Jeerakathil T, Wolf PA, Beiser A, Hald JK, Au R, Kase CS, Massaro JM, DeCarli C. Cerebral microbleeds: prevalence and associations with cardiovascular risk factors in the Framingham Study. *Stroke*. 2004 Aug;35(8):1831-5. Epub 2004 May 20.
9. Panagos PD, Jauch EC, Broderick JP: "Intracerebral hemorrhage." *Emerg Med Clin N Am* 2002;20:631-655
10. Vinters H.: "Cerebral amyloid angiopathy: a critical review." *Stroke* 1987;18: 311-24
11. Greenberg SM, Vonsattel JP, Stakes JW, Gruber M, Finklestein Sp.: "The clinical spectrum of cerebral amyloid angiopathy: presentations without lobar hemorrhage." *Neurology* 1993;43:2073-2079
12. Masson RL, Day AL: "Aneurysmal intracerebral hemorrhage." *J Neurosurg* 1993;3:539-50
13. Barnes B, Cawley CM, Barrow D: "Intracerebral hemorrhage secondary to vascular lesions." *Neurosurg Clin North Am* 2000;13(3):289-297
14. Kaufman HH: "Spontaneous intraparenchymal brain hemorrhage" in "Neurosurgery", 2<sup>nd</sup> edition by Robert H. Wilkins, Setti S. Rengachary, pp2567-2585
15. Woo D and Broderick JP: "Spontaneous intracerebral Hemorrhage: Epidemiology and Clinical Presentation." *Neurosurg Clin North Am* 2000;13(3):265-279
16. Brown RDJ, Wiebers DO, Torner JC et al.: "Frequency of intracranial hemorrhage as a presenting symptom and subtype analysis: a population-based study of intracranial vascular malformations in Olmsted County, Minnesota." *J Neurosurg* 1996;85:29-32
17. Zhang XH, Wang QM, Chen H et al, Clinical characteristics and risk factors of Intracranial hemorrhage in patients following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Hematol*. 2016 Oct;95(10):1637-43.
18. Zanon E, Iorio A, Rocino A, Artoni A, et al. Intracranial haemorrhage in the Italian population of haemophilia patients with and without inhibitors. *Haemophilia*. 2012 Jan;18(1):39-45.
19. Aygum N, Masaryk TJ: "Diagnostic imaging for intracerebral hemorrhage." *Neurosurg Clin North Am* 2000;13(3):313-334
20. Schrader B, Barth H, Lang EW, Buhl R, Hugo HH, Biederer J, Mehdorn HM. Spontaneous intracranial haematomas caused by neoplasms. *Acta Neurochir (Wien)*. 2000;142(9):979-85.
21. Lapsiwala S, Moftakhar R, Badie B: "Drug-induced intraparenchymal hemorrhage." *Neurosurg Clin North Am* 2000;13(3):299-312
22. Vanassche T, Hirsh J, Eikelboom JW, Ginsberg JS. Organ-specific bleeding patterns of anticoagulant therapy: lessons from clinical trials. *Thromb Haemost*. 2014 Nov;112(5):918-23.
23. García Rodríguez LA, Martín-Pérez M, Hennekens CH, Rothwell PM, Lanás A. Bleeding Risk with Long-Term Low-Dose Aspirin: A Systematic Review of Observational Studies. *PLoS One*. 2016 Aug 4;11(8)
24. Enomoto Y, Yoshimura S, Egashira Y, Yamagami H, Sakai N The Risk of Intracranial Hemorrhage in Japanese Patients with Acute Large Vessel Occlusion; subanalysis of the RESCUE-Japan registry. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2016 May;25(5):1076-80.

25. Martin-Schild S, Albright KC, Halleivi H, Barreto AD, Philip M, Misra V, Grotta JC, Savitz SI. Intracerebral hemorrhage in cocaine users. *Stroke*. 2010 Apr;41(4):680-4.
26. Yoon BW, Bae HJ, Hong KS, Lee SM, et al. Phenylpropanolamine contained in cold remedies and risk of hemorrhagic stroke. *Neurology*. 2007 Jan 9;68(2):146-9.
27. Paciaroni M, Agnelli G, Corea F, et al. Early hemorrhagic transformation of brain infarction: rate, predictive factors, and influence on clinical outcome: results of a prospective multicenter study. *Stroke*. 2008 Aug;39(8):2249-56.
28. Foulkes MA, Wolf PA, Price TR, Mohr JP, Hier DB: "The Stroke Data Bank: design, methods, and baseline characteristics." *Stroke* 1988;19:547-54
29. Yoshimatsu J, Ikeda T, Katsuragi S, et al. Factors contributing to mortality and morbidity in pregnancy-associated intracerebral hemorrhage in Japan *J Obstet Gynaecol Res*. 2014 May;40(5):1267-73
30. Biffi A<sup>1</sup>, Anderson CD, Falcone GJ, et al; International Stroke Genetics Consortium. Novel insights into the genetics of intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 2013 Jun;44(6 Suppl 1):S137.
31. Tzourio C, Arima H, Harrap S, Anderson C, Godin O, Woodward M, Neal B, Bousser MG, Chalmers J, Cambien F, MacMahon S. APOE genotype, ethnicity, and the risk of cerebral hemorrhage. *Neurology*. 2008 Apr 15;70(16):1322-8.
32. Dardiotis E, Jagiella J, Xiromerisiou G, Dardioti M, Vogiatzi C, Urbanik A, Paterakis K, Komnos A, Fountas KN, Slowik A, Hadjigeorgiou GM: Angiotensin-converting enzyme tag single nucleotide polymorphisms in patients with intracerebral hemorrhage. *Pharmacogenetics and genomics* 2011;21:136-141
33. Jeanne M, Labelle-Dumais C, Jorgensen J, Kauffman WB, Mancini GM, Favor J, Valant V, Greenberg SM, Rosand J, Gould DB. COL4A2 mutations impair COL4A1 and COL4A2 secretion and cause hemorrhagic stroke. *Am J Hum Genet*. 2012 Jan 13;90(1):91-101.
34. Dardiotis E, Hadjigeorgiou GM, Dardioti M, Scarneas N, Paterakis K, Aggelakis K, Komnos A, Tasiou A, Xiromerisiou G, Gabranis I, Zintzaras E, Papadimitriou A, Karantanas A: Alpha-1 antichymotrypsin gene signal peptide a/t polymorphism and primary intracerebral hemorrhage. *European neurology* 2008;59:307-314.
35. Jagiella J, Dardiotis E, Gasowski J, Pera J, Dziedzic T, Klimkowicz-Mrowiec A, Golenia A, Wnuk M, Fountas K, Paterakis K, Hadjigeorgiou G, Slowik A: The fga thr312ala polymorphism and risk of intracerebral haemorrhage in polish and greek populations. *Neurologia i neurochirurgia polska* 2014;48:105-110.
36. Hu X, Tao C, Xie Z, Li Y, Zheng J, Fang Y, Lin S, Li H, You C. The MTHFR C677T Polymorphism and Risk of Intracerebral Hemorrhage in a Chinese Han Population. *Med Sci Monit*. 2016 Jan 12;22:127-33.
37. Thrift AG, Dewey HM, MacDonell RAL, McNeil JJ, Donnan GA: "Incidence of the major stroke subtypes. Initial findings from the North East Melbourne Stroke Incidence Study (NEMESIS)." *Stroke* 2001;32:1732-1738
38. Qureshi AI, Giles WH, Croft JB. : "Racial differences in the incidence of intracerebral hemorrhage: effects of blood pressure and education." *Neurology* 1999;52:1617-1621
39. Warlow CP: "Epidemiology of stroke." *Lancet* 1998;352:(suppl III) 1-4
40. Florczak-Rzepka M, Grond-Ginsbach C, Montaner J, Steiner T. Matrix metalloproteinases in human spontaneous intracerebral hemorrhage: an update. *Cerebrovasc Dis*. 2012;34(4):249-62.
41. Olivot JM, Mlynash M, Kleinman JT, Straka M, et al. MRI profile of the perihematomal region in acute intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 2010 Nov;41(11):2681-3.
42. Menon RS, Burgess RE, Wing JJ, et al. Predictors of highly prevalent brain ischemia in intracerebral hemorrhage. *Ann Neurol*. 2012 Feb;71(2):199-205.
43. Broderick JP, Adams HP Barsan W, Feinberg W, Feldmann E, Grotta J et al: A Statement for Healthcare Professionals From a Special Writing Group of the Stroke Council, American Heart Association
44. Qureshi AI, Tuhim S, Broderick JP, Batjer H, Hondo H, Hanley DF: "Spontaneous intracerebral hemorrhage." *N Engl J Med* 2001;344(19):1450-1460
45. Fiebach JB, Schellinger PD, Gass A, et al. Stroke magnetic resonance imaging is accurate in hyperacute intracerebral hemorrhage: a multicenter study on the validity of stroke imaging. *Stroke* 2004 Feb;35(2):502-6.
46. Hemphill JC 3rd, et al. Guidelines for the Management of Spontaneous Intracerebral Hemorrhage: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2015 Jul;46(7):2032-60.

47. Ropper AH. Management of raised intracranial pressure and hyperosmolar therapy. *Pract Neurol*. 2014 Jun;14(3):152-8.
48. McDonald C, Carter BS: "Medical management of increased intracranial pressure after spontaneous intracerebral hemorrhage." *Neurosurg Clin North Am* 2000;13(3):335-338
49. Zuccarello M, Andaluz N, Wagner KR: "Minimally invasive therapy for intracerebral hematomas." *Neurosurg Clin North Am* 2000;13(3): 349-354
50. Fujii Y, Takeuchi S, Sasaki O, Minakawa T, Tanaka R: "Multivariate analysis of predictors of hematoma enlargement in spontaneous intracerebral hemorrhage." *Stroke* 1998;29:1160-1166
51. Silva Y, Leira R, Tejada J., et al. Molecular signatures of vascular injury are associated with early growth of intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 2005 Jan;36(1):86-91.
52. MacWalter RS, Ersoy Y, Wolfson DR: "Cerebral haemorrhage." *Gerontology* 2001;47:119-130
53. Nilsson OG, Lindgren A., Brandt L., Saveland H.: "Prediction of death in patients with intracerebral hemorrhage: a prospective study of a defined population." *J Neurosurg* 2002;97:531-536
54. Shaya M, Dubey A, Berg C, Toledo EG, Zhang J, Gloria C, Nanda A: "Factors influencing outcome in intracerebral hematoma: a simple, reliable, and accurate method to grade intracerebral hemorrhage." *Surg Neurol* 2005;63:343-48
55. Juvela S: "Risk factors for impaired outcome after spontaneous intracerebral hemorrhage." *Arch Neurol* 1995;52:1193-1200
56. Hill M.D., Silver F.L., Austin P.C., Jack V.: "Rate of stroke recurrence in patients with primary intracerebral hemorrhage." *Stroke* 2000;31(1):123-7
57. Niu YM, Weng H, Zhang C, et al. Systematic Review by Multivariate Meta-analyses on the Possible Role of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Gene Polymorphisms in Association with Ischemic Stroke. *Neuromolecular Med*. 2015 Dec;17(4):373-84
58. Ma J, Li H, You C, Liu Y, Ma L, Huang S. Blood coagulation factor XIII-A subunit Val34Leu polymorphisms and intracerebral hemorrhage risk: A meta-analysis of case-control studies. *Br J Neurosurg*. 2015;29(5):672-7
59. Kumar P, Misra S, Kumar Yadav A, Kumar A, Sriwastva M, Prasad K. Relationship between Interleukin-6 (-174G/C and -572C/G) Promoter Gene Polymorphisms and Risk of Intracerebral Hemorrhage: A Meta-Analysis. *Pulse (Basel)*. 2016 Sep;4(2-3):61-68.
60. Topol EJ. The genetics of heart attack. *Heart*. 2006;92:855-861.
61. <http://www.internationalgenome.org/data/>. [Accessed on Oct 26, 2016].
62. Lökvist H, Olsson S, Höglund P, et al. A large-sample assessment of possible association between ischaemic stroke and rs12188950 in the PDE4D gene. *Eur J Hum Genet*. 2012 Jul; 20(7):783-9
63. Falcone GJ, Malik R, Dichgans M, Rosand J. Current concepts and clinical applications of stroke genetics. *Lancet Neurol*. 2014 Apr; 13(4):405-18.
64. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002; 110(6):673-87.
65. Larson RS, Corbi AL, Berman L, and Springer T. Primary structure of the leukocyte function-associated molecule-1 alpha subunit: an integrin with an embedded domain defining a protein superfamily. *J. Cell Biol*. 1989; 108(2):703-12.
66. Humphries MJ, Symonds E, and Mould AP. Mapping functional residues onto integrin crystal structures. *Curr. Opin. Struct. Biol*. 2003; 13(2):236-43.
67. Luo BH, Carman CV, Springer TA. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol*. 2007; 25():619-47.
68. Humphries MJ. Integrin structure. *Biochem. Soc. Trans*. 2000; 28(4):311-39.
69. Lau T, Kim C, Ginsberg MH, and Ulmer TS. The structure of the integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 transmembrane complex explains integrin transmembrane signalling. *EMBO J*. 2009; 28(9):1351-61.
70. Geiger B, Spatz JP, and Bershadsky AD. Environmental sensing through focal adhesions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2009; 10(1):21-33.
71. Tohyama Y, Katagiri K, Pardi R, Lu C, Springer TA, and Kinashi T. The critical cytoplasmic regions of the  $\alpha$ L/ $\beta$ 2 integrin in Rap1-induced adhesion and migration. *Mol. Biol. Cell* 2003; 14(6):2570-82.
72. Gahmberg CG, Fagerholm SC, Nurmi SM, Chavakis T, Marchesan S, and Grönholm M. Regulation of integrin activity and signalling. *Biochim. Biophys. Acta* 2009; 1790(6):431-44.
73. Barczyk M, Carracedo S, and Gullberg D. Integrins. *Cell Tissue Res*. 2009; 339(1):269-80.
74. Takada Y, Ye X, and Simon S. The integrins. *Genome Biol*. 2007; 8(5):215.
75. Santala P, and Heino J. Regulation of integrin-type cell adhesion receptors by cytokines. *J. Biol. Chem*. 1991; 266(34):23505-9.

76. Calderwood DA. Integrin activation. *J. Cell. Sci.* 2004; 117(Pt 5):657-66.
77. Sheppard D. In vivo functions of integrins: lessons from null mutations in mice. *Matrix Biol.* 2000; 19(3):203-9.
78. Askari JA, Tynan CJ, Webb SED, Martin-Fernandez ML, Ballestrem C, and Humphries MJ. Focal adhesions are sites of integrin extension. *J. Cell Biol.* 2010; 188(6):891-903.
79. Yu C, Rafiq NBM, Krishnasamy A, Hartman KL, Jones GE, Bershadsky AD, and Sheetz MP. Integrin-matrix clusters form podosome-like adhesions in the absence of traction forces. *Cell Rep* 2013; 5(5):1456-68.
80. Mobley AK, Tchaicha JH, Shin J, Hossain MG, McCarty JH: Beta8 integrin regulates neurogenesis and neurovascular homeostasis in the adult brain. *Journal of cell science* 2009;122:1842-1851.
81. Del Zoppo GJ, Milner R: Integrin-matrix interactions in the cerebral microvasculature. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2006;26:1966-1975.
82. McCarty, J. H., Monahan-Earley, R. A., Brown, L. F., Keller, M., Gerhardt, H., Rubin, K., Shani, M., Dvorak, H. F., Wolburg, H., Bader, B. L. et al. Defective associations between blood vessels and brain parenchyma lead to cerebral hemorrhage in mice lacking alphav integrins. *Mol. Cell. Biol.* 2002;22,7667 -7677.
83. McCarty JH, Lacy-Hulbert A, Charest A, Bronson RT, Crowley D, Housman D, Savill J, Roes J, Hynes RO: Selective ablation of alphav integrins in the central nervous system leads to cerebral hemorrhage, seizures, axonal degeneration and premature death. *Development (Cambridge, England)* 2005;132:165-176.
84. Zhu J, Motejlek K, Wang D, Zang K, Schmidt A, Reichardt LF: Beta8 integrins are required for vascular morphogenesis in mouse embryos. *Development (Cambridge, England)* 2002;129:2891-2903.
85. Tubridy N, Behan PO, Capildeo R, Chaudhuri A, Forbes R, Hawkins CP, Hughes RA, Palace J, Sharrack B, Swingle R, Young C, Moseley IF, MacManus DG, Donoghue S, Miller DH. The effect of anti-alpha4 integrin antibody on brain lesion activity in MS. *The UK Antegen Study Group Neurology.* 1999; 53: 466–472.
86. Abumiya T, Fitridge R, Mazur C, Copeland BR, Koziol JA, Tschopp JF, Pierschbacher MD, del Zoppo GJ. Integrin  $\alpha_{11b}\beta_3$  inhibitor preserves microvascular patency in experimental acute focal cerebral ischemia. *Stroke.* 2000; 31: 1402–1410.
87. Gauderman, W. J. Sample size requirements for association studies of gene-gene interaction. *American Journal of Epidemiology*, 2002;155(5), 478–484.
88. Gabriel, S. B., Schaffner, S. F., Nguyen, H., Moore, J. M., Roy, J., Blumenstiel, B., et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*, 2002;296(5576), 2225–2229.
89. Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J., & Daly, M. J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 2005;21(2), 263–265.
90. Sole, X., Guino, E., Valls, J., Iniesta, R., & Moreno, V. SNPStats: A web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*, 2006;22(15), 1928–1929.
91. Lettre, G., Lange, C., & Hirschhorn, J. N. Genetic model testing and statistical power in population-based association studies of quantitative traits. *Genetic Epidemiology*, 2007;31(4), 358–362.
92. Ziegler, A., Van Steen, K., & Wellek, S. Investigating Hardy–Weinberg equilibrium in case-control or cohort studies or metaanalysis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2011;128(1), 197–201.
93. Proctor, J. M., Zang, K., Wang, D., Wang, R., & Reichardt, L. F. Vascular development of the brain requires beta8 integrin expression in the neuroepithelium. *Journal of Neuroscience*, 2005;25(43), 9940–9948.
94. Su, H., Kim, H., Pawlikowska, L., Kitamura, H., Shen, F., Cambier, S., et al. reduced expression of integrin alphavbeta8 is associated with brain arteriovenous malformation pathogenesis. *Neuromol Med. American Journal of Pathology*, 2010;176(2), 1018–1027.
95. Sacco, R. L. Lobar intracerebral hemorrhage. *New England Journal of Medicine*, 2000;342(4), 276–279.
96. Han, H. Y., Zhang, J. P., Ji, S. Q., Liang, Q. M., Kang, H. C., Tang, R. H., et al. alphanu and beta1 Integrins mediate Abeta-induced neurotoxicity in hippocampal neurons via the FAK signaling pathway. *PLoS One*, 2014;8(6), e64839.
97. Wang, Q., Klyubin, I., Wright, S., Griswold-Prenner, I., Rowan, M. J., & Anwyl, R. Alpha v integrins mediate beta-amyloid induced inhibition of long-term potentiation. *Neurobiology of Aging*, 2008;29(10), 1485–1493.

98. Pe'er, I., Yelensky, R., Altshuler, D., & Daly, M. J. Estimation of the multiple testing burden for genomewide association studies of nearly all common variants. *Genetic Epidemiology*, 2008;32(4), 381–385.
99. Cox, D., Brennan, M., & Moran, N. Integrins as therapeutic targets: Lessons and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2010;9(10), 804–820.
100. Saharinen, P., & Ivaska, J. Blocking integrin inactivation as an anti-angiogenic therapy. *EMBO Journal*, 2015; 34(10), 1293–1295.
101. Bruno A, Shah N, Lin C, et al. "Improving modified Rankin Scale assessment with a simplified questionnaire". *Stroke*, 2010: **41** (5): 1048–50.
102. Zintzaras E. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2010;9:Article21.
103. <http://biomath.med.uth.gr>.
104. Nieuwenhuis B<sup>1</sup>, Haenzi B, et al. Integrins promote axonal regeneration after injury of the nervous system. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2018 Feb 15.
105. Ajioka I, Jinnou H, et al. Enhancement of neuroblast migration into the injured cerebral cortex using laminin-containing porous sponge. *Tissue Eng Part A*. 2015 Jan;21(1-2):193-201.
106. Teppei Fujioka, Naoko Kaneko, et al.  $\beta$ 1 integrin signaling promotes neuronal migration along vascular scaffolds in the post-stroke brain. *EBioMedicine*. 2017 Feb; 16: 195–203.

# Integrins AV and B8 Gene Polymorphisms and Risk for Intracerebral Hemorrhage in Greek and Polish Populations

Efthimios Dardiotis<sup>1</sup> · Vasileios Siokas<sup>1</sup> · Tilemachos Zafeiridis<sup>2</sup> · Konstantinos Paterakis<sup>3</sup> · Georgios Tsivgoulis<sup>4,5</sup> · Maria Dardioti<sup>1</sup> · Savas Grigoriadis<sup>6</sup> · Constantina Simeonidou<sup>7</sup> · Georgia Deretzi<sup>8</sup> · Elias Zintzaras<sup>9</sup> · Jeremiasz Jagiella<sup>10</sup> · Georgios M. Hadjigeorgiou<sup>1</sup>

Received: 7 April 2016 / Accepted: 20 July 2016  
© Springer Science+Business Media New York 2016

**Abstract** A limited number of genetic variants have been linked to the development of intracerebral hemorrhage (ICH). Integrin AV and/or B8-deficient mice were found to develop ICH. The present candidate gene association study was designed to investigate possible influence of integrin AV (ITGAV) and integrin B8 (ITGB8) gene region polymorphisms on the risk of ICH. 1015 participants (250 Greek and 193 Polish patients with primary ICH and 250 Greek and 322 Polish controls) were included in the study.

Using logistic regression analyses, 11 tag single nucleotide polymorphisms (SNPs) for ITGAV and 11 for ITGB8 gene were tested for associations with ICH risk, lobar ICH risk and non-lobar ICH after adjustment for age, gender, history of hypertension and country of origin. Linear regression models were used to test the effect of tag SNPs on the ICH age of onset. Correction for multiple comparisons was carried out. The rs7565633 tag SNP of the ITGAV gene was independently associated with the risk of lobar ICH in the codominant model of inheritance [odds ratio (95 % confidence interval (CI)) 0.56 (0.36–0.86),  $p = 0.0013$ ]. Furthermore, heterozygous individuals of the rs10251386 and the rs10239099 of the ITGB8 gene had significantly lower age of ICH onset compared to the wild-type genotypes [regression coefficient ( $b$ )  $-3.884$  (95 % CI  $-6.519$ ,

Efthimios Dardiotis and Vasileios Siokas authors have equally contributed to this study.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:[10.1007/s12017-016-8429-3](https://doi.org/10.1007/s12017-016-8429-3)) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Georgios M. Hadjigeorgiou  
gmhadji@med.uth.gr

<sup>1</sup> Laboratory of Neurogenetics, Department of Neurology, Faculty of Medicine, University of Thessaly, University Hospital of Larissa, Biopolis, Mezourlo Hill, 41100 Larissa, Greece

<sup>2</sup> Intensive Care Unit, General Hospital of Larissa, Larissa, Greece

<sup>3</sup> Department of Neurosurgery, University of Thessaly, University Hospital of Larissa, Larissa, Greece

<sup>4</sup> Second Department of Neurology, University of Athens, School of Medicine, “Attikon” University Hospital, Athens, Greece

<sup>5</sup> International Clinical Research Center, St. Anne’s University Hospital in Brno, Brno, Czech Republic

<sup>6</sup> Second Department of Neurosurgery, Hippokraton University Hospital, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece

<sup>7</sup> Department of Physiology, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece

<sup>8</sup> Department of Neurology, Papageorgiou General Hospital, Thessaloniki, Greece

<sup>9</sup> Department of Biomathematics, University of Thessaly School of Medicine, Larissa, Greece

<sup>10</sup> Department of Neurology, Medical College Jagiellonian University, Kraków, Poland

−1.249),  $p = 0.0039$  and  $b = -4.502$  (95 % CI −7.159, −1.845),  $p = 0.0009$ , respectively]. The present study provides preliminary indication for an influence of *ITGAV* gene tag SNP in the development of lobar ICH and of *ITGB8* gene variants in the age of ICH onset.

**Keywords** Integrins · *ITGAV* · *ITGB8* · Intracerebral hemorrhage · Polymorphism · Tag SNPs

## Introduction

Intracerebral hemorrhage (ICH) constitutes the second most common type of stroke after ischemic stroke (Feigin et al. 2009). Several environmental and genetic factors have been implicated in the development of ICH (Woo et al. 2002). Apart from the well-established risk factors, such as hypertension, excessive alcohol consumption and low cholesterol levels (Qureshi et al. 2001), a few emerging risk factors, such as physical activity, diet, body mass index, kidney malfunction, seem to contribute, to some degree, to the appearance of spontaneous, non-traumatic ICH (Ikram et al. 2012). In addition, a limited number of genetic variations have been related to ICH (Falcone et al. 2014; Dardiotis et al. 2008, 2011; Jagiella et al. 2014). Genetic polymorphisms may confer to ICH susceptibility by affecting several biological pathways, including regulation of blood pressure, lipid metabolism, coagulation processes and the integrity of vessel wall (Yamada et al. 2006; Rost et al. 2008).

Two distinct pathological and imaging phenotypes have been recognized in ICH: deep brain or non-lobar ICH due to lipohyalinosis and fibrinoid necrosis of small deep penetrating arteries usually as a result of longstanding hypertension (Lammie 2002) and lobar ICH due to cerebral amyloid angiopathy (CAA) of the cortical arterioles or coagulation disorders (Qureshi et al. 2001; Greenberg 2002). This biological heterogeneity in the two phenotypes was found to be differentially influenced by genetic susceptibility variants (Falcone et al. 2014).

Integrins are a large family of a type I transmembrane heterodimeric glycoprotein receptors that mediate a number of cellular functions including cell adhesion, migration and signaling (Hynes 2002). In particular, integrin AV (*ITGAV*) and integrin B8 (*ITGB8*) seem to be important for the integrity of the brain microvasculature (Mobley et al. 2009; del Zoppo and Milner 2006). A number of different studies have reported that mice knockout for *ITGAV* and/or *ITGB8* genes develop ICH (Zhu et al. 2002; Proctor et al. 2005; McCarty et al. 2005; Bader et al. 1998). We hypothesized that genetic polymorphism in the *ITGAV* and *ITGB8* that may alter the structure or function of integrins may render individuals more susceptible to ICH.

In view of the former considerations, we conducted the present case–control candidate gene association study to investigate possible influence of *ITGAV* and *ITGB8* gene region polymorphisms on the risk of ICH and the age of ICH onset.

## Materials and Methods

### Study Populations

The study population consisted of two independent Caucasian cohorts that have been previously described in detail (Jagiella et al. 2014; Dardiotis et al. 2008, 2011). In short, 500 (49.3 %) Greek participants (250 normal controls and 250 unrelated patients with ICH) admitted to the University Hospital of Larissa and 515 (50.7 %) Polish (322 normal controls and 193 unrelated patients with ICH) admitted to the University Hospital of Krakow were included in the present study. The selection of patients with primary ICH was carried out prospectively; cases with ICH due to secondary causes (including oral anticoagulants intake, cocaine intake, trauma) were excluded as previously described (Dardiotis et al. 2008, 2011; Jagiella et al. 2014). Using the initial computed tomographic scan image, patients were further subclassified as having lobar (involving the cortex and the underlying white matter) or non-lobar (located in basal ganglia, thalamus, cerebellum or brainstem) ICH. The classification of primary ICH as lobar and non-lobar was performed by attending-level radiologists who were unaware of the patient's baseline characteristics and the findings of genetic testing. Unrelated healthy controls, matched for age and sex, were recruited in each hospital mainly from patients' spouses (not necessarily the spouses of the patients with ICH), from adult visitors to hospital or hospital employees. Eligibility criterion for controls was the negative reported history related to neurological diseases (Dardiotis et al. 2011).

The respective institutional ethics committee approved the study protocol, and all participants (or close relatives) gave informed consent for inclusion into the study.

### Isolation of DNA, SNP Selection and Genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples using standard procedures (Dardiotis et al. 2014, 2015). In an attempt to cover most of the genetic variability across *ITGAV* gene (a 90.83-kbp region, 30 exons in chr2: positions 187,163,045–187,253,872) and *ITGB8* gene (a 84.65-kbp region, 14 exons in chr7: positions 20,337,250–20,421,903), tag SNPs were identified on the basis of LD blocks according to HapMap project (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>) using tagger genetic

program (<http://www.broadinstitute.org/mpg/tagger>). Selection of tagging SNPs was based on a pairwise approach in the HapMap-CEU population database for CEU population (Release 27, Phase II + III, Feb09, on NCBI B36 assembly, dbSNP b126) using criteria of  $r^2$  greater than or equal to 0.8 and minor allele frequency (MAF) of more than 0.05. In total 11 tag SNPs were extracted in each. The positions of tag SNPs across *ITGAV* and *ITGB8* genes are shown in supplemental figures 1 and 2, whereas detailed information of each SNPs is presented in supplemental tables 1 and 2, respectively.

All SNPs were genotyped with TaqMan allele-specific discrimination assays method on an ABI Prism 7900 sequence detection system and analyzed using the SDS software (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), by laboratory personnel blinded to clinical status. Genotyping call rate was  $\geq 96.7\%$ . To assess genotyping reproducibility, a random 10% of the sample was re-genotyped with 100% concordance.

### Statistical Analysis

Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) was tested using the exact test. Power calculation was performed by means of the Quanto software (<http://hydra.usc.edu/GxE>, version 1.2.4) that computes sample size or power for genetic association studies (Gauderman 2002). Haploview software version 4.2 (<https://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/programs/medical-and-population-genetics/haploview/haploview>) was used to perform pairwise  $D'$  and  $r^2$  measurements between SNPs and construct LD blocks (Gabriel et al. 2002; Barrett et al. 2005). Using the SNPstats platform (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats/>) (Sole et al. 2006), a binary logistic regression analysis was applied to evaluate possible associations between individual tag SNPs and the risk of ICH, the risk of lobar or non-lobar ICH. Comparisons were adjusted for age, gender, history of hypertension and country of origin. Linear regression was performed in order to find SNP effect on age of ICH onset after adjustment for country of origin. Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) and  $p$  values were calculated assuming the codominant (genotypic) model of inheritance (AA vs Ab vs bb), a generalization that was found to cover dominant, recessive, and additive model of inheritance without the need for the adjustment for testing three previous different modes of inheritance (Lettre et al. 2007).

Statistical significance was corrected for multiple comparisons using the Bonferroni method: The significance threshold was set to 0.05 divided by the number of the tested SNPs ( $p = 0.05/11 = 0.0045$  for each gene).

Statistical analysis was carried out with SPSS version 17.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

### Results

Our study population consisted of 1015 participants. The total number of patients with primary ICH (classified as cases) and normal individuals (classified as controls) was 443 (mean age  $64.47 \pm 13.20$  years; 38.4% female) and 572 (mean age  $59.41 \pm 15.44$  years, 47.7% female), respectively. The main demographic information and the classification of the participants are displayed in Table 1.

Testing for HWE showed that rs3911239 ( $p = 0.0049$ ) and rs3757727 ( $p = 0.037$ ) exhibited a departure from HWE in the ICH cases, but not in the controls ( $p = 0.067$  and  $p = 0.06$ , respectively), and therefore, they were not removed from the analyses (Ziegler et al. 2011). No other SNP showed deviation from HWE ( $p > 0.05$ ). Allele and genotype frequencies of all ICH cases, lobar and non-lobar ICH cases and controls are given in Supplemental Table 3 for *ITGAV* gene and in Supplemental Table 4 for *ITGB8*.

According to the power analysis, the number of participants in this study was sufficient to detect an OR of 1.32 for *ITGAV* and *ITGB8* tag SNPs with a statistical power of  $>80\%$ , assuming a multiplicative mode of inheritance, a minor allele frequency of 20% (in rs7585471) and a significance level of 0.05. The identified *ITGAV* tag SNPs in our sample were distributed in three distinct gene linkage disequilibrium (LD) blocks: rs3911239, rs3911238 and rs7596996 in the first block, rs7585471, rs4667108, rs9333290 and rs7589470 in the second block and rs7565633 and rs2595389 in the third. Pairwise LD between the studied *ITGAV* tag SNPs ( $D'$ ,  $r^2$  and Coldheat) and the LD blocks as well are demonstrated in Supplementary Figure 3. The identified *ITGB8* tag SNPs in our sample were distributed in two distinct gene linkage disequilibrium (LD) blocks: rs10251386 and rs3807941 in the first block and rs10239099, rs3757727 and rs2107129 in the second one. Pairwise LD between the studied *ITGB8* tag SNPs ( $D'$ ,  $r^2$  and GOLD heatmap) and the LD blocks as well are demonstrated in Supplementary Figure 4.

Binary logistic regression analyses demonstrated that hypertension was associated with an increased risk of ICH [OR 5.130, 95% CI (3.733–7.050),  $p < 0.001$ ], lobar ICH [2.325 (1.527–3.540),  $p < 0.001$ ] and non-lobar ICH [10.347 (6.659–16.079),  $p < 0.001$ ], while age was associated with an increased risk of lobar ICH [1.025 (1.009–1.041),  $p = 0.002$ ]. Multivariate regression analysis for possible association between tag SNPs and ICH, lobar and non-lobar ICH showed that heterozygosity of rs7565633 of *ITGAV* gene was associated with decreased risk of lobar ICH compared to controls [OR 0.56; 95% CI 0.36–0.86,  $p = 0.0013$ ]. No other tag SNP of both *ITGAV* and *ITGB8* was found to alter the risk of ICH or its subtypes (Tables 2, 3).



**Table 1** Baseline characteristics of the study population ( $n = 1015$ )

Characteristics	All ICH cases ( $n = 443$ )	Lobar ICH ( $n = 147$ )	Non-lobar ICH ( $n = 268$ )	Controls ( $n = 572$ )
Age (years)				
Mean	64.47	66.05	63.52	59.41
SD	13.199	13.430	13.028	15.440
Range	68	68	63	82
	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)
Male	248 (56.0)	88 (59.9)	157 (58.6)	290 (50.7)
Female	170 (38.4)	59 (40.1)	111 (41.4)	273 (47.7)
Hypertension	327 (73.8)	97 (66.0)	229 (85.4)	224 (39.2)
Ischemic heart disease	82 (18.5)	32 (21.8)	50 (18.7)	80 (14.0)
Diabetes	65 (14.7)	18 (12.2)	47 (17.5)	67 (11.7)
Smoking	83 (18.7)	33 (22.4)	50 (18.7)	123 (21.5)
Alcohol	87 (19.6)	25 (17.0)	62 (23.1)	108 (18.9)
Hyperlipidemia	114 (32.5)	44 (29.9)	99 (36.9)	165 (28.8)
Greek	250 (56.4)	83 (56.5)	167 (62.3)	250 (43.7)
Polish	193 (43.6)	64 (43.5)	101 (37.7)	322 (56.3)

ICH intracerebral hemorrhage, SD standard deviation

Linear regression analyses of the effect of tag SNPs on the age of onset of ICH and its subtypes (Tables 4, 5) showed individuals with the TC genotype of the rs10251386 in the ITGB8 gene had significantly lower age of ICH onset compared to the wild-type genotype [mean age 62.27 vs 66.18 years, respectively;  $p = 0.004$ ; regression coefficient ( $b$ )  $-3.884$  (95 % CI  $-6.519$ ,  $-1.249$ );  $p = 0.0039$ ]. Similarly, ICH patients with the GC genotype of the rs10239099 in the ITGB8 gene were significantly younger compared to the wild-type genotype [mean age 62.22 vs 66.75 years, respectively;  $p = 0.001$ ;  $b -4.502$  (95 % CI  $-7.159$ ,  $-1.845$ );  $p = 0.0009$ ].

## Discussion

The present study evaluating a relative large number of participants showed that two specific variants of ITGB8 gene, rs10251386 and rs10239099, significantly influenced the age of ICH onset. In addition, rs7565633 tag SNP of ITGAV gene was found to affect the risk of lobar ICH. To the best of our knowledge, no other studies have examined the effect of these gene polymorphisms on the risk of ICH.

Previous genetic studies in ICH have identified a number of gene variants that confer susceptibility to ICH by affecting vessel wall structure, lipid metabolism, inflammation, coagulation processes and regulation of blood pressure (Jagiella et al. 2014; Falcone et al. 2014; Dardiotis et al. 2008), 2011. The present study focused on genetic variants that affect the structural properties of brain vessels.

In particular, integrin AV and integrin B8 seem to be implicated in a number of functions including the stability of brain endothelial cells junctions, the tight adhesion of endothelium to the astrocytic perivascular endfeet and the functional and structural integrity of blood–brain barrier (Mobley et al. 2009; del Zoppo and Milner 2006). A number of different studies have reported that mice knockout for ITGAV and/or ITGB8 genes develop defective vasculogenesis and vascular malformations resulting in severe ICH in the deep brain structures and cortex (Zhu et al. 2002; Proctor et al. 2005; McCarty et al. 2005; Bader et al. 1998). Interestingly, targeted integrin AV or integrin B8 deletion solely from brain cell types showed that deletion only from the glia and neurons but not from the vascular endothelium resulted in an ICH phenotype, suggesting that the primary function of ITGAV and ITGB8 on the integrity of the brain microvasculature is mediated by the expression of these integrins in the glia and neuroepithelial cells (Proctor et al. 2005; McCarty et al. 2005).

The precise mechanisms by which ITGAV and ITGB8 gene variants may influence the pathophysiology of ICH have not been elucidated. Moreover, there are a limited number of studies regarding the role of polymorphisms in integrin AV and integrin B8 in certain diseases or the integrity of vasculature. In a recent study in patients with brain arteriovenous malformations, the authors investigated the effect of ITGB8 tag SNPs within intron 1 that captured the variability of the promoter region (Su et al. 2010). They reported that two ITGB8 gene polymorphisms, rs10486391 and rs11982847, that altered the tissue B8 expression levels

**Table 2** Univariate and multivariate (adjusted for age, gender, history of hypertension and the country of origin) single-locus analysis association with ICH, lobar ICH and non-lobar ICH, for the ITGAV SNPs, in codominant (genotypic) model of inheritance (AA vs Ab vs bb)

SNPs	Cases versus controls			Lobar ICH versus controls			Non-lobar ICH versus controls						
	Univariate analysis			Univariate analysis			Univariate analysis						
	OR (95 % CI)	p	Multivariate analysis	OR (95 % CI)	p	Multivariate analysis	OR (95 % CI)	p	Multivariate analysis				
rs3911239	T/T	1.00	0.021	1.00	0.13	1.00	0.061	1.00	0.13	1.00	0.25	1.00	0.4
	C/T	0.79 (0.61–1.04)		0.81 (0.60–1.10)		0.74 (0.50–1.11)		0.74 (0.49–1.12)		0.84 (0.61–1.15)		0.83 (0.58–1.18)	
	C/C	1.34 (0.90–1.99)		1.24 (0.80–1.94)		1.42 (0.82–2.46)		1.26 (0.71–2.25)		1.22 (0.76–1.94)		1.13 (0.67–1.91)	
rs3911238	G/G	1.00	0.099	1.00	0.32	1.00	0.11	1.00	0.13	1.00	0.33	1.00	0.32
	G/C	0.87 (0.67–1.13)		0.90 (0.67–1.21)		0.69 (0.47–1.03)		0.67 (0.44–1.01)		0.98 (0.72–1.32)		1.11 (0.79–1.57)	
	C/C	0.56 (0.32–0.99)		0.63 (0.33–1.19)		0.58 (0.25–1.34)		0.66 (0.28–1.56)		0.61 (0.31–1.20)		0.62 (0.29–1.34)	
rs7596996	A/A	1.00	0.36	1.00	0.59	1.00	0.6	1.00	0.77	1.00	0.52	1.00	0.79
	G/A	0.86 (0.66–1.11)		0.89 (0.67–1.20)		0.90 (0.61–1.32)		0.91 (0.61–1.35)		0.85 (0.63–1.15)		0.90 (0.64–1.27)	
	G/G	1.12 (0.71–1.76)		1.13 (0.68–1.87)		1.24 (0.66–2.36)		1.14 (0.59–2.23)		1.05 (0.61–1.79)		1.05 (0.57–1.92)	
rs7585471	A/A	1.00	0.43	1.00	0.64	1.00	0.67	1.00	0.78	1.00	0.32	1.00	0.23
	G/A	1.10 (0.84–1.44)		1.12 (0.82–1.52)		0.84 (0.56–1.27)		0.86 (0.56–1.32)		1.19 (0.87–1.63)		1.33 (0.93–1.89)	
	G/G	0.70 (0.34–1.42)		0.82 (0.37–1.80)		0.82 (0.30–2.22)		0.93 (0.33–2.63)		0.69 (0.29–1.64)		0.78 (0.29–2.04)	
rs4667108	T/T	1.00	0.8	1.00	0.98	1.00	0.11	1.00	0.16	1.00	0.63	1.00	0.41
	T/C	0.93 (0.71–1.22)		1.03 (0.76–1.40)		0.65 (0.44–0.97)		0.67 (0.44–1.02)		1.15 (0.84–1.58)		1.27 (0.89–1.82)	
	C/C	1.04 (0.70–1.55)		1.01 (0.65–1.57)		0.84 (0.47–1.49)		0.87 (0.48–1.58)		1.19 (0.75–1.89)		1.09 (0.65–1.85)	
rs9333290	G/G	1.00	0.14	1.00	0.046	1.00	0.013	1.00	0.009	1.00	0.61	1.00	0.21
	T/G	0.82 (0.63–1.07)		0.76 (0.56–1.03)		0.75 (0.50–1.12)		0.68 (0.45–1.04)		0.86 (0.63–1.16)		0.77 (0.54–1.08)	
	T/T	1.22 (0.78–1.89)		1.33 (0.81–2.18)		1.80 (1.02–3.17)		1.76 (0.97–3.20)		0.95 (0.55–1.63)		1.16 (0.62–2.18)	
rs7589470	A/A	1.00	0.11	1.00	0.13	1.00	0.01	1.00	0.017	1.00	0.35	1.00	0.3
	G/A	0.74 (0.56–0.99)		0.72 (0.52–0.99)		0.60 (0.39–0.92)		0.57 (0.37–0.89)		0.82 (0.59–1.14)		0.76 (0.52–1.11)	
	G/G	0.91 (0.63–1.32)		0.83 (0.55–1.25)		1.17 (0.71–1.92)		1.03 (0.61–1.73)		0.75 (0.48–1.17)		0.73 (0.44–1.21)	
rs7565633	A/A	1.00	0.029	1.00	0.017	1.00	<b>0.0012</b>	1.00	<b>0.0013</b>	1.00	0.38	1.00	0.25
	G/A	0.79 (0.60–1.04)		0.73 (0.54–1.00)		<b>0.56 (0.37–0.86)</b>		<b>0.56 (0.36–0.86)</b>		0.91 (0.66–1.25)		0.80 (0.56–1.14)	
	G/G	1.30 (0.88–1.92)		1.31 (0.85–2.02)		1.44 (0.86–2.43)		1.48 (0.85–2.55)		1.26 (0.79–1.99)		1.16 (0.69–1.96)	
rs2595389	T/T	1.00	0.73	1.00	0.47	1.00	0.011	1.00	0.017	1.00	0.76	1.00	0.88
	G/T	0.94 (0.70–1.27)		0.84 (0.60–1.17)		0.59 (0.38–0.91)		0.59 (0.38–0.92)		1.14 (0.80–1.62)		1.02 (0.69–1.52)	
	G/G	1.07 (0.74–1.54)		1.00 (0.66–1.50)		1.10 (0.68–1.80)		1.07 (0.64–1.79)		1.08 (0.70–1.68)		0.91 (0.56–1.50)	
rs12620821	A/A	1.00	0.83	1.00	0.75	1.00	0.13	1.00	0.15	1.00	0.93	1.00	0.93
	G/A	0.92 (0.69–1.23)		0.93 (0.67–1.29)		0.69 (0.46–1.04)		0.68 (0.44–1.05)		1.05 (0.74–1.48)		1.07 (0.73–1.59)	
	G/G	0.91 (0.64–1.31)		0.85 (0.57–1.28)		0.63 (0.37–1.08)		0.63 (0.36–1.10)		1.08 (0.71–1.65)		1.02 (0.64–1.64)	
rs11902171	G/G	1.00	0.43	1.00	0.32	1.00	0.19	1.00	0.26	1.00	0.66	1.00	0.78
	G/C	0.92 (0.71–1.20)		0.94 (0.70–1.27)		0.83 (0.56–1.24)		0.89 (0.59–1.35)		0.95 (0.70–1.29)		0.98 (0.69–1.39)	

**Table 2** continued

SNPs	Cases versus controls			Lobar ICH versus controls			Non-lobar ICH versus controls		
	Univariate analysis			Univariate analysis			Univariate analysis		
	OR (95 % CI)	<i>p</i>		OR (95 % CI)	<i>p</i>		OR (95 % CI)	<i>p</i>	
C/C	1.30 (0.78–2.15)		1.47 (0.83–2.59)	1.60 (0.82–3.13)		1.67 (0.83–3.39)	1.26 (0.70–2.28)		1.25 (0.64–2.44)

Statistically significant values are given in bold

SNP single nucleotide polymorphism, *ITGAV* integrin AV, *ICH* intracerebral hemorrhage, *CI* confidence interval, *OR* odds ratio

**Table 3** Univariate and multivariate (adjusted for age, gender, history of hypertension and the country of origin) single-locus analysis association with ICH, lobar ICH and non-lobar ICH, for the ITGB8 SNPs, in codominant (genotypic) model of inheritance (AA vs Ab vs bb)

SNPs	Cases versus controls			Lobar ICH versus controls			Non-lobar ICH versus controls							
	Univariate analysis			Univariate analysis			Univariate analysis							
	OR (95 % CI)	<i>p</i>		OR (95 % CI)	<i>p</i>		OR (95 % CI)	<i>p</i>						
rs206198	1.00	0.84	1.00	1.00	0.79	1.00	1.00	0.38	1.00	0.46	1.00	0.9	1.00	0.87
G/A	0.95 (0.72–1.25)		0.90 (0.65–1.23)	0.79 (0.53–1.20)		0.78 (0.50–1.19)	0.95 (0.68–1.31)		0.96 (0.66–1.39)		0.95 (0.68–1.31)		0.96 (0.66–1.39)	
A/A	1.05 (0.73–1.52)		0.96 (0.64–1.44)	1.08 (0.65–1.81)		0.98 (0.57–1.68)	1.03 (0.67–1.58)		0.88 (0.55–1.42)		1.03 (0.67–1.58)		0.88 (0.55–1.42)	
rs7456987	1.00	0.14	1.00	1.00	0.3	1.00	1.00	0.17	1.00	0.25	1.00	0.4	1.00	0.44
T/T	1.25 (0.93–1.67)		1.21 (0.87–1.67)	1.14 (0.74–1.76)		1.08 (0.69–1.70)	1.22 (0.86–1.72)		1.28 (0.87–1.89)		1.22 (0.86–1.72)		1.28 (0.87–1.89)	
T/G	1.42 (0.99–2.06)		1.37 (0.91–2.07)	1.63 (0.97–2.74)		1.54 (0.90–2.65)	1.31 (0.85–2.02)		1.22 (0.75–1.98)		1.31 (0.85–2.02)		1.22 (0.75–1.98)	
G/G	1.00	0.96	1.00	1.00	0.85	1.00	1.00	0.98	1.00	0.99	1.00	0.96	1.00	0.83
rs3757725	1.04 (0.79–1.36)		1.09 (0.81–1.48)	1.04 (0.70–1.54)		1.02 (0.68–1.54)	1.03 (0.75–1.42)		1.10 (0.77–1.58)		1.02 (0.68–1.54)		1.10 (0.77–1.58)	
G/C	0.98 (0.54–1.76)		1.07 (0.56–2.04)	0.98 (0.42–2.32)		1.05 (0.43–2.56)	1.09 (0.56–2.12)		1.16 (0.54–2.47)		1.05 (0.43–2.56)		1.16 (0.54–2.47)	
C/C	1.00	0.18	1.00	1.00	0.11	1.00	1.00	0.21	1.00	0.24	1.00	0.34	1.00	0.21
rs10251386	0.85 (0.65–1.10)		0.78 (0.58–1.05)	0.77 (0.53–1.13)		0.82 (0.55–1.22)	0.81 (0.60–1.10)		0.76 (0.54–1.08)		0.77 (0.53–1.13)		0.76 (0.54–1.08)	
T/T	0.67 (0.41–1.09)		0.63 (0.37–1.07)	0.58 (0.28–1.24)		0.55 (0.25–1.20)	0.77 (0.45–1.33)		0.67 (0.37–1.23)		0.55 (0.25–1.20)		0.67 (0.37–1.23)	

**Table 3** continued

SNPs	Genotypes	Cases versus controls			Lobar ICH versus controls			Non-lobar ICH versus controls					
		Univariate analysis		Multivariate analysis	Univariate analysis		Multivariate analysis	Univariate analysis		Multivariate analysis			
		OR (95 % CI)	p	OR (95 % CI)	p	OR (95 % CI)	p	OR (95 % CI)	p	OR (95 % CI)	p		
rs3807941	C/C	1.00	0.18	1.00	0.24	1.00	0.18	1.00	0.22	1.00	0.39	1.00	0.64
	T/C	1.05 (0.78–1.42)		1.05 (0.75–1.47)		1.08 (0.69–1.68)		1.04 (0.65–1.66)		1.00 (0.71–1.42)		1.10 (0.74–1.62)	
	T/T	1.37 (0.96–1.97)		1.38 (0.92–2.07)		1.57 (0.94–2.65)		1.53 (0.89–2.64)		1.28 (0.84–1.95)		1.26 (0.78–2.02)	
rs10239099	G/G	1.00	0.17	1.00	0.17	1.00	0.27	1.00	0.36	1.00	0.41	1.00	0.29
	G/C	0.90 (0.69–1.17)		0.82 (0.61–1.10)		0.81 (0.55–1.19)		0.85 (0.57–1.27)		0.88 (0.65–1.20)		0.82 (0.58–1.16)	
	C/C	0.65 (0.41–1.03)		0.65 (0.39–1.07)		0.61 (0.30–1.22)		0.61 (0.30–1.26)		0.72 (0.42–1.21)		0.66 (0.37–1.19)	
rs3757727	T/T	1.00	0.28	1.00	0.2	1.00	0.15	1.00	0.18	1.00	0.68	1.00	0.51
	T/C	0.89 (0.68–1.18)		0.83 (0.60–1.13)		0.81 (0.54–1.20)		0.79 (0.52–1.20)		0.93 (0.67–1.29)		0.86 (0.59–1.25)	
	C/C	0.73 (0.49–1.08)		0.68 (0.44–1.05)		0.56 (0.31–1.03)		0.57 (0.30–1.06)		0.82 (0.52–1.29)		0.75 (0.45–1.25)	
rs2107129	T/T	1.00	0.46	1.00	0.61	1.00	0.85	1.00	0.79	1.00	0.22	1.00	0.23
	T/C	1.19 (0.90–1.58)		1.17 (0.85–1.61)		0.98 (0.65–1.48)		0.91 (0.60–1.40)		1.34 (0.96–1.88)		1.39 (0.95–2.03)	
	C/C	1.17 (0.81–1.69)		1.13 (0.75–1.72)		1.14 (0.67–1.92)		1.09 (0.63–1.88)		1.22 (0.78–1.90)		1.17 (0.71–1.93)	
rs717861	C/C	1.00	0.057	1.00	0.16	1.00	0.47	1.00	0.66	1.00	0.082	1.00	0.081
	T/C	0.94 (0.72–1.25)		0.95 (0.70–1.30)		0.82 (0.54–1.23)		0.85 (0.56–1.30)		0.97 (0.70–1.33)		1.01 (0.70–1.46)	
	T/T	0.63 (0.43–0.94)		0.66 (0.43–1.03)		0.74 (0.42–1.28)		0.79 (0.44–1.41)		0.61 (0.38–0.98)		0.59 (0.35–1.00)	
rs752474	G/G	1.00	0.8	1.00	0.81	1.00	0.91	1.00	0.92	1.00	0.82	1.00	0.82
	G/C	0.90 (0.67–1.22)		0.94 (0.67–1.33)		1.02 (0.65–1.59)		1.03 (0.65–1.64)		0.90 (0.63–1.28)		0.92 (0.61–1.37)	
	C/C	0.92 (0.64–1.33)		0.87 (0.57–1.32)		0.92 (0.53–1.59)		0.93 (0.53–1.65)		0.90 (0.59–1.38)		0.86 (0.53–1.39)	
rs739752	G/G	1.00	0.32	1.00	0.4	1.00	0.58	1.00	0.52	1.00	0.2	1.00	0.21
	T/G	1.20 (0.92–1.56)		1.23 (0.91–1.66)		1.12 (0.76–1.66)		1.14 (0.76–1.72)		1.21 (0.89–1.64)		1.30 (0.91–1.85)	
	T/T	0.89 (0.52–1.52)		1.06 (0.59–1.90)		1.42 (0.72–2.79)		1.48 (0.73–2.99)		0.70 (0.35–1.38)		0.76 (0.36–1.63)	

SNP single nucleotide polymorphism, *ITGB8* integrin B8, *ICH* intracerebral hemorrhage; *CI* confidence interval, *OR* odds ratio

**Table 4** Single-locus linear regression analysis for the ITGAV SNPs with age at onset of ICH and its subtypes after adjustment for the country of origin

SNPs	Genotypes	ICH			Lobar ICH			Non-lobar ICH					
		B	95 % CI		p	B	95 % CI		B	95 % CI		p	
			Lower bound	Upper bound			Lower bound	Upper bound		Lower bound	Upper bound		
rs3911239	T/T	Ref.				Ref.				Ref.			
	C/T	0.054	-2.777	2.885	0.97	-0.032	-4.959	4.894	0.99	-0.308	-3.767	3.151	0.861
	C/C	0.374	-3.525	4.273	0.851	4.465	-1.979	10.909	0.173	-3.215	-8.169	1.74	0.203
rs3911238	G/G	Ref.				Ref.				Ref.			
	G/C	-0.626	-3.296	2.043	0.645	-2.468	-7.127	2.19	0.297	1.034	-2.235	4.302	0.534
	C/C	-7.831	-14.02	-1.641	0.013	-13.661	-23.881	-3.441	0.009	-4.426	-12.161	3.309	0.261
rs7596996	A/A	Ref.				Ref.				Ref.			
	G/A	-0.152	-2.855	2.55	0.912	-1.039	-5.686	3.609	0.659	0.107	-3.223	3.438	0.949
	G/G	-1.477	-5.981	3.026	0.519	-0.657	-8.187	6.873	0.863	-3.22	-8.984	2.544	0.272
rs7585471	A/A	Ref.				Ref.				Ref.			
	G/A	-0.951	-3.699	1.797	0.497	-1.855	-6.868	3.158	0.466	-0.165	-3.466	3.136	0.922
	G/G	-7.552	-15.161	0.058	0.052	-10.07	-22.246	2.107	0.104	-4.966	-14.793	4.86	0.321
rs4667108	T/T	Ref.				Ref.				Ref.			
	T/C	-2.789	-5.555	-0.022	0.048	-1.943	-6.771	2.885	0.428	-2.815	-6.258	0.628	0.109
	C/C	-5.352	-9.356	-1.348	0.009	-4.735	-11.636	2.166	0.177	-5.645	-10.597	-0.692	0.026
rs9333290	G/G	Ref.				Ref.				Ref.			
	T/G	-0.002	-2.741	2.736	0.999	1.355	-3.418	6.127	0.576	-0.715	-4.074	2.644	0.676
	T/T	0.256	-3.994	4.505	0.906	-1.974	-8.213	4.266	0.533	1.586	-4.296	7.469	0.596
rs7589470	A/A	Ref.				Ref.				Ref.			
	G/A	0.574	-2.377	3.524	0.702	2.869	-2.377	8.116	0.281	-0.465	-4.05	3.119	0.798
	G/G	1.414	-2.34	5.168	0.459	0.549	-5.3	6.398	0.853	1.63	-3.331	6.59	0.518
rs7565633	A/A	Ref.				Ref.				Ref.			
	G/A	-0.079	-2.936	2.778	0.957	1.814	-3.408	7.035	0.493	-0.761	-4.206	2.683	0.664
	G/G	0.447	-3.31	4.205	0.815	1.404	-4.701	7.51	0.65	-0.047	-4.836	4.742	0.985
rs2595389	T/T	Ref.				Ref.				Ref.			
	G/T	1.512	-1.527	4.552	0.329	3.096	-2.116	8.309	0.242	0.771	-3.008	4.55	0.688
	G/G	0.972	-2.696	4.64	0.603	5.006	-0.768	10.78	0.089	-1.41	-6.161	3.342	0.56
rs12620821	A/A	Ref.				Ref.				Ref.			
	G/A	-2.402	-5.35	0.546	0.11	-0.976	-5.888	3.936	0.695	-3.283	-7.003	0.436	0.083
	G/G	-3.688	-7.361	-0.014	0.049	0.144	-6.326	6.615	0.965	-5.418	-9.922	-0.915	0.019
rs11902171	G/G	Ref.				Ref.				Ref.			
	G/C	-0.264	-3.023	2.494	0.851	-1.443	-6.318	3.432	0.559	0.526	-2.83	3.883	0.758
	C/C	1.874	-2.913	6.662	0.442	3.86	-3.843	11.564	0.324	0.723	-5.415	6.861	0.817

SNP single nucleotide polymorphism, ITGAV integrin AV, ICH intracerebral hemorrhage; B regression coefficient, CI confidence interval, Ref reference genotype (Wt/Wt)

were significantly associated with susceptibility to brain arteriovenous malformations. The same region of ITGB8 gene, in particular rs10251386 within intron 1, also emerged as significant in our study. This region, that spans about 24.4 kb and with the two extremes (rs11982847, rs10251386) being in complete LD ( $D' = 1$ ,  $r^2 = 0.836$ )

according to HapMap, seem to represent an important segment of ITGB8 gene that affects its expression (Su et al. 2010). It is possible that variations in this region may render individuals more susceptible to brain microvascular alterations that may result in earlier onset of ICH. The rs10239099 polymorphism, that also found to be associated

**Table 5** Single-locus linear regression analysis for the ITGB8 SNPs with age at onset of ICH and its subtypes after adjustment for the country of origin

SNPs	Genotypes		ICH				Lobar ICH				Non-lobar ICH					
	B	p	Lower bound	Upper bound	95 % CI	B	p	Lower bound	Upper bound	95 % CI	B	p	Lower bound	Upper bound	95 % CI	p
rs206198	G/G	Ref.				Ref.					Ref.					
	G/A	1.605	-1.272	4.482	0.274	2.092	-2.982	7.165	0.416	-2.338	1.171	0.416	-2.338	4.68	-2.338	0.512
	A/A	3.886	0.177	7.595	0.04	2.107	-4.143	8.357	0.506	0.259	4.869	0.506	0.259	9.479	0.259	0.039
rs7456987	T/T	Ref.				Ref.					Ref.					
	T/G	-0.386	-3.402	2.631	0.802	-1.051	-6.311	4.209	0.693	-3.964	-0.291	0.693	-3.964	3.381	-3.964	0.876
	G/G	3.32	-0.359	6.999	0.077	0.45	-5.67	6.571	0.885	0.307	4.903	0.885	0.307	9.5	0.307	0.037
rs3757725	G/G	Ref.				Ref.					Ref.					
	G/C	-0.75	-3.507	2.008	0.593	1.531	-3.16	6.221	0.52	-2.034	-2.034	0.52	-2.034	1.368	-2.034	0.24
	C/C	5.176	-0.734	11.086	0.086	4.071	-6.272	14.414	0.438	-1.332	5.819	0.438	-1.332	12.97	-1.332	0.11
rs10251386	T/T	Ref.				Ref.					Ref.					
	T/C	-3.884	-6.519	-1.249	<b>0.003961</b>	-4.892	-9.275	-0.51	0.029	-3.481	-3.481	0.029	-3.481	-0.191	-3.481	0.038
	C/C	-0.705	-5.687	4.277	0.781	5.026	-3.886	13.939	0.267	-8.959	-2.977	0.267	-8.959	3.006	-8.959	0.328
rs3807941	C/C	Ref.				Ref.					Ref.					
	T/C	0.341	-2.757	3.439	0.829	-2.82	-8.257	2.617	0.307	-2.297	1.479	0.307	-2.297	5.255	-2.297	0.441
	T/T	2.693	-0.924	6.31	0.144	0.116	-6.055	6.287	0.97	-0.709	3.752	0.97	-0.709	8.214	-0.709	0.099
rs10239099	G/G	Ref.				Ref.					Ref.					
	G/C	-4.502	-7.159	-1.845	<b>0.000946</b>	-6.081	-10.635	-1.527	0.009	-6.977	-3.703	0.009	-6.977	-0.429	-6.977	0.027
	C/C	-2.58	-7.35	2.19	0.288	-2.333	-10.773	6.106	0.585	-8.411	-2.645	0.585	-8.411	3.121	-8.411	0.367
rs3757727	T/T	Ref.				Ref.					Ref.					
	T/C	-3.514	-6.348	-0.68	0.015	-4.237	-8.949	0.475	0.078	-7.014	-3.431	0.078	-7.014	0.152	-7.014	0.06
	C/C	-3.616	-7.733	0.502	0.085	-3.56	-10.886	3.766	0.338	-8.508	-3.51	0.338	-8.508	1.487	-8.508	0.168
rs2107129	T/T	Ref.				Ref.					Ref.					
	T/C	-1.071	-3.973	1.83	0.468	-3.082	-8.028	1.863	0.22	-3.412	0.17	0.22	-3.412	3.751	-3.412	0.926
	C/C	3.299	-0.47	7.069	0.086	0.867	-5.401	7.135	0.785	0.432	5.125	0.785	0.432	9.819	0.432	0.032
rs717861	C/C	Ref.				Ref.					Ref.					
	T/C	-3.768	-6.567	-0.97	0.008	-3.819	-8.713	1.075	0.125	-7.236	-3.815	0.125	-7.236	-0.393	-7.236	0.029
	T/T	-4.179	-8.306	-0.051	0.047	-1.983	-8.728	4.761	0.562	-10.888	-5.652	0.562	-10.888	-0.415	-10.888	0.035
rs752474	G/G	Ref.				Ref.					Ref.					
	G/C	-4.021	-7.091	-0.951	0.01	-2.707	-8.061	2.647	0.319	-8.865	-5.1	0.319	-8.865	-1.336	-8.865	0.008
	C/C	-3.89	-7.649	-0.131	0.043	-2.771	-9.359	3.818	0.407	-4.971	-4.971	0.407	-4.971	-0.376	-4.971	0.034
rs739752	G/G	Ref.				Ref.					Ref.					
	T/G	-0.122	-2.815	2.571	0.929	2.708	-1.972	7.387	0.255	-4.812	-1.522	0.255	-4.812	1.769	-4.812	0.363

Table 5 continued

SNPs	Genotypes		ICH		Lobar ICH			Non-lobar ICH					
	<i>B</i>	<i>p</i>	95 % CI	Upper bound	<i>B</i>	<i>p</i>	95 % CI	Lower bound	Upper bound	<i>B</i>	<i>p</i>	95 % CI	Lower bound
T/T	6.146	0.662	11.631	0.028	8.435	0.57	16.3	0.036	3.32	-4.415	11.056	0.399	

Statistically significant values are given in bold

SNP single nucleotide polymorphism, *ITGB8* integrin B8, *ICH* intracerebral hemorrhage, *B* regression coefficient, *CI* confidence interval, *Ref* reference genotype (Wt/Wt)

with the age of ICH onset, is within intron 3 from the second LD block in our sample and in complete LD with these three SNPs from intron 1 ( $D' = 1$ ), and therefore, this association is rather unlikely to account for independent signal.

The present study also demonstrated a link between lobar ICH and rs7565633, which is located in intron 17–18 of *ITGAV* gene. The fact that rs7565633 influenced the risk only of lobar ICH is supportive of the different pathophysiologic mechanisms between lobar and non-lobar ICH (Sacco 2000). Cerebral amyloid angiopathy is main pathological feature in patients with lobar ICH. There are some reports of possible interaction between integrin AV and beta-amyloid. Of note, integrin AV was shown to be a critical mediator of  $A\beta$ -induced toxicity to neurons (Han et al. 2014) and synapses (Wang et al. 2008), which implies that *ITGAV* may be a potential therapeutic target. It is therefore possible that variation in *ITGAV* may predispose to toxicity of vascular amyloid deposits and consequently to lobar ICH.

According to the strong association revealed in our study, it would be expected that GWASs would have detected the contribution of *ITGAV* and *ITGB8* genes to ICH. There may be some explanations for this discrepancy for example the very strict significance threshold of GWAS ( $\leq 5 \times 10^{-8}$ ), the variance of allele frequencies among different ethnic groups and the fact that according to simulation studies the effective population size of GWASs should ideally be very large ( $\sim 10,000$  individuals per group) in order to maximize the number of genuine associations typical for common variants (Pe'er et al. 2008; Sawcer et al. 2014).

Certain limitations of the present report need to be acknowledged. Our study is a genetic case–control study and carries all the inherent limitations of a retrospective analysis of prospectively collected data. In addition, the possibility of selection bias in cases and controls cannot be excluded. Finally, our results would have been more robust if they had been validated in an independent sample or in a post-GWAS in silico analysis.

In conclusion, our study provides preliminary hypothesis generating indication regarding the influence of *ITGAV* and *ITGB8* tag SNPs on the risk of lobar ICH and earlier onset of ICH, respectively. These associations may have pharmacogenetic implications, as integrin inhibition (Cox et al. 2010) and blockage of integrin inactivation (Saharinen and Ivaska 2015) have been considered as possible therapeutic targets. In view of the retrospective design of the present analysis, these findings should be replicated in other populations and further studies, especially in experimental models, in order to gain new insights into the possible role of polymorphic variants of

ITGAV and ITGB8 genes in the pathophysiology of vascular injury and ICH.

**Acknowledgments** The study was supported in part by a research grant of the Research Committee of the University of Thessaly, Greece (Code: 2845).

**Compliance with Ethical Standards**

**Conflict of interest** None.

## References

- Bader, B. L., Rayburn, H., Crowley, D., & Hynes, R. O. (1998). Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all alpha v integrins. *Cell*, *95*(4), 507–519.
- Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J., & Daly, M. J. (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, *21*(2), 263–265. doi:10.1093/bioinformatics/bth457.
- Cox, D., Brennan, M., & Moran, N. (2010). Integrins as therapeutic targets: Lessons and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, *9*(10), 804–820. doi:10.1038/nrd3266.
- Dardiotis, E., Hadjigeorgiou, G. M., Dardioti, M., Scarmeas, N., Paterakis, K., Aggelakis, K., et al. (2008). Alpha-1 antichymotrypsin gene signal peptide a/t polymorphism and primary intracerebral hemorrhage. *European Neurology*, *59*, 307–314.
- Dardiotis, E., Jagiella, J., Xiromerisiou, G., Dardioti, M., Vogiatzi, C., Urbanik, A., et al. (2011). Angiotensin-converting enzyme tag single nucleotide polymorphisms in patients with intracerebral hemorrhage. *Pharmacogenetics and Genomics*, *21*, 136–141.
- Dardiotis, E., Paterakis, K., Siokas, V., Tsvigoulis, G., Dardioti, M., Grigoriadis, S., et al. (2015). Effect of angiotensin-converting enzyme tag single nucleotide polymorphisms on the outcome of patients with traumatic brain injury. *Pharmacogenetics and Genomics*, *25*(10), 485–490. doi:10.1097/fpc.0000000000000161.
- Dardiotis, E., Paterakis, K., Tsvigoulis, G., Tsintou, M., Hadjigeorgiou, G. F., Dardioti, M., et al. (2014). AQP4 tag single nucleotide polymorphisms in patients with traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*, *31*(23), 1920–1926. doi:10.1089/neu.2014.3347.
- del Zoppo, G. J., & Milner, R. (2006). Integrin-matrix interactions in the cerebral microvasculature. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *26*(9), 1966–1975. doi:10.1161/01.ATV.0000232525.65682.a2.
- Falcone, G. J., Malik, R., Dichgans, M., & Rosand, J. (2014). Current concepts and clinical applications of stroke genetics. *Lancet Neurology*, *13*(4), 405–418. doi:10.1016/s1474-4422(14)70029-8.
- Feigin, V. L., Lawes, C. M., Bennett, D. A., Barker-Collo, S. L., & Parag, V. (2009). Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. *Lancet Neurology*, *8*(4), 355–369. doi:10.1016/s1474-4422(09)70025-0.
- Gabriel, S. B., Schaffner, S. F., Nguyen, H., Moore, J. M., Roy, J., Blumenstiel, B., et al. (2002). The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*, *296*(5576), 2225–2229. doi:10.1126/science.1069424.
- Gauderman, W. J. (2002). Sample size requirements for association studies of gene-gene interaction. *American Journal of Epidemiology*, *155*(5), 478–484.
- Greenberg, S. M. (2002). Cerebral amyloid angiopathy and vessel dysfunction. *Cerebrovascular Diseases*, *13*(Suppl 2), 42–47.
- Han, H. Y., Zhang, J. P., Ji, S. Q., Liang, Q. M., Kang, H. C., Tang, R. H., et al. (2014). alpha and beta1 Integrins mediate Abeta-induced neurotoxicity in hippocampal neurons via the FAK signaling pathway. *PLoS One*, *8*(6), e64839. doi:10.1371/journal.pone.0064839.
- Hynes, R. O. (2002). Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, *110*(6), 673–687.
- Ikram, M. A., Wieberdink, R. G., & Koudstaal, P. J. (2012). International epidemiology of intracerebral hemorrhage. *Current Atherosclerosis Reports*, *14*(4), 300–306. doi:10.1007/s11883-012-0252-1.
- Jagiella, J., Dardiotis, E., Gasowski, J., Pera, J., Dzedzic, T., Klimkowicz-Mrowiec, A., et al. (2014). The FGA Thr312Ala polymorphism and risk of intracerebral haemorrhage in Polish and Greek populations. *Neurologia i Neurochirurgia Polska*, *48*, 105–110.
- Lammie, G. A. (2002). Hypertensive cerebral small vessel disease and stroke. *Brain Pathology*, *12*(3), 358–370.
- Lette, G., Lange, C., & Hirschhorn, J. N. (2007). Genetic model testing and statistical power in population-based association studies of quantitative traits. *Genetic Epidemiology*, *31*(4), 358–362. doi:10.1002/gepi.20217.
- McCarty, J. H., Lacy-Hulbert, A., Charest, A., Bronson, R. T., Crowley, D., Housman, D., et al. (2005). Selective ablation of alpha v integrins in the central nervous system leads to cerebral hemorrhage, seizures, axonal degeneration and premature death. *Development*, *132*(1), 165–176. doi:10.1242/dev.01551.
- Mobley, A. K., Tchaicha, J. H., Shin, J., Hossain, M. G., & McCarty, J. H. (2009). Beta8 integrin regulates neurogenesis and neurovascular homeostasis in the adult brain. *Journal of Cell Science*, *122*(Pt 11), 1842–1851. doi:10.1242/jcs.043257.
- Pe'er, I., Yelensky, R., Altshuler, D., & Daly, M. J. (2008). Estimation of the multiple testing burden for genomewide association studies of nearly all common variants. *Genetic Epidemiology*, *32*(4), 381–385. doi:10.1002/gepi.20303.
- Proctor, J. M., Zang, K., Wang, D., Wang, R., & Reichardt, L. F. (2005). Vascular development of the brain requires beta8 integrin expression in the neuroepithelium. *Journal of Neuroscience*, *25*(43), 9940–9948. doi:10.1523/jneurosci.3467-05.2005.
- Qureshi, A. I., Tuhrim, S., Broderick, J. P., Batjer, H. H., Hondo, H., & Hanley, D. F. (2001). Spontaneous intracerebral hemorrhage. *New England Journal of Medicine*, *344*(19), 1450–1460. doi:10.1056/nejm200105103441907.
- Rost, N. S., Greenberg, S. M., & Rosand, J. (2008). The genetic architecture of intracerebral hemorrhage. *Stroke*, *39*(7), 2166–2173. doi:10.1161/strokeaha.107.501650.
- Sacco, R. L. (2000). Lobar intracerebral hemorrhage. *New England Journal of Medicine*, *342*(4), 276–279. doi:10.1056/nejm200001273420410.
- Saharinen, P., & Ivaska, J. (2015). Blocking integrin inactivation as an anti-angiogenic therapy. *EMBO Journal*, *34*(10), 1293–1295. doi:10.15252/embj.201591504.
- Sawcer, S., Franklin, R. J., & Ban, M. (2014). Multiple sclerosis genetics. *Lancet Neurology*, *13*(7), 700–709. doi:10.1016/s1474-4422(14)70041-9.
- Sole, X., Guino, E., Valls, J., Iñiesta, R., & Moreno, V. (2006). SNPstats: A web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*, *22*(15), 1928–1929. doi:10.1093/bioinformatics/btl268.
- Su, H., Kim, H., Pawlikowska, L., Kitamura, H., Shen, F., Cambier, S., et al. (2010). Reduced expression of integrin alphavbeta8 is associated with brain arteriovenous malformation pathogenesis.



- American Journal of Pathology*, 176(2), 1018–1027. doi:[10.2353/ajpath.2010.090453](https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090453).
- Wang, Q., Klyubin, I., Wright, S., Griswold-Prenner, I., Rowan, M. J., & Anwyl, R. (2008). Alpha v integrins mediate beta-amyloid induced inhibition of long-term potentiation. *Neurobiology of Aging*, 29(10), 1485–1493. doi:[10.1016/j.neurobiolaging.2007.03.018](https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.03.018).
- Woo, D., Sauerbeck, L. R., Kissela, B. M., Khoury, J. C., Szaflarski, J. P., Gebel, J., et al. (2002). Genetic and environmental risk factors for intracerebral hemorrhage: preliminary results of a population-based study. *Stroke*, 33(5), 1190–1195.
- Yamada, Y., Metoki, N., Yoshida, H., Satoh, K., Ichihara, S., Kato, K., et al. (2006). Genetic risk for ischemic and hemorrhagic stroke. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(8), 1920–1925. doi:[10.1161/01.atv.0000229694.97827.38](https://doi.org/10.1161/01.atv.0000229694.97827.38).
- Zhu, J., Motejlek, K., Wang, D., Zang, K., Schmidt, A., & Reichardt, L. F. (2002). Beta8 integrins are required for vascular morphogenesis in mouse embryos. *Development*, 129(12), 2891–2903.
- Ziegler, A., Van Steen, K., & Wellek, S. (2011). Investigating Hardy–Weinberg equilibrium in case-control or cohort studies or meta-analysis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 128(1), 197–201. doi:[10.1007/s10549-010-1295-z](https://doi.org/10.1007/s10549-010-1295-z).