



UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI PALERMO
FACOLTÁ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO BIOMEDICO DI MEDICINA INTERNA E
SPECIALISTICA

DOTTORATO DI RICERCA IN GENETICA E FISIOPATOLOGIA DEL
DANNO CARDIOVASCOLARE NELLE MALATTIE
ENDOCRINO-METABOLICHE XXII CICLO

Coordinatore: Prof. Giuseppe Licata

**Polimorfismo a singolo nucleotide dei geni
pro-infiammatori /anti-infiammatori e
trombotico/fibrinolitici in pazienti con
ictus ischemico acuto e relazione con il
sottotipo TOAST**

Tesi di Dottorato di:
Liboria Barreca

Tutor Prof. Antonino Tuttolomondo

Anno Accademico 2009/2010

Indice

| | |
|---|----|
| Fisiopatologia dell'Ischemia Cerebrale | 4 |
| Eziologia dell'infarto cerebrale..... | 8 |
| Embolismo | 8 |
| Modificazioni locali nella parete vasale..... | 10 |
| Anomalie emodinamiche | 11 |
| Cause più rare di ictus ischemico..... | 12 |
| <i>Disturbi della coagulazione</i> | 12 |
| <i>Dissecazione</i> | 13 |
| <i>Abuso di sostanze illecite</i> | 14 |
| <i>Vasculiti e vasculopatie infiammatorie</i> | 15 |
| <i>Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL)</i> | 16 |
| <i>Mitochondrial Encephalomyopathy with Lactate Acidosis and Stroke-like episodes (MELAS)</i> | 18 |
| <i>Eemicrania</i> | 19 |
| <i>Infarti venosi</i> | 19 |
| <i>Infarto cerebrale da causa sconosciuta</i> | 19 |
| Classificazione Eziopatogenetica (Criteri TOAST) | 21 |
| Aterosclerosi delle grandi arterie (LAAS)..... | 22 |
| Cardioembolico (CEI)..... | 24 |
| Ictus Lacunare | 25 |
| Altra Eziologia Determinata (ODE) | 26 |
| Eziologia Indeterminata (UDE) | 27 |
| Genetica dell'ictus | 28 |
| Studi Epidemiologici | 28 |
| Malattie Monogeniche: Il modello del Cadasil..... | 29 |
| Studi di Linkage: Identificazione di Stroke Susceptibility Genes | 31 |
| Polimorfismi dei Candidate Genes | 32 |

| | |
|---|----|
| <i>Polimorfismo a singolo nucleotide dei geni pro-infiammatori /anti-infiammatori e trombotico/fibrinolitici in pazienti con ictus ischemico acuto e relazione con il sottotipo TOAST</i> | 37 |
| <i>Introduzione</i> | 37 |
| <i>Materiali e metodi</i> | 41 |
| Selezione dei pazienti | 41 |
| Metodi di laboratorio | 46 |
| <i>Analisi molecolare degli aplotipi degli alleli del gene della IL-10 al nucleotide -1082</i> | 46 |
| <i>Analisi molecolare del polimorfismo VNR dell'esone 2 dell'IL-1RN</i> | 47 |
| <i>Analisi molecolare degli alleli del gene della IL-6 al nucleotide -174 (-174G/C)</i> .. | 48 |
| <i>Analisi molecolare del polimorfismo del promoter PAI-1 4G/5G</i> | 48 |
| <i>Analisi molecolare degli alleli del gene del tPA al nucleotide -7351 (-7351C/T)</i> .. | 48 |
| <i>Analisi Statistica</i> | 49 |
| <i>Risultati</i> | 50 |
| <i>Discussione</i> | 55 |
| <i>Bibliografia</i> | 66 |

Fisiopatologia dell'Ischemia Cerebrale

L'encefalo costituisce solo il 2% del peso corporeo, ma richiede il 15-20% circa di tutta l'energia disponibile. Il normale flusso ematico cerebrale è stimato in 50 litri/ora, che corrisponde a 0,6 ml per grammo di tessuto cerebrale per minuto. Una riduzione del flusso ematico cerebrale causata dall'improvvisa occlusione di un'arteria determina un'improvvisa deplezione di ossigeno e glucosio, che rappresentano la quasi totalità dei substrati energetici usati dall'encefalo. Il glucosio deriva direttamente dal flusso ematico perché l'encefalo non ha possibilità di immagazzinare glicogeno. L'encefalo necessita di 5,5 mg circa di glucosio per 100 mg al giorno (circa un cubetto di zucchero all'ora).

L'ATP può essere considerato il "carburante" per il cervello. La metabolizzazione di una molecola di glucosio attraverso la glicolisi, il ciclo di Krebs e la fosforilazione ossidativa (glicolisi aerobia) produce 38 molecole di ATP. Quando l'apporto ematico di ossigeno si abbassa a un livello al di sotto di quello necessario per la respirazione mitocondriale, l'energia deve essere ricavata dalla glicolisi anaerobia. Questo sistema è meno efficace rispetto al metabolismo aerobio; una molecola di piruvato e una molecola di lattato possono provvedere alla formazione di due molecole di ATP.

Durante un episodio ischemico, le concentrazioni di glucosio decrescono rapidamente; dopo 30 secondi rimane solo il 15% della quantità di glucosio normalmente presente. Nella fase iniziale dell'infarto cerebrale, l'area ischemica è caratterizzata da un nucleo centrale con danno irreversibile, circondato da un margine di tessuto meno ischemizzato chiamato penombra ischemica. Questa

zona di penombra ha preservato l'integrità strutturale che permette ai neuroni coin-volti di recuperare la propria funzionalità quando viene ripristinata la circolazione ematica [1].

La perdita delle funzioni cellulari e il danno dipendono dalla durata dell'ischemia e dalla possibilità di formazione di circoli collaterali. La sintesi proteica è molto vulnerabile all'ischemia ed è inibita quando la circolazione ematica cerebrale scende al di sotto di 0,5 ml per grammo di tessuto cerebrale per minuto. Un'ulteriore riduzione del flusso ematico cerebrale determina soppressione della sintesi dell' mRNA e depolarizzazione della membrana cellulare che si hanno per un flusso al di sotto di 0,15 ml per grammo di tessuto cerebrale per minuto [2].

La riduzione dell'attività elettrica neuronale è strettamente correlata all'eccessivo rilascio e alla ridotta ricaptazione del glutammato, aminoacido eccitatore, che determina una sovraeccitazione dei canali del calcio, con massiccio ingresso a livello della cellula di ioni calcio e sodio. In circostanze normali, le concentrazioni di ioni calcio sono 10.000 volte più alte a livello extracellulare che all'interno della membrana cellulare. Gli ioni calcio liberi a livello intracellulare attivano una serie di processi potenzialmente dannosi. Essi attivano enzimi come lipasi, fosfolipasi, proteasi ed endonucleasi che possono distruggere differenti strutture cellulari [3]. Inoltre, sia gli ioni sodio intracellulari sia gli ioni calcio possono attivare l'ATPasi, che consuma così direttamente le scorte di energia. La riduzione dell'energia intracellulare e la presenza di fosfolipasi portano verso il danno irreversibile delle membrane. L'attivazione della glicolisi anaerobia induce la produzione di lattato e di ioni idrogeno, con conseguente riduzione del pH. Questa acidosi dà inizio al rilascio di ferro con successiva formazione di radicali liberi.

Durante la riperfusione, diversi altri sistemi possono produrre questi radicali liberi, peggiorando così le conseguenze dell'iniziale danno ischemico [4].

Il danno che può essere determinato dalla riduzione della pressione di perfusione secondaria a ipotensione transitoria può essere neutralizzato dalla vasodilatazione. Tale processo di autoregolazione garantisce un più o meno costante apporto ematico. Sfortunatamente, questo stesso meccanismo di difesa è vulnerabile a circostanze che portano a un'ipossia cronica. Elevati livelli di CO₂ causano vasodilatazione. Questo meccanismo di difesa previene il danno permanente secondario a circostanze responsabili di ipossia cronica. Oltre alla vasodilatazione transitoria o cronica, un'altra ragione per cui l'occlusione di una delle arterie principali non sempre porta all'infarto cerebrale è la capacità del cervello di utilizzare circoli di compenso.

Questo meccanismo di difesa è molto più efficace se l'arteria si occlude lentamente secondo un processo lento e progressivo. Alla base dell'encefalo, le arterie carotidi interne e l'arteria basilare sono connesse le une alle altre attraverso il circolo di Willis. Tutte le principali arterie intracraniche prendono origine da questo "girotondo". Un circolo di Willis completo è l'unica possibilità per la formazione di circoli collaterali di compenso in caso di disfunzioni a livello delle arterie carotidi o dell'arteria basilare. Di conseguenza, è possibile che occlusioni arteriose a livello del collo rimangano completamente senza segni clinici.

Nei pazienti con un'occlusione dell'arteria carotide interna, anche l'arteria carotide esterna può determinare circoli collaterali di compenso via l'arteria faciale verso l'arteria oftalmica, dove si stabilisce un'inversione di flusso che riporta flusso ematico alla parte distale dell'arteria carotide interna stessa. L'occlusione di una

Fisiopatologia dell'Ischemia Cerebrale

delle arterie vertebrali spesso determina un infarto nel territorio di irrorazione dell'arteria cerebellare postero-inferiore, che è il ramo principale dell'arteria. Di solito, il flusso ematico nell'arteria basilare è preservato dall'arteria vertebrale controlaterale. Talvolta si può determinare un circolo di compenso che irrori l'arteria cerebellare postero-inferiore con un flusso che proviene dall'arteria vertebrale non occlusa, con inversione di flusso nella parte distale dell'arteria vertebrale quando quest'ultima è occlusa all'origine.

L'occlusione di un grosso vaso intracranico può anche essere neutralizzata dall'attivazione di circoli collaterali di compenso attraverso rami leptomeningei, che prendono origine dalle principali arterie intracraniche e sono localizzati a livello della superficie della corteccia cerebrale. Grazie alla presenza di questo sistema, un'occlusione prossimale dell'arteria cerebrale media può, ad esempio, essere compensata da circoli collaterali che si formano attraverso i rami superficiali della stessa arteria o attraverso i rami delle arterie cerebrali anteriore e posteriore.

Eziologia dell'infarto cerebrale

Le principali categorie eziologiche dell'ictus ischemico sono:

1. Embolismo
2. Cambiamenti locali nella parete del vaso
3. Anomalie emodinamiche
4. Altro, cause più rare.

L'aterosclerosi è il disturbo principale responsabile di ischemia cerebrale, in particolare nell'anziano. Fattori di rischio per l'aterosclerosi sono l'ipertensione arteriosa, il fumo, il diabete mellito, l'iperlipidemia e l'obesità [5].

Recentemente, l'iperomocisteinemia è stata proposta come promotrice dell'aterosclerosi [6]. L'adesione di leucociti alle cellule endoteliali è il primo passo nello sviluppo dei cambiamenti aterosclerotici che, in ultima analisi, risultano in accumulo di lipidi e collagene [7]. A livello di queste lesioni focali è possibile l'attivazione delle piastrine, che possono costituire una potenziale sorgente tromboembolica. Le placche aterosclerotiche possono diventare calcifiche e ulcerate, trasformandosi in un'altra possibile fonte di embolia.

Embolismo

Un embolo a livello del sistema arterioso può essere trasportato fino al cervello, causando l'occlusione di una grossa arteria intracerebrale o di uno dei suoi rami principali. In questo modo si hanno infarti cerebrali relativamente grossi a livello dei territori di irrorazione delle arterie cerebrali anteriori, medie, posteriori o del tronco basilare. Un importante studio italiano ha dimostrato che molte arterie occluse da un embolo possono rivascolarizzarsi entro qualche ora per la

Eziologia dell'infarto cerebrale
dissoluzione del trombo [8]. Pertanto, la diagnosi di embolismo come causa di un infarto cerebrale dovrebbe essere basata sulla presenza di una potenziale sorgente di embolia più che sulla presenza di un'arteria occlusa. Lesioni aterosclerotiche che possono rappresentare una sorgente di embolismo sono principalmente localizzate a livello dell'arco aortico [9], dell'origine dei grossi vasi cerebrali, della biforcazione carotidea o del sifone carotideo.

Il cuore è un'altra importante fonte di embolismo. Frequentemente, nei pazienti con embolismo cardiaco è possibile riscontrare più di un infarto cerebrale in differenti territori arteriosi. Il 20% circa degli infarti cerebrali trova la propria origine nel cuore. La fibrillazione atriale è la più frequente sorgente di embolismo cardiaco. Un (recente) infarto del miocardio che determina anomalie della parete ventricolare può essere la causa della formazione di un trombo che può portare a tromboembolismo. La presenza di valvole artificiali o di anomalie valvolari rappresenta un'altra categoria di potenziali fonti di embolismo cardiaco. Inoltre, cardiomiopatie, tumori intracardiaci, endocarditi o chirurgia cardiaca possono portare all'embolismo cerebrale.

Anche l'associazione tra forame ovale pervio e trombosi venosa profonda agli arti inferiori è stata considerata una possibile causa di embolismo, ma il suo ruolo è probabilmente minore rispetto a quanto si pensasse qualche tempo fa [10]. Altre cause rare di embolismo a partenza dal cuore destro che possono causare embolismo cerebrale in associazione al forame ovale pervio sono: emboli di polvere di talco come conseguenza di abuso di sostanze stupefacenti per via endovenosa, emboli di sostanze grassose dopo fratture ossee, emboli di cartilagine determinati dalla rottura degli anelli fibrosi dei dischi intervertebrali, cellule

Eziologia dell'infarto cerebrale tumorali che invadono e penetrano attraverso la parete del vaso [11]. Raramente un embolismo di frammenti di colesterolo può essere presente in pazienti con diffusa patologia ateromatosa. Si può presentare spontaneamente, ma più spesso è una complicanza di procedure intra-arteriose o chirurgiche [12]. Questi emboli possono coinvolgere la microcircolazione in tutto l'organismo, inclusa quella del cervello. Inoltre, cause rare di embolismo comprendono gli aneurismi o la presenza di malformazioni vascolari. Queste malformazioni possono contenere al loro interno trombi che possono poi embolizzare distalmente.

Modificazioni locali nella parete vasale

Il restringimento di un'arteria o di un'arteriola può causare un'ostruzione locale al flusso ematico. Di solito ciò accade come conseguenza di un ispessimento della parete vasale che determina un lume vasale più piccolo. Questo meccanismo è responsabile della formazione di infarti lacunari, che sono più frequentemente localizzati nelle regioni profonde o a livello tronco encefalico [13]. Gli infarti lacunari di solito hanno un diametro compreso tra 0,5 e 1,5 centimetri. Le arteriole che si occludono hanno un diametro $\leq 0,5$ millimetri. Il processo che porta all'ispessimento della parete vasale è chiamato lipoalinosi o microateromatosi. I principali fattori di rischio implicati in questa patologia sono l'ipertensione arteriosa e il diabete. Grandi infarti sottocorticali si formano nelle stesse zone dove si formano gli infarti lacunari, ma sono localizzati nei territori di vascolarizzazione di una piccola arteriola [14]. L'eziologia di questo tipo di infarto è di solito la presenza di una placca aterosclerotica in un'arteria principale

Eziologia dell'infarto cerebrale intracerebrale che blocca le origini di diversi piccoli rami perforanti [15]. L'occlusione di una grossa arteria intracranica determinata dai cambiamenti locali della parete vasale è più comune nella popolazione nera, negli Ispanici e nelle popolazioni asiatiche ed è responsabile di una minoranza di infarti che coinvolgono i grossi vasi [16]. Un restringimento progressivo delle parti distali dell'arteria carotide interna può determinare una patologia che prende il nome di sindrome di Moya Moya, caratterizzata da numerose piccole collaterali alla base dell'encefalo [17]. Il quadro determinato dalla presenza di queste piccole collaterali produce un'immagine che assomiglia alla nuvola del fumo di sigaretta, che in lingua giapponese è conosciuto come Moya Moya.

Anomalie emodinamiche

L'ipoperfusione dell'encefalo può causare un'ischemia globale, ma anche infarti circoscritti in determinate zone. Questi infarti sono chiamati *borderzone infarcts* [18] e sono il risultato di una bassa pressione di perfusione nel sistema arterioso che porta a carenza di sangue nelle parti più distali dei territori arteriosi. Di conseguenza, questi infarti sono localizzati nelle zone di confine tra i distretti arteriosi adiacenti di due differenti arterie cerebrali o tra le aree di vascolarizzazione superficiale e profonda dell'arteria cerebrale media [19]. La causa più comune è un'ipotensione transitoria o una riduzione transitoria della gittata cardiaca. Anche stenosi gravi localizzate a livello delle grosse arterie del collo possono contribuire alla formazione di *borderzone infarcts* quando non è presente una circolazione collaterale di compenso adeguata.

Cause più rare di ictus ischemico

Disturbi della coagulazione

Anomalie della coagulazione di solito determinano trombosi venose, ma (spesso in combinazione) sono responsabili di oltre l'8% di tutti gli infarti cerebrali. Queste anomalie possono essere disturbi primitivi del sistema della coagulazione o della funzione piastrinica, ma possono anche essere secondari ad altre patologie presenti in un organismo. Molte anomalie primitive della coagulazione sono trasmissibili geneticamente. La resistenza alla proteina C attivata può essere determinata da una mutazione del gene del fattore V di Leiden. La mutazione del fattore II (protrombina) determina aumentati livelli plasmatici di protrombina. Queste anomalie della coagulazione sono associate all'ictus ischemico [20]. La stessa associazione è presente per la carenza di proteine con proprietà anticoagulanti, come la proteina S, la proteina C e l'antitrombina III. La carenza di questi anticoagulanti naturali determina un aumento del rischio di trombosi venose, ma anche le trombosi arteriose sono state considerate associate alla riduzione di queste proteine [21]. Il deficit di queste proteine può anche essere causato da patologie renali, epatiche e intestinali. Aumenti delle concentrazioni del fattore VIII, come quelli del fattore di von Willebrand, sono associati a un lieve aumento del rischio di eventi tromboembolici arteriosi.

Anomalie della coagulazione possono anche essere il risultato della presenza di un tumore, dell'uso di farmaci o di vasculiti.

La coagulazione intravasale disseminata (CID) può determinare ictus sia ischemici sia emorragici [22]. Gli anticorpi antifosfolipidi, come il lupus

Eziologia dell'infarto cerebrale anticoagulante e gli anticorpi anticardiolipina, aumentano il rischio di ictus ischemico [23]. La sindrome di Sneddon è l'associazione di anticorpi antifosfolipidi, livedo reticularis e ischemia cerebrale focale. TIA e infarti cerebrali ischemici sono di frequente riscontro sia nei pazienti con trombocitosi essenziale sia nei pazienti con policitemia vera.

Le paraproteinemie, soprattutto la macroglobulinemia di Waldenstrom, possono determinare una sindrome da iperviscosità che può essere complicata da un infarto cerebrale. Tuttavia, un'iperviscosità ematica generalmente tende a determinare sintomi di ischemia globale più che di ischemia focale. Anche la leucemia, anch'essa responsabile di un aumento della viscosità ematica, è associata a infarto cerebrale. L'anemia può provocare un ictus ischemico cerebrale probabilmente solo se si associa a una patologia arteriosa. Nell'anemia falciforme è notoriamente presente l'associazione di anemia grave e danno della parete arteriosa che coinvolge sia le piccole arterie sia le arterie più grandi [24].

Dissecazione

La dissecazione arteriosa è il risultato della rottura parziale della parete arteriosa. Si forma così un ematoma tra i diversi strati della parete stessa. Le dissecazioni subintimali dovrebbero essere distinte dalle dissecazioni subavventiziali. Gli infarti cerebrali, di solito, sono causati da una dissecazione subintimale. Le dissecazioni interessano principalmente le arterie extracraniche, ma sono state descritte anche dissecazioni intracraniche [25]. Un trauma è la causa più frequente di dissecazione, sia esso diretto, con ferita penetrante al collo, o indiretto, dopo incidenti automobilistici, attività sportive o altre che determinano movimenti di

Eziologia dell'infarto cerebrale

torsione del collo. La presenza di connettivopatie aumenta la probabilità di sviluppare una dissecazione arteriosa. Di solito, i pazienti accusano cefalea prima della comparsa di sintomi neurologici focali. In caso di dissecazione dell'arteria carotide, il dolore è spesso localizzato a livello perioculare e in caso di dissecazione dell'arteria vertebrale a livello del collo. La dissecazione può rimanere asintomatica, anche se l'ematoma che si forma nella parete arteriosa causa un restringimento o l'occlusione dell'arteria stessa con ostacolo al normale flusso ematico. Talvolta la rottura della parete arteriosa termina nel lume; in questi casi, l'embolismo può anche essere l'eziologia dell'infarto cerebrale. Le dissecazioni subavventiziali di norma non determinano il restringimento del lume dell'arteria carotide o dell'arteria vertebrale, ma possono provocare la compressione delle strutture vicine all'arteria, quali il sistema simpatico o alcuni nervi cranici. La dissecazione dell'aorta può portare all'occlusione all'origine di una delle arterie cerebroafferenti e questo può determinare un infarto cerebrale. Questi pazienti spesso presentano all'inizio della sintomatologia un dolore interscapolare. La diagnosi dovrebbe essere sospettata soprattutto quando il polso radiale è assente o asimmetrico. La dissecazione dell'aorta può essere la prima manifestazione della malattia di Takayasu.

Abuso di sostanze illecite

L'abuso di amfetamine, cocaina ed eroina può determinare un danno a livello della parete delle arterie intracraniche e pertanto deve essere considerato una potenziale causa di infarto cerebrale. I meccanismi considerati causa di infarto cerebrale nei pazienti che fanno uso di sostanze illecite sono la vasocostrizione, la vasculite e

l'aumento dell'aggregabilità piastrinica. Meccanismi secondari sono emboli di materiale iniettato, come polvere di talco, o emboli a partenza da valvole cardiache infettate per la presenza di un'endocardite infettiva secondaria (principalmente dovuta a *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Streptococcus*). L'abuso di sostanze illecite può determinare crisi ipertensive (transitorie), che causano un incremento del rischio di infarti che coinvolgono i piccoli vasi o emorragie intracerebrali.

Vasculiti e vasculopatie infiammatorie

L'infiammazione della parete del vaso è rara, ma è un'importante causa di ictus ischemico che necessita di un trattamento specifico. Le vasculopatie infiammatorie possono essere suddivise in vasculiti "vere", caratterizzate da infiltrazione di cellule infiammatorie della serie bianca a livello dei differenti strati della parete del vaso, e in altre vasculopatie nelle quali sono coinvolti diversi meccanismi patogenetici e nelle quali non può essere dimostrata l'infiltrazione di cellule infiammatorie all'interno della parete vasale. Le vasculiti del sistema nervoso centrale (SNC) possono essere sia isolate e confinate al solo sistema nervoso sia manifestazioni di una vasculite sistemica multiorgano; possono anche essere definite primarie, senza altre patologie sottostanti, o secondarie a patologie infettive, sarcoidosi, uso di sostanze illecite o patologie linfoproliferative. Raramente, nei pazienti con patologie infiammatorie del tessuto connettivo, come il LES, una vasculite può essere la causa di ictus, ma in questi casi è più frequente che siano presenti altre cause che determinano un ictus ischemico, quali ipertensione arteriosa, coagulopatie o altre sorgenti cardiache tromboemboliche.

Un'altra rara possibilità è la vasculite come manifestazione paraneoplastica. Per una diagnosi definitiva di vasculite è indispensabile la conferma istologica. I cambiamenti vascolari che si verificano nelle angiopatie non vasculitiche possono essere di origine infiammatoria, con rigonfiamento delle cellule endoteliali, aumento dell'espressione delle molecole infiammatorie di adesione nell'endotelio, deposizione di immunocomplessi o infiltrato cellulare infiammatorio perivascolare. In questa luce, dovrebbero essere considerate patologie ereditarie, patologie metaboliche e del tessuto connettivo. La displasia fibromuscolare è la conseguenza della proliferazione di cellule muscolari lisce a livello della tonaca media e della formazione di tessuto fibroso a livello dell'endotelio delle arterie intracraniche [26]. Le anomalie vasali sono caratterizzate da restringimenti anulari segmentari visibili all'angiografia come "corona di rosario". La zona principalmente coinvolta è la parte distale extracranica delle arterie carotidi. L'arteria vertebrale è coinvolta nel 20% dei casi. La displasia fibromuscolare si presenta più di frequente nelle donne di mezza età ed è associata a un deficit di α 1-antitripsina.

Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL)

Il CADASIL è una patologia ereditaria causata, secondo la descrizione originaria, da una mutazione del gene NOTCH3 sul cromosoma 19. Al momento attuale sono state riscontrate diverse altre mutazioni. La patologia è caratterizzata da lesioni ischemiche sottocorticali localizzate nella sostanza bianca. Di solito si sviluppa

Eziologia dell'infarto cerebrale nei giovani adulti ed è associata a emicrania. Dopo anni, queste lesioni spesso determinano una demenza di tipo sottocorticale.

| <i>ANGIOPATIE ASSOCIATE A ICTUS ISCHEMICO O MALATTIA DELLA SOSTANZA BIANCA</i> | |
|---|---|
| Patologia | Causa di ictus ischemico |
| CADASIL | Arteriopatia dei piccoli vasi |
| MELAS | Arteriopatia dei piccoli vasi |
| Malattia di Fabry | Arteriopatia dei piccoli vasi |
| Angiopatia amiloide | Arteriopatia dei piccoli vasi |
| Sindrome di Moya Moya | Patologia arteriosa occlusiva |
| Porpora trombotica trombocitopenica | Arteriopatia dei piccoli vasi: trombosi e fibrosi |
| Malattia di Whipple | Patologia infettiva arteriosa fibrotica |
| Neurofibromatosi tipo I | Patologia arteriosa occlusiva |
| Malattia del rene policistico AD | Dissecazione arteriosa; sindrome di Moya Moya |
| Displasia fibromuscolare | Arteriopatia dei vasi di medio/grosso calibro: dissecazione |
| Malattia di Kohlmeier-Degos | Arteriopatia dei piccoli vasi |
| Tromboangioite obliterante | Arteriopatia dei vasi di medio/grosso calibro |
| Malattie ereditarie del tessuto connettivo | |
| Sindrome di Ehlers-Danlos | Dissecazione dei vasi cervicali |
| Sindrome di Marfan | Dissecazione dei vasi cervicali |
| Osteogenesis imperfecta | Dissecazione dei vasi cervicali |

| ANGIOPATIE ASSOCIATE A ICTUS ISCHEMICO O MALATTIA DELLA SOSTANZA BIANCA | |
|--|--|
| Pseudoxanthoma elasticum | Patologia dei piccoli vasi; dissecazione dei vasi cervicali |
| Farmaci vasocostrittori: | |
| Derivati dell'ergot | Vasocostrizione |
| Decongestionanti nasali | Vasocostrizione |
| Farmaci serotoninergici | Vasocostrizione |
| Vasculopatia da radiazioni | Stenosi/trombosi locali |

Tabella 1: Angiopatie associate a ictus ischemico o malattia della sostanza bianca

Mitochondrial Encephalomyopathy with Lactate Acidosis and Stroke-like episodes (MELAS)

Nei pazienti affetti da MELAS, la causa degli infarti cerebrali è ancora incerta. Gli infarti possono essere determinati da un difetto nella fosforilazione ossidativa o da anomalie dei piccoli vasi intracranici. Di solito, la patologia colpisce ragazzi o giovani adulti. Gli infarti cerebrali sono prevalentemente localizzati a livello dei lobi occipitali e possono pertanto determinare cecità corticale. Sono presenti aumentati livelli di lattato a digiuno nel plasma e nel liquor e i pazienti colpiti spesso presentano caratteristiche cliniche e istologiche di miopatia mitocondriale [27].

Emicrania

Una preesistente emicrania con aura transitoria e innocua può trasformarsi in un persistente deficit secondario a un infarto come risultato di un prolungato vasospasmo. Anche un aumento dell'aggregabilità piastrinica va considerato un potenziale fattore eziologico in questo sottotipo di ictus. Questo infarto di solito si localizza nel territorio di irrorazione dell'arteria cerebrale posteriore. Molto spesso, ma non sempre, la presenza di questi infarti è associata a cefalea. In generale, i deficit neurologici non si sviluppano subito con il massimo del deficit, ma in modo graduale. L'infarto emicranico dovrebbe essere diagnosticato per esclusione, vale a dire che devono essere escluse tutte le altre cause potenzialmente responsabili di un infarto cerebrale [28].

Infarti venosi

Gli infarti venosi possono essere la conseguenza della trombosi di un seno cerebrale. La caratteristica chiave di questi infarti è che essi non si presentano in un classico territorio di distribuzione di (un ramo di) una grossa arteria intracranica. Sono spesso infarti emorragici ed è presente maggiore edema rispetto agli infarti determinati dall'occlusione di un ramo arterioso [29].

Infarto cerebrale da causa sconosciuta

Nonostante procedure diagnostiche estese e meticolose, l'eziologia dell'ischemia cerebrale in alcuni casi può rimanere indeterminata. Nei pazienti anziani, la causa più probabile è la presenza di lesioni aterosclerotiche non visualizzate. Nel

Eziologia dell'infarto cerebrale
giovane adulto vi è maggiore incertezza su questo dato, anche se l'aterosclerosi è la causa più frequente nei pazienti tra 35 e 45 anni di età. Diversi studi hanno dimostrato che tra i giovani adulti che presentano ictus ischemico o TIA, in un quarto non è possibile trovare una spiegazione dell'occlusione arteriosa transitoria o permanente.

Classificazione Eziopatogenetica (Criteri TOAST)

La necessità di proporre una classificazione eziologica dell'ictus ischemico è emersa nel momento in cui si è osservato come la prognosi, il rischio di ricorrenza e le diverse opportunità di trattamento fossero fortemente influenzati dai differenti sottotipi eziologici.

Una precoce identificazione del sottotipo di ictus è vantaggiosa sia per la gestione clinica del paziente sia per il disegno dei protocolli di ricerca. I meccanismi di insulto ischemico possono, infatti, differire enormemente nei diversi sottotipi eziologici. Con questo intento, Madden et al. nel 1994 hanno proposto la classificazione TOAST (The trial of ORG 10172 in acute ictus therapy), che prevede la suddivisione nelle seguenti cinque categorie principali:

1. Aterosclerosi delle grandi arterie (LAAS)
2. Cardioembolismo (CEI)
3. Lacunare
4. Ictus ad altra eziologia determinata (ODE)
5. Ictus ad eziologia ignota (UDE)

Le suddette categorie possono soddisfare i criteri di:

- Eziologia "probabile", quando le caratteristiche cliniche, i risultati delle neuroimaging e degli altri test diagnostici dimostrano una eziologia escludendone altre.
- Eziologia "possibile", quando le caratteristiche cliniche e i risultati delle indagini neuroradiologiche suggeriscono un'eziologia, ma gli esami diagnostici non sono stati completati.

Classificazione Eziopatogenetica (Criteri TOAST)

L'individuazione dei sottotipi eziologici si basa sulla definizione del profilo di rischio vascolare, sulla presentazione clinica e sulla diagnostica strumentale che si avvale di TC, RM, ecocolor-Doppler, Doppler transcranico, ECG, ecocardiogramma (transtoracico e transesofageo), sull'identificazione di sindromi protrombotiche e, infine, sulla valutazione autoptica.

Aterosclerosi delle grandi arterie (LAAS)

L'attribuzione al sottotipo che riconosce quale eziopatogenesi la malattia dei grossi vasi prevede il riscontro di stenosi >50% od occlusione di una grossa arteria intra - o extracranica, presenza di segni clinici corticali (ad es., afasia, neglect, ecc.), cerebellari o da coinvolgimento del tronco encefalico, evidenza alla TC e/o alla RM di lesioni >1,5 cm di diametro ed esclusione di altre cause.

L'aterosclerosi è definita come una combinazione variabile di alterazioni intimali delle arterie, che consistono nell'accumulo locale di lipidi, complessi di carboidrati, sangue e prodotti del sangue, tessuto fibroso e depositi di calcio, con alterazioni associate della tunica media.

Le placche aterosclerotiche tendono a formarsi in corrispondenza dei siti in cui vigono particolari condizioni emodinamiche, con maggior turbolenza di flusso e conseguente microtraumatismo della parete vascolare.

Arco aortico, biforcazioni carotidiche e confluenza delle arterie vertebrali sono siti particolarmente colpiti. Molteplici sono i meccanismi attraverso cui si può generare ischemia cerebrale: la formazione su una placca ulcerata di un trombo che rapidamente occlude o stenotizza il lume del vaso; la formazione di un'emorragia all'interno della placca con conseguente protrusione intraluminale

Classificazione Eziopatogenetica (Criteri TOAST)

fino all'occlusione vasale; la frammentazione di una placca e/o del trombo su di essa formatosi può dare origine a emboli che possono occludere vasi distali di calibro inferiore.

Il progressivo accrescersi di un trombo entro il lume di un vaso può determinare l'occlusione di rami collaterali che da esso traggono origine.

L'eziopatogenesi è complessa e multifattoriale: accanto ad alcuni elementi chiaramente legati alla predisposizione genetica, esistono numerosi fattori di rischio che concorrono all'instaurarsi e/o all'aggravarsi della lesione.

I più importanti sono il fumo, l'ipertensione e l'ipercolesterolemia.

Accanto a questi vanno segnalati l'età (45-55 anni), il sesso maschile, il diabete, la gotta, l'obesità, l'ipertrigliceridemia, i contraccettivi orali, l'iperomocisteinemia e la sedentarietà. La patogenesi della malattia aterosclerotica prevede un iniziale danno strutturale a livello della parete endoteliale che comporta un'aumentata permeabilità a cellule ematiche e lipoproteine, richiamo di macrofagi e rilascio di fattori di crescita e fattori chemiotattici, proliferazione delle cellule muscolari lisce e accumulo di lipidi che porta all'accrescimento della placca.

L'aterosclerosi è una malattia degenerativa con tendenza a un coinvolgimento multisistemico ed elevato rischio di ricorrenza dal primo evento, le cui principali manifestazioni cliniche sono rappresentate da ictus, IMA e PAD (con le relative incidenze).

Cardioembolico (CEI)

L'aumento del rischio di ictus o TIA in pazienti affetti da patologie cardiache è ormai stato ampiamente documentato. L'ictus da eziologia cardioembolica rappresenta il 20% di tutti gli ictus. L'aumento del rischio emboligeno sottintende meccanismi diversi, riscontrandosi infatti in aritmie cardiache, valvulopatie, patologie infettive, malformative, vascolari e degenerative. Il denominatore comune di tutte queste condizioni è il meccanismo con cui sono in grado di provocare l'infarto cerebrale, che consiste nel rallentamento o nella stasi del flusso ematico entro le camere cardiache che conduce alla genesi di trombi e al successivo distacco di emboli da essi originati, favorito da improvvise e momentanee variazioni emodinamiche locali. E' possibile identificare patologie a elevato rischio emboligeno e altre a rischio basso o incerto. E' inoltre necessario distinguere la sede della trombosi poiché sedi diverse riconoscono patologie diverse. E' possibile identificare caratteristiche suggestive di ictus cardioembolico sia all'esame clinico sia agli esami diagnostici strumentali. Dal punto di vista clinico, l'improvvisa comparsa del massimo deficit (<5 min.), la rapida riduzione dello stato di coscienza all'inizio dei sintomi o una loro rapida regressione (shrinking syndrome), la presenza di disturbi delle funzioni corticali superiori (neglect, afasia, aprassia, emianopsia) sono solitamente suggestive di ictus cardioembolico. La TC encefalo e la RM evidenziano ictus simultanei o sequenziali in differenti territori arteriosi (soprattutto se biemisferici) o che coinvolgono la circolazione anteriore e posteriore contemporaneamente o la circolazione posteriore a più livelli. Gli ictus a genesi cardioembolica sono inoltre più frequentemente soggetti a trasformazione emorragica. La presenza all'esame

Classificazione Eziopatogenetica (Criteri TOAST)

angiografico o ultrasonografico di occlusione dell'arteria carotide con trombo fluttuante, la precoce ricanalizzazione di un vaso intracranico occluso e microemboli in entrambe le arterie cerebrali medie sono di comune riscontro negli ictus a genesi cardioembolica. Per documentare una condizione cardioembolica è necessario eseguire in tutti i pazienti ECG ed ecocardiogramma transtoracico; in casi selezionati, è opportuno sottoporre il paziente a ecocardiogramma transesofageo, monitoraggio ECG (24-48 ore) e studio elettrofisiologico.

Ictus Lacunare

La malattia dei piccoli vasi è legata fundamentalmente a due principali fattori di rischio: l'ipertensione arteriosa e il diabete mellito. Comunemente è una patologia dei piccoli vasi intracranici. Coinvolge le piccole arterie (40-440 μm di diametro) e le arteriole; diverse sono le patologie sottostanti: lipoalinosi, angiopatia amiloidea cerebrale, vasculiti e angiopatia secondaria a patologie genetiche (ad es., CADASIL). Solitamente, nelle arterie colpite si assiste a una progressiva sostituzione del tessuto collageno, dell'elastina e delle fibre muscolari da parte di depositi ialini all'interno della tunica media e intima della parete arteriosa con conseguente ridotta distensibilità e reattività vascolare; tale fenomeno, detto lipoalinosi o necrosi fibrinoide, porta con il tempo a stenosi-occlusione del lume arterioso e determina piccoli infarti cerebrali di diametro inferiore a 15 mm, definiti "lacune". Le arterie che più spesso vengono coinvolte da questo processo sono: rami perforanti lenticolostriati dell'arteria cerebrale media, rami perforanti talamici del primo tratto dell'arteria cerebrale posteriore, rami perforanti dell'arteria basilare e piccoli vasi della sostanza bianca periventricolare. Per poter

Classificazione Eziopatogenetica (Criteri TOAST)

classificare un ictus nel sottogruppo "malattia dei piccoli vasi" è necessaria la presenza di una tipica sindrome lacunare, di ipertensione arteriosa e diabete mellito, l'evidenza alla TC o RM di lesioni <1,5 cm di diametro e infine l'esclusione di altre cause.

Per quanto riguarda la definizione dal punto di vista clinico della sindrome lacunare, è necessaria l'assenza di disturbi visivi, di deficit delle funzioni corticali superiori e di segni di coinvolgimento del tronco encefalico.

Si identificano quattro categorie, in ordine decrescente di frequenza: ictus motorio puro, ictus sensitivo puro, sindrome sensitivo-motoria ed emiparesi atassica e disartria con impaccio di una mano.

Altra Eziologia Determinata (ODE)

Questo sottogruppo comprende cause meno frequenti di ictus, come disturbi ematologici (ad es., resistenza alla proteina C-S, mutazioni del fattore V di Leiden, LAC), vasculopatie infiammatorie primarie (arterite a cellule giganti, arterite di Takayasu, lupus eritematoso sistemico, sindrome di Sneddon, vasculiti necrotizzanti sistemiche, poliarterite nodosa, sindrome di Churg-Strauss, granulomatosi di Wegener, artrite reumatoide, sindrome di Sjogren, malattia di Behçet, sclerodermia, sarcoidosi, arterite isolata del sistema nervoso centrale, malattia di Burger) e anomalie congenite (displasia fibromuscolare, dolicoectasia della basilare, sindrome di Ehlers-Danlos, pseudoxantoma elastico, sindrome di Marfan, malformazioni arterovenose). Questo gruppo comprende inoltre CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts

Classificazione Eziopatogenetica (Criteri TOAST) and Leucoencephalopathy), sclerosi tuberosa, neurofibromatosi, aneurismi e vasculiti necrotizzanti sistemiche.

Eziologia Indeterminata (UDE)

Quando non è possibile procedere a tutti gli esami diagnostici a causa della gravità dell'ictus (morte precoce), per il rifiuto del paziente o quando gli esami diagnostici vengono effettuati in tempi impropri, se il paziente presenta 2-3 cause potenziali o ancora tutti gli esami fatti sono risultati negativi, l'ictus viene classificato come da causa indeterminata. Quando le cause possibili sono più di una, alcuni autori classificano questo ictus non da causa indeterminata, ma da più eziologie possibili.

Genetica dell'ictus

Stabilire l'effettivo ruolo dei fattori genetici nell'ambito della patologia cerebrovascolare è un obiettivo difficile. L'ictus è una sindrome clinica polimorfa a eziologia e patogenesi estremamente variabili: diversi fattori genetici potrebbero influenzare in diversa misura e attraverso diversi meccanismi i differenti sottotipi di ictus. In questa eterogeneità fenotipica, fattori genetici diversi svilupperebbero complesse interazioni con fattori ambientali, andando a configurare il modello di una patologia poligenica e multifattoriale. In tale modello estremamente articolato, molti sono i fattori di confondimento:

- l'età avanzata di insorgenza determina la prolungata esposizione a fattori ambientali;
- tali fattori ambientali possono essere sufficienti per indurre la presenza di malattia;
- l'espressività variabile e la penetranza incompleta di un gene predisponente potrebbero non indurre l'espressione del fenotipo in soggetti portatori del gene alterato;
- alcuni fattori di rischio vascolare ben documentati, come per esempio l'ipertensione e il diabete, hanno determinanti genetiche di per sé chiaramente dimostrate.

Studi Epidemiologici

Consistenti sono tuttavia le evidenze sperimentali che suggeriscono un ruolo dei fattori genetici nel determinismo della patologia cerebrovascolare. Studi epidemiologici hanno dimostrato che una storia familiare di ictus rappresenta un

fattore di rischio significativo, con un incremento del rischio relativo che oscilla tra 1,5 e 2,5. Una recente metanalisi condotta stratificando i pazienti per età e distinguendo, ove possibile, i differenti sottotipi di ictus ha confermato un ruolo significativo della familiarità soprattutto negli ictus che si presentano nella fascia di età inferiore a 60 anni e in quelli secondari a patologia dei grossi vasi (OR = 1,63; IC 95% 1,28-2,03) [30].

Parimenti, studi condotti su gemelli omozigoti confermano il ruolo dei fattori genetici nella patologia cerebrovascolare. Analizzando i dati ricavati dagli studi clinici disponibili emerge un grado di concordanza significativo nei gemelli omozigoti, con un odds ratio pari a 1,65 (IC 95% 1,2-2,3; P = 0,003) [31].

Malattie Monogeniche: Il modello del Cadasil

Per comprendere quale possa essere il “link” fisiopatologico tra i determinanti genetici e l'esplicitazione degli eventi cerebrovascolari, è necessario considerare separatamente le rare forme di ictus secondario a malattie monogeniche e le comuni forme multifattoriali e poligeniche.

Esistono numerose malattie monogeniche con assetto genetico ben definito in cui l'ictus è un elemento caratterizzante nell'ambito di un quadro sindromico sistemico. Sono condizioni rare, in cui alterazioni geniche note si distribuiscono secondo quadri mendeliani, conferendo un elevato rischio di ictus fin dall'età giovanile. Si riconoscono attualmente oltre 50 sindromi cliniche nelle quali l'alterazione di un singolo gene può indurre un evento cerebrovascolare favorendo l'ateromasia dei grossi vasi, la patologia dei piccoli vasi, la malformazione o la

dissecazione arteriosa, il cardioembolismo, alterazioni ematologiche, disturbi mitocondriali e canalopatie.

Il modello paradigmatico di queste forme monogeniche è rappresentato dal CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy), sindrome caratterizzata sul piano clinico da ricorrenti ischemie sottocorticali, deterioramento cognitivo su base vascolare e, sul piano genetico, da alterazioni a carico del gene NOTCH3. Questo gene, localizzato sul braccio lungo del cromosoma 19 (19q12), codifica per una proteina recettoriale con funzioni non esattamente note. Il gene è altamente espresso durante lo sviluppo embrionale con verosimili funzioni di controllo sulla differenziazione cellulare. Nell'adulto, la proteina codificata si localizza prevalentemente sulla membrana delle cellule muscolari lisce della parete vasale e tra le funzioni svolte si ipotizza un ruolo nel mantenimento delle cellule muscolari in uno stato di differenziazione terminale inibendone la proliferazione e la migrazione. Le mutazioni a carico degli esoni 3 e 4 alterano la conformazione della proteina interferendo con le caratteristiche funzionali e determinando variazioni steriche che possono provocarne l'aggregazione omodimerica ed eterodimerica, con conseguente accumulo intracellulare e danno irreversibile della cellula muscolare [32].

Gli ictus secondari ad alterazioni monogeniche, pur rappresentando un modello fisiopatologico estremamente interessante e pur dovendo essere tenuti in considerazione in presenza di ictus a insorgenza giovanile in assenza di chiari elementi predisponenti, con evidente distribuzione familiare, presentano un impatto epidemiologico assolutamente trascurabile.

Studi di Linkage: Identificazione di Stroke Susceptibility Genes

Per valutare il ruolo dei fattori genetici nell'ictus poligenico e multifattoriale si stanno sviluppando parallelamente due differenti strategie: gli studi di linkage e lo studio dei polimorfismi nei "candidate genes".

Gli studi di linkage si basano sulla valutazione di sequenze genomiche condivise in soggetti appartenenti a una stessa famiglia, affetti da una determinata patologia.

Nel caso specifico della patologia cerebrovascolare, sono complicati dal fatto di non poter disporre di famiglie con un elevato numero di membri affetti a causa dell'età avanzata di insorgenza. Tuttavia, nell'Icelandic Genetic Data Base sono presenti circa 2000 pazienti con ictus e 179 gruppi familiari con almeno 2 individui affetti. Lo screening con circa 1000 marcatori molecolari ha permesso di individuare un linkage significativo a livello del braccio lungo del cromosoma 5 (5q12) suggestivo di uno "stroke susceptibility gene". Questo gene è stato successivamente identificato con il PDE4D che codifica per la fosfodiesterasi 4D, in grado di regolare i livelli intracellulari di AMP ciclico (cAMP). Analizzando la struttura molecolare di tale gene nei pazienti con ictus non sono state riscontrate mutazioni strutturali significative che ne potessero alterare la funzione, mentre sono stati individuati numerosi polimorfismi di singoli nucleotidi (SNP) e alcune alterazioni in regioni non codificanti. I livelli di mRNA del gene PDE4D risultano significativamente ridotti, a indicare una ridotta espressione del gene. In particolare, risulta ridotta rispetto ai controlli la sintesi delle isoforme 4D1, 4D2 e 4D5 della fosfodiesterasi 4D. Come questo possa concorrere al determinismo della patologia cerebrovascolare ischemica non è noto. Il gene PDE4D è

altamente espresso a livello delle cellule muscolari lisce della parete vasale, delle cellule endoteliali, nonché a livello di linfociti T, monociti e macrofagi. È ipotizzabile una variazione dei livelli citoplasmatici di cAMP con facilitazione di processi aterosclerotici che risulterebbero comunque elettivi a carico del distretto intracranico o cerebroaffente, non essendo evidenziato alcun ruolo del gene PDE4D nella patologia coronarica o nell'arteriopatia obliterante periferica. L'analisi degli aplotipi ha permesso di individuare 3 varianti del gene PDE4D: l'aplotipo G0-Hc, che aumenta il rischio cerebrovascolare (OR = 1,98; P <0,0001), l'aplotipo AX-Lc con effetto protettivo (OR = 0,68; P = 0,003) e l'aplotipo GX con effetto neutro [33].

Utilizzando la stessa metodica è stato più recentemente mappato un gene predisponente a ictus ischemico e infarto del miocardio sul cromosoma 13 (13q12-13). Il gene ALOX5AP codifica per la proteina attivante la 5-lipossigenasi (FLAP); l'aplotipo HapA sembrerebbe raddoppiare il rischio di ictus favorendo processi aterosclerotici mediante la sintesi di leucotrieni e l'amplificazione di processi infiammatori a carico della parete vasale [34].

Polimorfismi dei Candidate Genes

Lo studio dei polimorfismi nei candidate genes si è dimostrato una metodica adatta allo studio di una patologia poligenica come l'ictus. La metodica consiste nell'individuare geni potenzialmente implicati nell'eziopatogenesi della patologia cerebrovascolare, valutarne le diverse varianti e analizzare se queste si distribuiscano diversamente nei pazienti con ictus rispetto alla popolazione generale. Partendo dalle prime evidenze riscontrate nello studio della patologia

coronarica, i primi candidate genes esplorati nella patologia cerebrovascolare sono stati quelli codificanti diversi fattori dell'emostasi. Gli studi di associazione dei polimorfismi riguardanti il fattore V (Q506 Leiden), il fattore VII (R353Q), il fattore XIII (Val34Leu), la protrombina (G20210A) e l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno PAI1 (4G/5G) non hanno fornito risultati conclusivi. L'omozigosi per la sostituzione \rightarrow A nella posizione 455 del gene del β -fibrinogeno risulta significativamente associata all'ictus secondario a patologia dei grossi vasi e recentemente dimostrata anche nell'ictus lacunare [35].

La variante P1A2 del gene che codifica per il recettore di adesione piastrinica GpIIb/IIIa, pur determinando un dimostrato guadagno di attività recettoriale e pur presentando un'elevata prevalenza nei soggetti affetti da infarto miocardico acuto, non è risultata associata a un incremento significativo del rischio di ictus [36].

Il gene dell'enzima di conversione dell'angiotensina è probabilmente il candidate gene più ampiamente studiato nella patologia cerebrovascolare in conseguenza alle prime evidenze secondo le quali il polimorfismo inserzione/delezione a carico dell'introne 16 potesse rappresentare un fattore di rischio indipendente per l'infarto del miocardio. Una metanalisi condotta su 7 studi (per un totale di 1196 pazienti e 722 controlli) ha dimostrato che l'allele D determina un lieve, ma significativo incremento nel rischio di ictus (OR 1,31; IC 95% 1,06-1,62; P = 0,01). Più recenti studi prospettici non hanno confermato tale risultato [37].

Partendo dalle recenti acquisizioni sul ruolo dell'iperomocisteinemia quale fattore di rischio indipendente per l'aterosclerosi e dalle evidenze che un aumento dei livelli plasmatici di omocisteina può dipendere da una mutazione di frequente riscontro, una sostituzione C \rightarrow T nella posizione 677 del gene che codifica per

l'enzima metilen-tetraidrofolato reduttasi (MTHFR), sono stati valutati i polimorfismi del gene MTHFR nella patologia cerebrovascolare ischemica.

Diversi studi, con una sola possibile eccezione, non indicano correlazioni tra il polimorfismo C677T e il rischio di ictus. Una metanalisi condotta su 19 studi (2788 pazienti e 3962 controlli) ha evidenziato il ruolo significativo del genotipo TT nel determinare iperomocisteinemia lieve/moderata, ma non nell'incrementare il rischio vascolare (OR = 1,23; IC 95% 0,96-1,58) [38].

Diversi geni implicati nella regolazione del metabolismo lipidico sono stati indagati con lo studio dei polimorfismi. Tra questi, il gene codificante per l'apolipoproteina E (ApoE) è stato tra i più esplorati. Numerosi studi hanno confermato un'associazione dell'allele $\epsilon 4$ con l'ictus ischemico e una metanalisi condotta su 926 pazienti e 890 controlli ha confermato questa associazione con un odds ratio pari a 1,68 (IC 95% 1,36-2,09). Un più recente studio evidenzia un ruolo maggiormente significativo dell'omozigosi $\epsilon 4$ nell'ictus giovanile e soprattutto in associazione ad altri fattori di rischio vascolare [39]. Non significativi i risultati degli studi condotti sui polimorfismi dei geni dell'apolipoproteina A, dell'apolipoproteina B, della lipoproteina (a) e della lipoproteinlipasi.

Un altro polimorfismo studiato nell'ambito del metabolismo lipidico è quello dei geni della paraoxonasi (PON), un'esterasi calcio-dipendente in grado di prevenire la perossidazione delle lipoproteine a bassa densità (LDL) e di contrastare pertanto il processo ateromasico. Recenti studi hanno dimostrato un'associazione significativa tra genotipo PON1-55LL e l'ateromasia carotidea e tra genotipo PON1-192RR e ictus ischemico (OR 1,84; IC 95% 1,34-2,52; P = 0,0002). Il

gruppo di Voetsch ha valutato la distribuzione dei polimorfismi PON1 nei diversi sottotipi di ictus ischemico dimostrando un'associazione significativa con le forme secondarie a malattia dei grossi vasi. Nuovi polimorfismi individuati nell'ambito del promoter del gene PON1, il C(-107)T e il G(-824)A, presentano analogamente un'associazione significativa con l'ictus ischemico (OR = 2,69; IC 95% 1,06-6,78; P = 0,04) [40].

In conclusione, possiamo affermare che i fattori genetici svolgono un importante ruolo nelle complesse interazioni tra fattori di rischio vascolare. Le malattie monogeniche rappresentano un valido modello per una migliore comprensione del rapporto fisiopatogenetico tra singolo gene e ictus e parimenti, pur presentando un impatto epidemiologico contenuto, devono essere sempre tenute in considerazione diagnostica in presenza di ictus giovanili, con distribuzione familiare, in assenza di altri chiari elementi determinanti. Anche nelle comuni forme di ictus, multifattoriale e poligenico, gli studi di linkage suggeriscono la presenza di "stroke susceptibility genes". In tale modello, lo studio dei polimorfismi nei "candidate genes" può rappresentare un importante strumento per valutare la possibile influenza dei singoli geni. I risultati finora ottenuti sono spesso di non univoca interpretazione, ma gli strumenti di studio proposti rappresentano comunque modelli troppo semplificativi rispetto alla complessità della patologia cerebrovascolare. È indubbiamente necessario considerare sistemi di complessità crescente che prevedano la contemporanea interazione di più geni favorenti o protettivi nei confronti della patologia cerebrovascolare e valutare le interazioni con i diversi fattori ambientali.

Una migliore conoscenza dei fattori genetici potrebbe permettere una più completa caratterizzazione del profilo di rischio dei singoli pazienti che, combinata con le caratteristiche farmacogenomiche dei soggetti, renderebbe possibile, in futuro, un più efficace approccio preventivo e terapeutico personalizzato.

Polimorfismo a singolo nucleotide dei geni pro-infiammatori /anti-infiammatori e trombotico/fibrinolitici in pazienti con ictus ischemico acuto e relazione con il sottotipo TOAST.

Introduzione

L'ictus ischemico è una malattia multifattoriale comune, influenzata da numerose mutazioni genetiche e fattori ambientali. Dati recenti indicano come i processi infiammatori siano chiamati in causa nella patogenesi dell'ischemia cerebrale [41].

Il Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) è un mediatore del sistema immunitario di derivazione macrofagica e linfocitica che regola la risposta flogistica, modula la crescita e la differenziazione cellulare, e attiva la cascata coagulativa.

A livello del gene codificante per il TNF- α sono stati identificati frequenti polimorfismi [42]. Tra questi una sostituzione di una G ad una A localizzata alla posizione -308 nella regione promoter è stata indicata come in grado di influenzare il tasso di trascrizione del gene del TNF- α , essendo il meno comune allele A (TNF2) associato a livelli di trascrizione costitutivi e inducibili più elevati [43]. La presenza dell'allele G (TNF1) definisce la variante comune. Precedentemente sono stati pubblicati soltanto pochi studi relativi alla connessione tra il polimorfismo del TNF- α e l'ictus [47-49].

Questi hanno riportato una prevalenza significativamente più bassa dell'allele TNF2 in pazienti con infarto cerebrale rispetto ai soggetti di controllo sani.

La Interleuchina-10 (IL-10) è una citochina anti-infiammatoria che modula l'immunità innata e acquisita. Nella risposta infiammatoria, TNF- α e IL-10 giocano ruoli opposti. Mentre il TNF- α ha generalmente una azione pro-infiammatoria, la IL-10 limita e pone fine ai processi flogistici. La Interleuchina 10 ha una potente azione inibitrice su TNF- α , IL-1 β , IL-1 [50]. Inoltre, studi in vitro [51-52] hanno mostrato che l'IL-10 riduce il peptide β amiloide – o le citochine infiammatorie indotte dal lipopolisaccaride a livello della microglia murina.

Nell'ambito della produzione della IL-10 sono riportate molte differenze ereditabili, e inoltre sono state identificate molte sequenze polimorfiche nel promoter del gene codificante per l'IL-10 [53-55].

Tre comuni polimorfismi a singolo nucleotide (“single nucleotide polymorphisms” - SNPs) nel promoter del gene codificante per la IL-10 (-1082 G/A, -819 C/T, -592 C/A) mostrano un forte “linkage disequilibrium” e danno origine a tre comuni aplotipi, designati come [ATA] [ACC] e [GCC]. Pertanto, a causa del “linkage disequilibrium” la presenza di questi aplotipi può essere pienamente determinata tramite l'analisi del polimorfismo -592 C/A, in cui la prevalenza dell'allele A indica la presenza dell'aplotipo [ATA] [56-57]. L'aplotipo [ATA] è stato associato ad una ridotta sintesi di IL-10 in vitro e in vivo [58] ed è frequentemente associato a condizioni patologiche.

L'IL-1 RA, un antagonista naturale dell'attività della IL-1, sembra giocare un ruolo di primo piano nel controllare le attività pro-infiammatorie in vivo della IL-1 β . Un polimorfismo caratterizzato da un numero variabile di ripetizioni a tandem di 86bp (VNTR) descritto al livello dell'introne 2 del gene codificante per l'antagonista recettoriale dell'IL-1 (IL-1RA) è stato analizzato come fattore predisponente all'aterosclerosi e ad altre patologie correlate all'invecchiamento [59].

Le basi genetiche delle malattie multifattoriali come l'ictus ischemico probabilmente comprendono diversi fattori di rischio predisponenti che interagendo con fattori di tipo ambientale possono determinare il fenotipo della malattia.

Tuttavia però nella patogenesi dell'ictus sono stati chiamati in causa non soltanto i processi infiammatori ma anche elementi dei "pathway" coagulativo e della fibrinolisi; proprio in tal senso la relazione esistente tra una infezione sistemica o un processo flogistico sistemico e un aumentato rischio di patologie trombotiche ha recentemente sollevato un rinnovato interesse.

Un alterato funzionamento del sistema fibrinolitico secondario ad elevati livelli dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno di tipo-1 (PAI-1) è stato implicato nell'ictus ischemico.

Polimorfismi a carico del gene codificante per l'attivatore del plasminogeno di tipo-1 (PAI-1), come il polimorfismo dell'allele 4G del promoter del PAI-1 4G/5G, associato con livelli più alti di PAI-1, e livelli di attivatore tissutale del plasminogeno (tPA), sono stati implicati nella patogenesi dell'ictus [60-61].

In realtà, elevati livelli dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno di tipo-1 (PAI-1) sono stati considerati come un fattore di rischio per malattia cardiovascolare, ma il suo effettivo ruolo rimane ancora controverso.

Il nostro studio è stato indirizzato alla contemporanea valutazione del ruolo dei polimorfismi genetici coinvolti in alcuni "pathways" pro-infiammatori, anti-infiammatori e trombotico/fibrinolitici in pazienti con ictus ischemico acuto allo scopo di delineare un ipotetico profilo genetico di rischio utile ai fini preventivi e nell'attuazione di eventuali strategie terapeutiche.

Materiali e metodi

Selezione dei pazienti

Sono stati arruolati tutti i pazienti consecutivi con una diagnosi di ictus ischemico acuto afferiti al Dipartimento di Medicina Interna dell'Università degli studi di Palermo in un periodo compreso tra Novembre 2006 e Gennaio 2008.

I controlli erano pazienti ricoverati, nello stesso periodo, nel nostro Dipartimento di Medicina Interna per cause diverse da eventi acuti cardiovascolari e cerebrovascolari.

L'ictus è stato definito come un quadro clinico caratterizzato dalla presenza di segni o sintomi neurologici focali ritenuti di origine vascolare che persistevano per >24 ore confermati da TC cerebrale e/o RM in basale e TC cerebrale eseguita con mezzo di contrasto dopo 48-72 ore [62].

Allo scopo di confrontare i pazienti con ictus ischemico acuto ed i soggetti di controllo anche in relazione al rischio cardiovascolare e alla pregressa morbilità cardiovascolare, i controlli arruolati sono stati inclusi se portatori di fattori di rischio vascolare o di una anamnesi positiva per infarto miocardico, malattia cerebrovascolare o vasculopatia periferica, ma esclusi se affetti da malattia cerebrovascolare in atto o recente (fino a sei mesi) o da uno dei criteri di esclusione (vedi sopra).

I fattori di rischio cardiovascolari sono stati analizzati sia per i casi che per i controlli sulla base dei criteri di seguito esposti.

L'ipercolesterolemia è stata definita come la presenza di livelli di colesterolo sierico totale ≥ 200 mg/dL.

L'ipertensione arteriosa è stata considerata presente se precedentemente diagnosticata ai soggetti in accordo con le linee guida della ESH/ESC 2003 [63] e se questi erano abitualmente trattati con terapia antipertensiva.

I pazienti sono stati definiti come diabetici di tipo 2 se con diabete noto trattato con la dieta, farmaci ipoglicemizzanti orali o insulina prima dell'ictus.

La presenza di una pregressa coronaropatia è stata determinata sulla base di una anamnesi positiva per angina diagnosticata clinicamente, infarto del miocardio, o qualche pregressa procedura di rivascolarizzazione rilevata tramite questionario.

L'anamnestica presenza di malattia cerebrovascolare (TIA/ictus ischemico) è stata valutata tramite l'analisi della storia clinica, da esami neurologici specifici eseguiti da uno specialista e da documentazione ospedaliera o radiologica (TC o RM cerebrale) relativa a pregressi eventi ischemici cerebrali.

I soggetti sono stati classificati come affetti da pregressa arteriopatia periferica (PAD) quando presenti a livello anamnestico un $ABI < 0.9$ e/o una claudicatio intermittens o una ischemia critica degli arti inferiori o un intervento di bypass arterioso periferico o un intervento di amputazione. Il protocollo dello studio è stato approvato dalla commissione etica locale, e tutti i partecipanti hanno fornito il loro consenso informato. Il tipo di ictus ischemico acuto è stato classificato secondo la classificazione TOAST [64]:

1. Large Artery Atherosclerosis (LAAS);
2. CardioEmbolic Infarct (CEI);
3. LACunar Infarct (LAC);
4. Stroke of Other Determined Etiology (ODE);
5. Stroke of Undetermined Etiology (UDE).

Large Artery Atherosclerosis (LAAS): questi pazienti avranno riscontri clinici e strumentali (ecocolorDoppler TSA e/o Angiografia e/o AngioTC cerebrale) o di una stenosi significativa (>50%) o di una occlusione di una arteria cerebrale principale o di un ramo arterioso corticale, presumibilmente secondari ad aterosclerosi.

I segni clinici includono quelli del deterioramento cerebrale corticale (afasia, neglect, coinvolgimento motorio limitato, etc) o della disfunzione tronco encefalica o cerebellare.

Le aree infartuali corticali o cerebellari e gli infarti del tronco encefalo o emisferici sottocorticali > 1,5 cm di diametro alla TC o RM sono potenzialmente ritenuti di origine aterosclerotica.

Quale prova a supporto è necessario il riscontro di una stenosi >50% di una appropriata arteria intracranica o extracranica tramite ecocolorDoppler o arteriografia.

Studi diagnostici dovrebbero escludere potenziali fonti di cardioembolismo.

Cardioembolic Infarcts (CEI): questa categoria include quei pazienti con ictus ischemico la cui origine è da ricondursi ad occlusione arteriosa dovuta presumibilmente ad un embolo a partenza cardiogena.

Sulla base dell'evidenza del diverso potenziale emboligeno, le cardiopatie emboligene sono suddivise in gruppi ad alto rischio e in gruppi a medio rischio.

Per potere effettuare una diagnosi presuntiva di ictus cardioembolico deve essere identificata almeno una cardiopatia emboligena.

I riscontri clinici e neuroradiologici sono simili a quelli già descritti per il sottotipo TOAST LAAS.

L'evidenza di un pregresso TIA o di pregresso ictus in più di un distretto vascolare o di una embolia sistemica è a supporto di una diagnosi clinica di ictus cardiogeno.

Potenziati sorgenti aterosclerotiche di trombosi o embolia a livello dei grossi vasi dovrebbero essere escluse.

Un ictus in un paziente con una cardiopatia emboligena a medio rischio e nessun'altra causa di ictus è classificato come un possibile ictus cardioembolico.

LACunar Infarct (LAC): il paziente dovrebbe avere una delle tipiche sindromi cliniche lacunari e non dovrebbe avere evidenza di disfunzione cerebrale corticale.

Una storia di diabete mellito o di ipertensione è a supporto della diagnosi clinica [65, 66, 67]. Il paziente dovrebbe inoltre avere un normale esame TC/RM o una lesione emisferica sottocorticale o di pertinenza troncoencefalica con un diametro < 1,5 cm.

Stroke of Other Determined Etiology (ODE): questa categoria include pazienti con ictus da cause meno frequenti, così come vasculopatie su base non aterosclerotica, o disordini ematologici.

I pazienti in questo gruppo dovrebbero avere riscontri clinici o TC o RM di un ictus ischemico acuto a prescindere dalla dimensione o dalla sede.

Test diagnostici così come esami ematochimici o l'arteriografia dovrebbero rivelare una di queste cause meno comuni di ictus.

Sorgenti cardioemboliche o aterosclerosi dei grossi vasi dovrebbero essere escluse da altri studi.

Stroke of Undetermined Etiology (UDE): in molti casi, la causa di un ictus non può essere determinata con assoluta certezza.

Alcuni pazienti non avranno una eziologia definita nonostante una analisi approfondita.

In altri, non viene trovata la causa ma l'analisi è stata più superficiale.

Tutti i pazienti con ictus ischemico sono stati sottoposti a: raccolta anamnestica con registrazione dei potenziali fattori di rischio per ictus, esami del sangue e coagulazione, ECG a dodici derivazioni, monitoraggio elettrocardiografico delle 24 ore, ecocardio transtoracico, ecografia delle carotidi, TC o RM cerebrale al momento del ricovero (ripetuta tra il terzo e il settimo giorno dall'insorgenza dell'ictus).

Il punteggio del deficit neurologico al momento del ricovero è stato valutato tramite la Scandinavian Stroke Scale (SSS).

La SSS stabilisce l'entità del deficit neurologico attraverso una valutazione del livello di coscienza, del movimento oculare, della forza di braccia, mani e gambe, orientamento, linguaggio, paresi del facciale, andatura, dando luogo ad una scala di punteggi che va da 58 (assenza di deficit) a 0 (morte).

Metodi di laboratorio

Analisi molecolare degli alleli del gene del TNF- α al nucleotide-308 (308G/A).

Il DNA genomico è stato estratto da campioni di sangue non coagulato in EDTA usando il metodo del “salting out”. Il polimorfismo -308G/A (rs1800629) del TNF- α è stato identificato adottando una modifica della PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism assay) come precedentemente descritto [68]. Brevemente, 0.5 M di primers indirizzati e inversi (5'AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT 3' e 5'GGC GGG GAT TTG GAA AGT T 3') sono stati mescolati a 5 - 10 ng di DNA stampo, con una concentrazione finale di 0.2 U di Taq DNA polimerasi (Perkin Elmer BioSystem, Roma, Italia), 200 M di ogni deossinucleotide e 1X tampone di reazione. La PCR è stata realizzata per 35 cicli a 94°, 58° e 72° per 35 secondi, rispettivamente. La digestione con enzima di restrizione NcoI (M-Medical, Milano, Italia) del prodotto amplificato dalla PCR (159 bp) e la successiva elettroforesi in gel di agarosio al 2%-5% ha consentito la distinzione dei due alleli; -308A ha mostrato due frammenti di 146 bp e di 13 bp, mentre -308G non è stato digerito ed è risultato quindi in una singola banda di 159 bp. Individui eterozigoti sono stati identificati dalla presenza di tutti e tre i frammenti.

Analisi molecolare degli aplotipi degli alleli del gene della IL-10 al nucleotide - 1082 .

Tre diversi polimorfismi biallelici del gene della IL-10, rs1800896 (-1087G/A), rs1800871 (-824C/T) e rs1800872 (-597C/A), sono stati identificati utilizzando

uno specifico metodo di tipizzazione degli aplotipi -1082/-819/-592, come precedentemente descritto [68]. Brevemente, 12 coppie di sequenze primer 3' e 5' allele specifiche sono state mixate separatamente in un volume totale di 13 μ l contenente 5-10 ng di DNA stampo, 2.00 mM di MgCl₂, 9.8 mM di solfato di ammonio, 39.6 mM TRIS-HCl, 200 μ M di deossiribonucleotidi trifosfati (dNTPs), e 0.2 U di Taq-DNA polimerasi (Perkin Elmer BioSystem, Roma, Italia). Il ciclo è stato effettuato a 96°C per 1 minuto seguito da 5 cicli a 96°C per 25 secondi, 70°C per 45 secondi, e 72° C per 45 secondi, 20 cicli a 96°C per 25 secondi, 65°C per 50 secondi, e 72°C per 45 secondi, e infine 5 cicli a 96°C per 25 secondi, 55°C per 60 secondi, e 72°C per 120 secondi. I prodotti della PCR, potenzialmente contenenti le due possibili combinazioni alleliche -592/-819/ o -592/-1082, o -819/-1082 sono stati identificati tramite elettroforesi in gel d'agarosio al 2%.

Analisi molecolare del polimorfismo VNR dell'esone 2 dell'IL-1RN.

Il polimorfismo dell'esone 2 dell'IL-1RN, caratterizzato da un numero variabile di ripetizioni di 86bp, è stato analizzato come precedentemente riportato [69].

Le condizioni rispettate sono state le seguenti: 95°C per 5 minuti, poi 35 cicli a 95°C per 30 secondi, 50°C per 30 secondi, 72°C per 30 secondi, e infine, 72°C per 5 minuti. I frammenti prodotti dalla PCR sono stati analizzati tramite elettroforesi in gel di agarosio al 2% e successiva colorazione con etidio bromuro. L'allele 1 (4 ripetizioni) era di 410 bp, l'allele 2 (2 ripetizioni) era di 240 bp, l'allele 3 (5 ripetizioni) era di 500 bp, l'allele 4 (3 ripetizioni) era di 325 bp, e l'allele 5 (6 ripetizioni) era di 595 bp in lunghezza.

Analisi molecolare degli alleli del gene della IL-6 al nucleotide -174 (-174G/C).

L'amplificazione del locus -174C/G è stata effettuata come precedentemente descritto [70]. Brevemente, l'amplificazione con PCR è stata seguita da una seduta di digestione della durata di una notte di 15 ul di frammenti prodotti dalla PCR con enzima Nla III (M-Medical, Milano, Italia). La presenza di una citosina (allele C) al nucleotide -174 è stata rivelata dalla presenza del sito di taglio di Nla III. I due alleli sono stati identificati tramite elettroforesi in gel di agarosio al 2% e colorati con etidio bromuro.

Analisi molecolare del polimorfismo del promoter PAI-1 4G/5G.

Il DNA è stato amplificato dalla reazione a catena della polimerasi (PCR) utilizzando 17-oligonucleotidi allele specifici; per l'allele 5G (5'GTC TGG ACA CGT GGG GG3') e per l'allele 4G (5'GTC TGG ACA CGT GGG GA3'), in reazioni separate con un primer comune a valle 5'TGC AGC CAG CCA CGT GAT TGT CTA3', e un quarto primer (5'AAG CTT TTA CCA TGG TAA CCC CTG GT3'), collocato a monte della regione polimorfica, è stato usato come controllo interno per la verifica della avvenuta amplificazione del DNA come descritto da Naran et al. [71].

Analisi molecolare degli alleli del gene del tPA al nucleotide -7351 (-7351C/T).

Il polimorfismo tPA -7351C/T è stato amplificato usando la PCR. La digestione con endonucleasi di restrizione Ban II ha prodotto 1 dei 2 caratteristici set di frammenti, a seconda della presenza di un allele C o di un allele T al SNP. I frammenti di restrizione sono stati separati su gel di agarosio al 2% [72].

Analisi Statistica

Tutti i dati continui sono stati espressi come media \pm deviazione standard. L'analisi di frequenza è stata effettuata con il test chi quadro di Pearson e il test esatto di Fisher, come opportuno.

L'analisi di varianza unifattoriale (ANOVA) e il test statistico di Mann-Whitney-Wilcoxon sono stati utilizzati per una analisi parametrica e non parametrica, rispettivamente, per valutare le differenze tra le variabili prese in considerazione.

Gli Odds Ratio (ORs) e gli Intervalli di Confidenza al 95% (CIs) sono stati calcolati utilizzando un modello di regressione logistica multinominale.

Per ogni "SNP", i test della deviazione dai risultati attesi secondo l'analisi di Hardy-Weinberg sono stati realizzati utilizzando le metodiche descritte da Rodriguez et al [73].

I dati sono stati analizzati utilizzando il software Epi Info (versione 6.0, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA) e il SPSS Software (versione 14.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Sono stati stabiliti i limiti superiore e inferiore dei valori della p, e valori della p minori di 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi.

Risultati

Abbiamo analizzato 96 soggetti con ictus ischemico acuto e 48 soggetti di controllo. Caratteristiche rilevanti dei casi e dei controlli sono descritte nella Tabella 2.

Per ogni polimorfismo, le frequenze alleliche e genotipiche sono state determinate mediante “gene counting” e sono fornite nella Tabella 3.

La distribuzione genotipica era in equilibrio di Hardy-Weinberg per i genotipi TNF- α 308GA, PAI-1 675 5G/4G, IL-6 174 G/C e non era in equilibrio per i genotipi IL-10 APL082AG e 819CT, IL-1 VNTR 86bp, TPA7351 C/T .

Per quanto riguarda il polimorfismo del promoter del TNF- α alla posizione -308, il genotipo GG era presente nell'86.4% dei pazienti con ictus ischemico vs 72.9% nei soggetti di controllo ($p= 0.047$), il genotipo GA nel 12.5% dei pazienti con ictus ischemico vs 22.9% nei soggetti di controllo ($p= 0.171$) e AA nell' 1.1 % dei pazienti con ictus ischemico vs 4.2 % nei soggetti di controllo ($p= 0.257$) (vedi tabella 2). L'analisi di regressione ha mostrato un “risk trend” per GG anch'esso non significativo (HR=2.17, 95% CI 0.87-5.39, $p=0.094$) (vedi Tabella 3).

Il genotipo della IL-10 1082 GG era presente nel 25% dei soggetti con ictus vs 22.9% nei soggetti di controllo ($p=0.945$) con “Odds Ratio” (HR) anche non significativo (HR=2.64; 95% CI 0.97-7.23, $p=0.057$), il genotipo GA nel 14.6 % dei soggetti con ictus vs 35.4 % nei soggetti di controllo ($p = 0.007$), il genotipo AA nel 60.4% dei soggetti con ictus vs 41.7% nei soggetti di controllo ($p=0.033$), con un “hazard ratio” significativo alla analisi di regressione (OR=3.52; 95% CI 1.47-8.41, $p=0.005$), mentre in riferimento al polimorfismo della IL-10 alla

posizione - 819, il genotipo CC era presente nel 65.6% dei soggetti con ictus vs 54.2% nei soggetti di controllo ($p=0.813$) con un “hazard ratio” significativo ($HR=2.94$; 95% CI 1.26-6.83, $p=0.012$), il genotipo CT nel 14.6% dei soggetti con ictus vs 35.4% nei soggetti di controllo ($p=0.004$) e il genotipo TT nel 19.8% dei soggetti con ictus e nel 10.4% dei soggetti di controllo ($p=0.156$) con un “Odds ratio” significativo ($HR=4.61$; 95% CI 1.37-15.51, $p=0.013$), (vedi Tabella 3).

Per quanto riguarda il polimorfismo del PAI 5G/4G alla posizione -1675, il genotipo 5G/5G era presente nel 70.8% dei pazienti con ictus ischemico e nel 100% dei soggetti di controllo ($p=0.0001$), 5G/4G era presente nel 28.1% dei soggetti con ictus e non era presente nei soggetti di controllo ($p=0.0001$); il 4G/4G era presente nell'1.1% dei soggetti con ictus e non era presente nei controlli ($p=1.0$). L'analisi di regressione non mostra alcun “hazard ratio” significativo (vedi Tabella 3).

Il genotipo del tPA 7351 CT era presente nel 65.6% dei soggetti con ictus vs il 43.7% nei soggetti di controllo ($p=0.019$) ($HR=3.70$; 95% CI 1.65-8.31, $p=0.001$), il genotipo CC era presente nel 17.7% dei pazienti con ictus vs il 43.7% nei soggetti di controllo ($p=0.0016$) mentre il genotipo TT era presente nel 16.7% dei pazienti con ictus vs il 12.6% nei soggetti di controllo ($p=0.682$) con un “Odds ratio” significativo alla analisi di regressione ($OR=3.29$; 95% CI 1.05-10.25, $p=0.040$) (vedi Tabella 3).

La frequenza del polimorfismo dei genotipi della IL-6 alla posizione -174CG era: GC era presente nel 47.9% dei pazienti con ictus ischemico acuto e nel 68.7% dei soggetti di controllo ($p=0.028$); CC nel 10.4% dei pazienti con ictus ischemico

acuto vs 2.1% nei soggetti di controllo ($p=0.100$), GG nel 29.2% dei soggetti di controllo vs 41.7% nei pazienti con ictus ischemico ($p=0.201$) (vedi Tabella 4). L'analisi di regressione non mostra alcun "hazard ratio" significativo.

La frequenza degli alleli dell'IL-1 VNTR 86bp era: il genotipo 1/1 era presente nel 47.9% dei pazienti con ictus vs 47.9% dei soggetti di controllo ($p= 0.859$), il genotipo 1/2 nel 29.2% dei pazienti con ictus vs 43.7% dei soggetti di controllo ($p=0.120$), il genotipo 1/3 nel 2.1% dei pazienti con ictus vs 4.2% dei soggetti di controllo ($p=0.600$), il genotipo 2/2 nel 20.8% dei pazienti con ictus vs 4.2% dei soggetti di controllo ($p=0.017$) con un "Odds ratio" significativo (OR=7.50; 95% CI 1.57-35.68, $p=0.011$) (vedi Tabella 4).

Secondo la classificazione TOAST i soggetti con ictus ischemico acuto sono stati classificati come segue: 37 LAAS, 34 lacunari e 25 cardioembolici (CEI).

Per ogni polimorfismo, le frequenze di allele e genotipo secondo ciascun sottotipo TOAST sono date in Tabella 4.

In riferimento al polimorfismo del promoter del TNF- α alla posizione -308 il genotipo GG era presente nell'81.1% dei soggetti classificati come LAAS vs 97.1% dei lacunari vs 80.0% dei cardioembolici ($p =0.079$), il genotipo GA nel 18.9% dei LAAS vs 2.9% dei lacunari vs 16.0% dei cardioembolici ($p = 0.104$) mentre il genotipo AA non era presente nei LAAS e nei lacunari e presente nel 4.0% dei CEI ($p =0.238$) (vedi Tabella 4).

In riferimento al polimorfismo del gene della IL-10 alla posizione 1082 il genotipo GG era presente nel 27.0 % dei pazienti LAAS vs 26.5% dei pazienti lacunari e vs 20% dei pazienti cardioembolici, ($p= 0.797$) il genotipo GA nel 10.8% dei pazienti LAAS vs 11.8% dei pazienti lacunari vs 24.0% dei pazienti

cardioembolici ($p = 0.298$), il genotipo AA nel 62.2% dei pazienti LAAS vs 61.8% dei pazienti lacunari e vs 56.0% dei pazienti cardioembolici ($p = 0.870$), mentre per quanto riguarda il polimorfismo della IL-10 819 CT, il genotipo CC era presente nel 62.2% dei pazienti LAAS vs 64.7% dei pazienti lacunari e vs 72.0% dei pazienti cardioembolici ($p = 0.718$), il genotipo CT era presente nel 13.5% dei pazienti LAAS vs 11.8% dei pazienti lacunari vs 20.0% dei pazienti cardioembolici ($p = 0.657$) e il genotipo TT era presente nel 24.3% dei pazienti LAAS vs 23.5% nei pazienti lacunari e vs 8.0% nei pazienti cardioembolici ($p = 0.226$).

In riferimento al polimorfismo del PAI-1675 5G/4G, 5G/5G era presente nel 72.9% dei pazienti LAAS vs 76.5% dei pazienti lacunari vs 60% dei pazienti cardioembolici ($p = 0.363$), il genotipo 5G/4G era presente nel 27.0% dei pazienti classificati come LAAS vs 23.5% nei pazienti lacunari vs 36.0% nei pazienti cardioembolici ($p = 0.564$), il genotipo 4G/4G era presente solo nel 4% dei pazienti cardioembolici ($p = 0.238$).

In riferimento ai genotipi del tPA, il genotipo CC era presente nel 5.5% dei pazienti LAAS vs 29.4% dei pazienti lacunari e vs 20.0% dei pazienti cardioembolici ($p = 0.028$) con un "hazard ratio" significativo nel sottotipo lacunare ($HR = 8.00$; 95% CI 1.21-52.6, $p = 0.031$), il genotipo CT era presente nel 72.9% dei pazienti LAAS vs 55.9% dei pazienti lacunari e vs 68.0% dei pazienti cardioembolici ($p = 0.304$), il genotipo TT era presente nel 21.6% dei pazienti LAAS vs 14.7% dei pazienti lacunari vs 12.0% dei pazienti cardioembolici ($p = 0.565$).

In riferimento al polimorfismo della IL-6 alla posizione -174, il genotipo CC era presente nell'8.1% dei pazienti LAAS vs 11.8% dei pazienti lacunari e vs 12.0% dei pazienti cardioembolici ($p = 0.841$), il genotipo CG era presente nel 43.2% dei pazienti LAAS vs 47.0% dei pazienti lacunari vs 56.0% dei pazienti cardioembolici ($p = 0.610$), il genotipo GG era presente nel 48.6% dei pazienti LAAS vs 41.2% dei pazienti lacunari vs 32% dei pazienti cardioembolici ($p = 0.426$).

Per quanto riguarda i genotipi della IL -1 VNTR 86bp, il genotipo 1/1 era presente nel 37.8% dei pazienti LAAS vs 64.7% dei pazienti lacunari e vs 40.0% dei pazienti cardioembolici ($p = 0.05$); l'analisi di regressione ha mostrato nel sottotipo lacunare un "Odds Ratio" significativo di questo genotipo (OR=3.92; 95% CI 1.2-12.5, $p=0.021$).

Il genotipo 1/2 era presente nel 40.5% dei pazienti LAAS vs 17.6% dei pazienti lacunari e vs 28.0% dei pazienti cardioembolici ($p=0.104$), il genotipo 1/3 era presente solo nell'8% dei pazienti cardioembolici ($p=0.054$) mentre il genotipo 2/2 era presente nel 21.6% dei pazienti LAAS vs 17.6% dei pazienti lacunari e vs 24.0% dei pazienti cardioembolici ($p = 0.828$).

Discussione

Il nostro studio mostra una significativa associazione tra, rispettivamente, il genotipo -1082 AA e - 819 CC e TT del gene per la IL-10 e il genotipo -7351 CT e TT del gene per il tPA e l'ictus ischemico.

L'aterosclerosi, che è una delle cause principali di cardiopatia ischemica e malattia cerebrovascolare, è adesso ampiamente riconosciuta come una malattia infiammatoria cronica caratterizzata dall'accumulo di lipidi a livello della parete arteriosa [74-78]. In uno stadio precoce della malattia, le cellule immunocompetenti, così come le cellule di derivazione monocito-macrofagica e i linfociti-T, infiltrano la tonaca intima della parete arteriosa, e le risposte immunitarie evocate in sede di lesione potrebbero giocare un ruolo cruciale nella progressione della aterosclerosi. L'espressione di citochine pro-infiammatorie è osservata preminentemente nelle lesioni aterosclerotiche, mentre l'espressione di citochine anti-infiammatorie in queste lesioni è rara [79]. Dunque, è probabile che sia i mediatori pro-infiammatori che quelli anti-infiammatori prodotti dalle cellule attivate del sistema immunocompetente, dall'endotelio e dalle cellule muscolari lisce vasali in sede lesionale siano importanti ai fini dello sviluppo del processo aterosclerotico [80].

La genetica della malattia cerebrovascolare è comunque complessa. L'ictus e le malattie cerebrovascolari in genere sono patologie molto eterogenee ed una eterogeneità anche maggiore è verosimilmente attribuibile a ciascuna delle categorie cliniche di ischemia cerebrale.

Gli studi di screening genetico del tipo “ genome-wide” [81, 82, 83] condotti in questi ultimi anni hanno avuto l’obiettivo di identificare variazioni genetiche così come “single nucleotide polymorphism (SNPs)” o gruppi di tali variazioni (aplotipi) associati con uno o più tipi di ictus, tuttavia non è ancora chiaro se qualcuno di questi aplotipi possa in effetti determinare qualche alterazione significativa nel gene/proteina o come tali cambiamenti possano incidere sul rischio di ictus. Si dice, pertanto che gli studi “ genome-wide” manchino di plausibilità biologica.

Proprio per tale motivo nel nostro studio, inerente un campione ristretto e quindi non suscettibile ad un approccio “genome-wide” (in genere preferibilmente riservato a studi di popolazione), abbiamo scelto, nell’ottica di un approccio su base biologica e fisiopatologica, di analizzare i polimorfismi dei geni candidati implicati nei “pathways” infiammatori e trombotico/fibrinolitici nei nostri pazienti con ictus ischemico e nei soggetti di controllo.

Nel nostro studio abbiamo rilevato una frequenza significativamente maggiore dei genotipi della IL-10 -1082 AA e - 819 CC nei pazienti con ictus rispetto ai soggetti di controllo con un significativo “hazard ratio” alla analisi di regressione.

I livelli della produzione di IL-10 sono sotto stretto controllo genetico. Un esteso studio sui gemelli ha constatato che approssimativamente 2/3 della varianza nei livelli di produzione della IL-10 è geneticamente determinata [84].

Tre comuni polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) nel promoter del gene della IL-10 (-1082 G/A, -819 C/T, -592 C/A) mostrano un evidente “linkage disequilibrium” e creano due comuni aplotipi, designati come aplotipi [ATA] e [GCC]. Pertanto, a causa del “linkage disequilibrium” la presenza di questi

aplotipi può essere pienamente determinata dall'analisi del polimorfismo -592 C/A, nel quale la frequenza dell'allele A indica la presenza dell'aplotipo [ATA] [85,86]. L'aplotipo [ATA] è stato associato ad una ridotta sintesi di IL-10 in vitro e in vivo [87,88] ed è frequentemente associato a condizioni patologiche [89,90]. Trompet et al hanno dimostrato che il genotipo della IL-10 -2849AA è associato ad un aumentato rischio di incidenza di ictus.

Gli infarti cerebrali causati dall'occlusione dell'arteria cerebrale media erano del 30% più estesi nei topi knockout per l'IL-10 rispetto a quelli nei topi wild-type [91]. Inoltre, la somministrazione esogena della IL-10 ha un effetto neuroprotettivo nei modelli di ischemia cerebrale focale nei ratti [92].

La concordanza dei dati in vivo e in vitro consente di ipotizzare un potenziale ruolo neuroprotettivo della IL-10 dall'ischemia cerebrale.

Inoltre, Van Exel et al hanno dimostrato che pazienti anziani con ridotta (bassa) capacità di produzione della IL-10 hanno un rischio aumentato di accidenti cerebrovascolari [93]. Sulla base di ciò è suggestivo ritenere che gli aplotipi della IL-10 associati con una bassa produzione della IL-10 possano essere correlati ad un rischio cerebrovascolare maggiore.

Abbiamo inoltre riscontrato una frequenza più alta del genotipo 2/2 della IL-1 VNTR 86bp nei pazienti con ictus rispetto ai soggetti di controllo con un significativo "hazard ratio" alla analisi di regressione.

Vi sono alcuni polimorfismi comuni che sembrano essere associati con delle differenze nell'attività del sistema della IL-1. Il gene IL-1RN contiene una regione polimorfica a livello del secondo introne, che ha un numero variabile di ripetizioni in tandem di 86-bp (VNTR). La presenza di due ripetizioni, IL-1RN*2,

in questo polimorfismo è stata riscontrata come associata con i livelli sierici di IL-1RN, produzione della IL-1 β in vitro, e prevalenza di malattie infiammatorie in vivo [94-97], ma nessuno studio ha valutato la possibile associazione tra genotipi polimorfici di IL-1 VNTR 86bp e l'ictus ischemico e i nostri dati appaiono in tal senso originali.

Tuttavia la maggior parte degli ictus ischemici si verifica a causa di occlusioni trombotiche o tromboemboliche; sarebbe pertanto semplicistico non valutare il possibile ruolo che i polimorfismi rivestono, anche quelli riguardanti i geni candidati coinvolti nei processi coagulativi e in particolare quelli implicati nell'equilibrio tra fibrinolisi e trombosi come il sistema tPA/PAI1.

Il principale inibitore del tPA a livello plasmatico è l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno di tipo 1 (PAI-1), e studi sperimentali dimostrano come il PAI-1 ritardi la lisi del coagulo [98]. Tra le varianti genetiche al locus del PAI-1, il -1675 -4G-5G SNP nel promoter si è dimostrato funzionale con una maggiore attività trascrizionale per l'allele 4G [99]. Il genotipo 4G4G è stato associato ad un aumentato rischio di infarto miocardico [99]. La possibile correlazione con l'ictus ha ricevuto minore attenzione, e gli studi pubblicati non rivelano una chiara associazione [100-103].

Inoltre, è stato identificato un polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) all'interno dell'enhancer del tPA (-7351C-T) [104]. L'allele mutante T conferisce una ridotta attività trascrizionale in vitro, e in vivo questo allele è associato con ridotti livelli di rilascio del tPA così come ad un aumentato rischio di infarto del miocardio (MI) [105]. Uno studio recente ha inoltre riportato un aumentato rischio di ictus ischemico per il genotipo TT [106].

Nei nostri pazienti con ictus in riferimento al polimorfismo del PAI 5G/4G alla posizione -1675, abbiamo mostrato una frequenza più alta dei genotipi 5G/5G e 5G/4G, senza alcun significativo incremento del rischio per entrambi i genotipi, mentre per quanto riguarda il polimorfismo del TPA 7351 CT, abbiamo riportato una frequenza più alta del genotipo CT nei pazienti con ictus rispetto ai soggetti di controllo con un significativo incremento del rischio ($p=0.019$) ($HR=3.70$), una frequenza più bassa del genotipo CC nei pazienti con ictus in confronto ai soggetti di controllo (vedi Tabella 3) e non abbiamo confermato i precedenti dati riguardanti l'associazione tra il genotipo TT e l'ictus ischemico.

L'eziologia dell'ictus ischemico influenza la prognosi, gli esiti, e il trattamento. Abbiamo recentemente comparato i livelli plasmatici delle variabili immunoinfiammatorie in pazienti con ictus ischemico acuto in relazione al sottotipo TOAST dimostrando come l'ictus cardioembolico abbia i livelli più alti di variabili immunoinfiammatorie nella fase acuta in confronto ad altri sottotipi TOAST mentre gli ictus lacunari abbiano i più bassi livelli plasmatici [107, 108]. Le varianti genetiche potrebbero agire a vari livelli (eg, aumentando il rischio di e la suscettibilità ai fattori di rischio "convenzionali" per l'ictus così come l'ipertensione arteriosa o il diabete) influenzando specifici meccanismi alla base dell'ictus, così come la prevalenza e la progressione dell'aterosclerosi o lipoalinosi, predisponendo alla trombosi arteriosa, o modificando la tolleranza all'ischemia cerebrale.

Per analizzare la relazione intercorrente tra i genotipi infiammatori e trombotico-fibrinolitici in relazione al sottotipo diagnostico di ischemia cerebrale è dunque una prospettiva interessante caratterizzare meglio la relazione tra i geni candidati

dal punto di vista della patogenesi e della ischemia cerebrale. Soltanto pochi studi hanno esaminato questa relazione [109] così i nostri risultati in merito alla distribuzione dei genotipi anti-infiammatori e trombotico-fibrinolitici in relazione al sottotipo diagnostico di ischemia cerebrale potrebbero risultare originali.

Abbiamo riscontrato una relazione significativa con i sottotipi TOAST soltanto in riferimento al genotipo CC del tPA e il genotipo 1/1 IL -1 VNTR 86bp e il sottotipo lacunare TOAST con un significativo incremento del rischio per entrambi.

Sebbene sia stato riscontrato che i differenti sottotipi TOAST di ictus sono caratterizzati da gradi diversi di attivazione immuno-infiammatoria in fase acuta noi non abbiamo evidenziato una differente distribuzione dei genotipi infiammatori o anti-infiammatori ad eccezione della relazione del polimorfismo IL-1 VNTR 86bp e del polimorfismo tPA 7351 CC e gli ictus lacunari.

Le lacune sono causate dall'occlusione di una singola arteria perforante. Le arterie perforanti profonde sono piccole arterie, di tipo termino-terminale (generalmente di diametro inferiore a 500 µm), che originano direttamente da arterie molto più grandi (eg, l'arteria cerebrale media, l'arteria coroidea anteriore, l'arteria cerebrale anteriore, l'arteria cerebrale posteriore, l'arteria comunicante posteriore, le arterie cerebellari, l'arteria basilare). Le loro ridotte dimensioni nonché la loro posizione prossimale le predispongono allo sviluppo di microateromi e lipoalinosi. Probabilmente la flogosi parietale di queste arterie e la compromissione dell'equilibrio trombotico/fibrinolitico potrebbe spiegare la significativa associazione tra tali genotipi e la tipologia lacunare di ictus ischemico, sebbene studi successivi potrebbero ulteriormente chiarire la base

patogenetica della predisposizione genetica agli ictus lacunari e ad altri sottotipi di ictus.

Tuttavia, un modello genetico della patogenesi dell'ictus dovrebbe essere multifattoriale, coinvolgendo diversi polimorfismi genetici ognuno dei quali determina piccoli incrementi del rischio, e su questa base abbiamo valutato diversi aspetti della possibile patogenesi dell'ictus, riguardanti sia l'infiammazione che la trombosi, analizzando il possibile contributo di molti genotipi infiammatori/anti-infiammatori e trombotico/fibrinolitici.

Un possibile limite del nostro studio è che non tutta la distribuzione dei genotipi era in equilibrio di Hardy-Weinberg (IL-10 APL082 AG and 819 CT, IL-1 VNTR 86bp, tPA7351 C/T) . A causa della natura prospettica delle nostre analisi, non reputiamo che l'assenza dell'equilibrio di Hardy-Weinberg per questi polimorfismi abbia determinato una grave distorsione dei nostri risultati come del resto confermato da un altro recente studio condotto in assenza dell'equilibrio di Hardy-Weinberg per il polimorfismo 4G/5G [110].

In conclusione, il nostro studio ha mostrato una significativa associazione tra alcuni genotipi infiammatori (genotipo IL-1 VNTR 86bp 2/2), e anti-infiammatori (genotipi IL-10 -1082 AA e - 819 CC e TT) e il genotipo tPA 7351 CT e TT e l'ictus ischemico. Inoltre il nostro studio ha mostrato una significativa relazione con il sottotipo TOAST solo per quanto riguarda il genotipo CC del tPA e 1/1 IL-1 VNTR 86bp e gli ictus lacunari.

D'altra parte, il riconoscimento e il trattamento di fattori di rischio stabiliti per patologie multifattoriali come l'ictus potrebbero ridurre considerevolmente l'impatto della malattia. Ad ogni modo, i "markers" fenotipici variano nel corso

del tempo e il loro potenziale predittivo è influenzato dall'età, dal sesso, dalla dieta, da eventuali comorbidità, dal trattamento farmacologico e da altre variabili ambientali. Inoltre, la rilevanza di queste variabili nell'ictus ischemico potrebbe anche essere differentemente influenzata dal "background" genetico individuale. Tenendo conto dei risultati del presente studio potrebbe essere clinicamente rilevante sviluppare un nuovo profilo di rischio nell'ambito di un algoritmo che comprenda i fattori di rischio genetici e la loro interazione clinica ed epidemiologica.

Infatti, le varianti genetiche ereditate sono meno influenzate da fattori ambientali e potrebbero fornire una migliore indicazione per identificare la suscettibilità individuale a queste patologie, e la transizione da una malattia ischemica preclinica ad una franca condizione patologica potrebbe essere influenzata da parecchi polimorfismi genetici in geni differenti coinvolti in vie apparentemente non correlate.

Tabella 2: Caratteristiche generali dei pazienti con ictus e dei controlli

| Variabile | Pz con ictus (n: 96) | controlli (n: 48) | P |
|---|----------------------|-------------------|---------|
| Età (anni) | 71.9±9.75 | 71.4±7.45 | 0.73 |
| M/F (n) | 45/51 | 16/32 | 0.121 |
| Diabete (n/%) | 52 (54.16) | 23 (47.91) | 0.515 |
| Ipertensione (n/%) | 64 (66.7) | 18 (37.5) | 0.001 |
| Fibrillazione Atriale (n%) | 31 (32.29) | 19 (39.58) | 0.360 |
| Glicemia (mg/dl) | 135.5±68.8 | 125.79±44.94 | 0.365 |
| Colesterolemia totale (mg/dl) | 186.27±41.33 | 143.2±26.39 | <0.0005 |
| Colesterolo LDL (mg/dl) | 100.04±35.14 | 91.63±38.25 | 0.191 |
| Trigliceridi ematici (mg/dl) | 138.93±61.97 | 161.4±103.3 | 0.166 |
| Globuli Bianchi (per mm³) | 13391.5±7497.6 | / | |
| Neutrofili (%) | 8481.3±9199.9 | / | |
| SSS¹ | 30.0±14.0 | / | |
| NIHSS² | 16.7±11.5 | / | |
| msRankin score alla dimissione | | | |
| I | 12 (12.5) | - | |
| II | 30 (31.25) | - | |
| III | 26 (27.08) | - | |
| IV | 14 (14.58) | - | |
| V | 14 (14.58) | - | |
| Decessi (n/%) | 12 (12.5%) | | |
| Coronaropatia (n/%) | 36 (37.5) | 16 (33.33) | 0.624 |
| Pregresso TIA (n/%) | 48 (50.0) | 25 (52.08) | 0.958 |
| Pregresso Ictus (n/%) | 43 (44.79) | 22 (45.83) | 0.906 |
| Microalbuminuria (n/%) | 46 (47.91) | 13 (27.08) | 0.018 |
| Placca Carotidea (n /%) | 71 (73.95) | 25 (52.08) | 0.009 |
| Ipertrofia VN Sx (n/%) | 45 (46.87) | 13 (27.08) | 0.022 |
| Pregresso infarto cerebrale documentato da neuroimaging (n /%) | 57 (59.37) | 15 (31.25) | 0.001 |
| WMHLS (n /%) | 45 (46.87) | 24 (50.0) | 0.723 |
| LAAS (n/%) | 37 (38.54) | - | - |
| Lacunare (n/%) | 34 (35.41) | - | - |
| Cardioembolico (n/%) | 25 (26.05) | - | - |

¹ SSS: Scandinavian Stroke Scale² NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale

**Tabella 3: Prevalenza del polimorfismo dei genotipi pro infiammatori /anti-
infiammatori e trombotico/ fibrinolitici in soggetti con ictus ischemico acuto**

| Confronto tra la frequenza del genotipo del TNF-α -308 G/A in pazienti con ictus ischemico e nei controlli | | | | |
|---|------------------------------------|--------------------------|----------------|------------------------------|
| | Pazienti con Ictus (n: 96) | Controlli (n: 48) | p-Value | OR (95% CI) |
| GG | 83 (86.4%) | 35 (72.9%) | 0.047 | 2.17 (0.87-5.39) p=0.094 |
| GA | 12 (12.5%) | 11 (22.9%) | 0.171 | |
| AA | 1 (1.1%) | 2 (4.2%) | 0.257 | |
| Confronto tra la frequenza dei genotipi 1082 AG e 819 CT della IL-10 in pazienti con ictus ischemico e nei controlli | | | | |
| GG | 24 (25.0%) | 11 (22.9%) | 0.945 | 2.64 (0.97-7.23) p=0.057 |
| GA | 14 (14.6%) | 17 (35.4%) | 0.007 | |
| AA | 58 (60.4%) | 20 (41.7%) | 0.033 | 3.52 (1.47-8.41) p=0.005 |
| Confronto tra la frequenza dei genotipi di 819 CT in pazienti con ictus ischemico e nei controlli | | | | |
| CC | 63 (65.6%) | 26 (54.2%) | 0.813 | 2.94 (1.26-6.83) p=0.012 |
| CT | 14 (14.6%) | 17 (35.4%) | 0.004 | |
| TT | 19 (19.8%) | 5 (10.4%) | 0.156 | 4.61 (1.37-15.51) p=0.013 |
| Confronto tra la frequenza del genotipo del PAI-1675 5G/4G in pazienti con ictus ischemico e nei controlli | | | | |
| 5G/5G | 68 (70.8%) | 48 (100%) | 0.0001 | |
| 5G/4G | 27 (28.1%) | 0 (0%) | 0.0001 | |
| 4G/4G | 1 (1.1%) | 0 (0%) | 1.0 | |
| Confronto tra la frequenza dei genotipi del TPA 7351 C/T in pazienti con ictus ischemico e nei controlli | | | | |
| CT | 63 (65.6%) | 21(43.7%) | 0.019 | 3.70 (1.65-8.31) p=0.001 |
| CC | 17 (17.7%) | 21 (43.7%) | 0.0016 | |
| TT | 16 (16.7%) | 6 (12.6%) | 0.682 | 3.29 (1.05-10.25) p=0.040 |
| Confronto tra la frequenza del genotipo della IL-6 -174CG in pazienti con ictus ischemico e nei controlli | | | | |
| GC | 46 (47.9%) | 33 (68.7%) | 0.028 | |
| CC | 10 (10.4%) | 1 (2.1%) | 0.100 | |
| GG | 40 (41.7%) | 14 (29.2%) | 0.201 | |
| Confronto tra gli alleli della IL -1 VNTR 86bp in pazienti con ictus ischemico e nei controlli | | | | |
| 1/1 | 46 (47.9%) | 23 (47.9%) | 0.859 | |
| 1/2 | 28 (29.2%) | 21 (43.7%) | 0.120 | |
| 1/3 | 2 (2.1%) | 2 (4.2%) | 0.600 | |
| 2/2 | 20 (20.8%) | 2 (4.2%) | 0.017 | 7.50(1.57-35.68) p=0.011 |

Tabella 4: Frequenza del polimorfismo dei genotipi pro-infiammatori /anti-infiammatori e trombotico/ fibrinolitici in soggetti con ictus ischemico acuto in relazione al sottotipo TOAST

| Incidenza del genotipo del TNF- α -308 G/A in pazienti con sottotipi diversi di ictus secondo la classificazione TOAST | | | | | |
|---|------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|----------|----------------------------|
| | LAAS (n.37) | Lacunare (n: 34) | Cardioembolico (n: 25) | P | OR (95% CI) |
| GG | 30 (81.1%) | 33 (97.1%) | 20 (80.0%) | 0.079 | |
| GA | 7 (18.9%) | 1 (2.9%) | 4 (16.0%) | 0.104 | |
| AA | 0 (0%) | 0 (0%) | 1 (4.0%) | 0.238 | |
| Incidenza dei genotipi della IL-10 APL 1082 AG in pazienti con sottotipi diversi di ictus secondo la classificazione TOAST | | | | | |
| | LAAS (n.37) | Lacunare (n: 34) | Cardioembolico (n: 25) | P | OR (95% CI) |
| GG | 10 (27.0%) | 9 (26.5%) | 5 (20.0%) | 0.797 | |
| GA | 4 (10.8%) | 4 (11.8%) | 6 (24.0%) | 0.298 | |
| AA | 23(62.2%) | 21 (61.8%) | 14 (56.0%) | 0.870 | |
| Incidenza dei genotipi della IL-10 APL 819 CT in pazienti con sottotipi diversi di ictus secondo la classificazione TOAST | | | | | |
| | LAAS (n.37) | Lacunare (n: 34) | Cardioembolico (n: 25) | P | OR (95% CI) |
| CC | 23 (62.2%) | 22 (64.7%) | 18 (72%) | 0.718 | |
| CT | 5 (13.5%) | 4 (11.8%) | 5 (20%) | 0.657 | |
| TT | 9 (24.3%) | 8 (23.5%) | 2 (8%) | 0.226 | |
| Incidenza del genotipo del PAI-1675 5G/4G in pazienti con sottotipi diversi di ictus secondo la classificazione TOAST | | | | | |
| | LAAS (n.37) | Lacunare (n: 34) | Cardioembolico (n: 25) | P | OR (95% CI) |
| 5G/5G | 27 (72.9%) | 26 (76.5%) | 15 (60.0%) | 0.363 | |
| 5G/4G | 10 (27.0%) | 8 (23.5%) | 9 (36.0%) | 0.564 | |
| 4G/4G | 0 (0%) | 0 (0%) | 1 (4.0%) | 0.238 | |
| Incidenza del genotipo del TPA in pazienti con sottotipi diversi di ictus secondo la classificazione TOAST | | | | | |
| | LAAS (n.37) | Lacunare (n: 34) | Cardioembolico (n: 25) | P | OR (95% CI) |
| CC | 2 (5.5%) | 10 (29.4%) | 5 (20.0%) | 0.028 | 8.0(1.2-52.6) p=0.031 |
| CT | 27 (72.9%) | 19 (55.9%) | 17 (68.0%) | 0.304 | |
| TT | 8 (21.6%) | 5 (14.7%) | 3 (12.0%) | 0.565 | |
| Incidenza del genotipo della IL-6 -174CG in pazienti con sottotipi diversi di ictus secondo la classificazione TOAST | | | | | |
| | LAAS (n.37) | Lacunare (n: 34) | Cardioembolico (n: 25) | P | |
| CC | 3 (8.1%) | 4 (11.8%) | 3 (12.0%) | 0.841 | |
| CG | 16 (43.2%) | 16 (47.0%) | 14 (56.0%) | 0.610 | |
| GG | 18 (48.6%) | 14 (41.2%) | 8 (32.0%) | 0.426 | |
| Incidenza del genotipo della IL -1 VNTR 86bp in pazienti con sottotipi diversi di ictus secondo la classificazione TOAST | | | | | |
| | LAAS (n.37) | Lacunare (n: 34) | Cardioembolico (n: 25) | P | |
| 1/1 | 14 (37.8%) | 22 (64.7%) | 10 (40.0%) | 0.05 | 3.92(1.2-12.5) p= 0.021 |
| 1/2 | 15 (40.5%) | 6 (17.6%) | 7 (28.0%) | 0.104 | |
| 1/3 | 0 (0%) | 0 (0%) | 2 (8.0%) | 0.054 | |
| 2/2 | 8 (21.6%) | 6 (17.6%) | 6 (24.0%) | 0.828 | |

Bibliografia

1. Heiss WD. Ischemic penumbra: evidence from functional imaging in man
J Cereb Blood Flow Metab 2000;20:1276-1293.
2. Hossmann K-A. Thresholds of ischemic injury. In: Ginsberg MD, Bougousslavsky J (eds). *Cerebrovascular Disease. Pathophysiology, diagnosis and management*. Malden MA, Blackwell Science, 1998:193-204.
3. Siesjo BK, Bengtsson F. Calcium Fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989;9:127-140.
4. Rehncrona S, Hauge HN, Siesjo BK. Enhancement of iron-catalyzed free radical formation by acidosis in brain homogenates: differences in effect by lactic acid and CO₂. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989;9:65-70.
5. Hankey GJ. Stroke: how large a public health problem, and how can the neurologist help? *Arch Neurol* 1999;56:748-754.
6. Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA* 2002;288:2015-2022.
7. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-126.
8. Fieschi C, Argentino C, Lenzi GL, et al. Clinical and instrumental evaluation of patients with ischemic stroke within the first six hours. *J Neurol Sci* 1989;91 :311-321.

9. Jones EF, Kaman JM, Caafiore P, et al. Proximal aortic atheroma. An independent risk factor for cerebral ischemia. *Stroke* 1995;26:218-224
10. Bogousslavsky J, Garazi S, Jeanrenaud X, et al. Stroke recurrence in patients with patent foramen ovale: the Lausanne Study. Lausanne Stroke with Paradoxal Embolism Study Group. *Neurology* 1996;46: 1301-1305.
11. Levine SR, Brust JC, Futrel N, et al. Cerebrovascular complications of the use of the "crack" form of alkaloidal cocaine. *N Engl J Med* 1990;323:699-704.
12. Ezzeddine MA, Primavera JM, Rosand J, et al. Clinical characteristics of pathologically proved cholesterol emboli to the brain. *Neurology* 2000;54:1681-1683.
13. Kappelle LJ, van Gijn J. Lacunar infarcts. *Clin Neurol Neurosurg* 1986;88:317.
14. Wong EH, Pullicino PM, Benedict R. Deep cerebral infarcts extending to the subinsular region. *Stroke* 2001;32:2272-2277.
15. Caplan LR. Intracranial branch atheromatous disease: a neglected, understudied, and underused concept. *Neurology* 1989;39:1246-1250.
16. Benesch CG, Chimowitz MI. Best treatment for intracranial arterial stenosis? Fifty years of uncertainty. The WASID Investigators. *Neurology* 2000;55:465-466.
17. Chiu D, Shedden P, Bratina P, et al. Clinical features of moyamoya disease in the United States. *Stroke* 1998;29:1347-1351.

18. Mounier- Vehier F, Leys D, Godefroy O, et al. Borderzone infarct subtypes: preliminary study of the presumed mechanism. *Eur Neurol* 1994;34:11-15.
19. Gandolfo C, Del Sette M, Finocchi C, et al. Internal borderzone infarction in patients with ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 1998;8:255-258.
20. De Stefano V, Chiusolo P, Paciaroni M, et al. Prothrombin G20210A mutant genotype is a risk factor for cerebrovascular ischemic disease in young patients. *Blood* 1998;91:3562-3565.
21. Camerlingo M, Finazzi G, Casto L, et al. Inherited protein C deficiency and nonhemorrhagic arterial stroke in young adults. *Neurology* 1991 ;41:1371-1373.
22. Markus HS, Hambley H. Neurology and the blood: haematological abnormalities in ischaemic stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;64:150-159
23. Brey RL, Stallworth CL, McGlasson DL, et al. Antiphospholipid antibodies and stroke in young women. *Stroke* 2002;33:2396-2400.
24. Adams HP, Kappelle LJ, Biller J, et al. Ischemic stroke in young adults. Experience in 329 patients enrolled in the Iowa registry of stroke in young adults. *Arch Neurol* 1995;52:491-495.
25. Kurino M, Yoshioka S, Ushio Y. Spontaneous dissecting aneurysms of anterior and middle cerebral artery associated with brain infarction: a case report and review of the literature. *Surg Neurol* 2002;57: 428-436.
26. Begelman SM, Olin JW. Fibromuscular dysplasia. *Curr Opin Rheumatol* 2000;12:41-47

27. Martinez-Fernandez E, Gil-Peralta A, Garcia-Lozano R, et al. Mitochondrial disease and stroke. *Stroke* 2001;32:2507-2510.
28. Milhaud D, Bogousslavsky J, van Melle G, et al. Ischemic Stroke and active migraine. *Neurology* 2001;57:1805-1811.
29. Bousser MG. Cerebral venous thrombosis: diagnosis and management. *J Neurol* 2000;247:252-258.
30. Schulz UG, Flossmann E, Rothwell PM. Heritability of ischemic stroke in relation to age, vascular risk factors, and subtypes of incident stroke in population-based studies. *Stroke* 2004;35:819-824.
31. Flossmann E, Schulz UG, Rothwell PM. Systematic review of methods and results of studies of the genetic epidemiology of ischemic stroke. *Stroke* 2004;35:212-227.
32. Kalaria RN, Low WC, Oakley AE, et al. CADASIL and genetics of cerebral ischaemia. *J Neurol Transm Suppl* 2002;63:75-90.
33. Gretarsdottir S, Thorleifsson G, Reynisdottir ST, et al. The gene encoding phosphodiesterase 4D confers risk of ischemic stroke. *Nat Genet* 2003;35:131-138.
34. Helgadottir A, Manolescu A, Thorleifsson G, et al. The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. *Nat Genet* 2004;36(3):233-239.
35. Martiskainen M, Pohjasvaara T, Mikkelsen I, et al. Fibrinogen gene promoter 455 A allele as a risk factor for lacunar stroke. *Stroke* 2003;34:886-891.

36. Beer JH, Pederiva S, Pontiggia L. Genetics of platelet receptor single-nucleotide polymorphisms: clinical implications in thrombosis. *Ann Med* 2000;32(Suppl)1:10-14
37. Karagiannis A, Balaska K, Tziomalos K, et al. Lack of an association between angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and ischaemic stroke. *Eur Neurol* 2004;51 :148-152.
38. Kelly PJ, Rosand J, Kistler JP, et al. Homocysteine, MTHFR 677C → T polymorphism, and risk of ischemic stroke: results of a meta-analysis. *Neurology* 2002;59:529-536.
39. Pezzini A, Grassi M, Del Zotto E, et al. Synergistic effect of apolipoprotein E polymorphisms and cigarette smoking on risk of ischemic stroke in young adults. *Stroke* 2004;35:438-442.
40. Voetsch B, Benke KS, Panhuysen CI, et al. The combined effect of para-oxonase promoter and coding region polymorphisms on the risk of arterial ischemic stroke among young adults. *Arch Neurol* 2004;61 :351-356.
41. Nakase T, Yamazaki T, Ogura N, Suzuki A, Nagata K. The impact of inflammation on the pathogenesis and prognosis of ischemic stroke. *J Neurol Sci.* 2008 Aug 15;271(1-2):104-9.

Herrmann SM, Ricard S, Nicaud V, Mallet C, Arveiler D, Evans A, et al. Polymorphisms of the tumour necrosis factor-alpha gene, coronary heart disease and obesity. *Eur J Clin Invest* 1998;1:59e66.
42. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3195e9.

43. Um JY, An NH, Kim HM. TNF-alpha and TNF-beta gene polymorphisms in cerebral infarction. *J Mol Neurosci* 2003;21:167e71.
44. Um JY, Kim HM. Tumor necrosis factor alpha gene polymorphism is associated with cerebral infarction. *Brain Res Mol Brain Res* 2004;122:99e102
45. Lee BC, Ahn SY, Doo HK, Yim SV, Lee HJ, Jin SY, et al. Susceptibility for ischemic stroke in Korean population is associated with polymorphisms of the interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor-alpha genes, but not the interleukin-1beta gene. *Neurosci Lett* 2004;1:33e6.
46. Um JY, An NH, Kim HM. TNF-alpha and TNF-beta gene polymorphisms in cerebral infarction. *J Mol Neurosci* 2003;21:167e71.
47. Um JY, Kim HM. Tumor necrosis factor alpha gene polymorphism is associated with cerebral infarction. *Brain Res Mol Brain Res*. 2004;122:99e102.
48. [5] Lee BC, Ahn SY, Doo HK, Yim SV, Lee HJ, Jin SY, et al. Susceptibility for ischemic stroke in Korean population is associated with polymorphisms of the interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor-alpha genes, but not the interleukin-1beta gene. *Neurosci Lett* 2004;1:33e6.
49. Strle K, Zhou JH, Shen WH, et al. Interleukin-10 in the brain. *Crit Rev Immunol*. 2001;21:427-449.
50. Ledebor A, Breve JJ, Poole S, Tilders FJ, Van Dam AM. Interleukin-10, interleukin- 4, and transforming growth factor- differentially regulate lipopolysaccharide- induced production of pro-inflammatory cytokines

- and nitric oxide in cocultures of rat astroglial and microglial cells. *Glia*. 2000;30:134-142.
51. Szczepanik AM, Funes S, Petko W, Ringheim GE. IL-4, IL-10 and IL-13 modulate A₁(1–42)-induced cytokine and chemokine production in primary murine microglia and a human monocyte cell line. *J Neuroimmunol*. 2001;113:49-629.
52. Reuss, E., Fimmers, R., Kruger, A., Becker, C., Rittner, C., Hohler, T. Differential regulation of interleukin-10 production by genetic and environmental factors—a twin study. *Genes Immun* 2002; 407–413; 13.
53. Yilmaz, V., Yentür, S. P., Saruhan-Direskeneli, G. IL-12 and IL-10 polymorphisms and their effects on cytokine production. *Cytokine* 2005 30, 188–194; 14.
54. Capasso, M., Avvisati, R. A., Piscopo, C., Laforgia, N., Raimondi, F., de Angelis, F., Iolascon, A. Cytokine gene polymorphisms in Italian preterm infants: association between interleukin-10 -1082 G/A polymorphism and respiratory distress syndrome. *Pediatr. Res* 2007. 61, 313–317.
55. Lowe, P. R., Galley, H. F., Abdel-Fattah, A., Webster, N. R. Influence of interleukin-10 polymorphisms on interleukin-10 expression and survival in critically ill patients. *Crit. Care Med* 2003. 31, 34–38.
56. Eder, T., Mayer, R., Langsenlehner, U., Renner, W., Krippel, P., Wascher, C., Pummer, K., Kapp, K. S. Interleukin-10 [ATA] promoter haplotype and prostate cancer risk: a population-based study. *Eur. J. Cancer* 2007 43, 472–475.

57. Crawley, E., Kay, R., Sillibourne, J., Patel, P., Hutchinson, I., Woo, P. (1999) Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*42, 1101–1108.
58. Shin, H. D., Park, B. L., Kim, Y. H., Cheong, H. S., Lee, I. H., Park, S. K. Common interleukin 10 polymorphism associated with decreased risk of tuberculosis. *Exp. Mol. Med.* 2005 37, 128–132.
59. Vohnout B, Di Castelnuovo A, Trotta R, D'Orazi A, Panniteri G, Montali A, Donati MB, Arca M, Iacoviello L. Interleukin-1 gene cluster polymorphisms and risk of coronary artery disease. *Haematologica.* 2003 Jan;88(1):54-60.
60. Attia J, Thakkinstian A, Wang Y, Lincz L, Parsons M, Sturm J, McGettigan P, Scott R, Meldrum C, Levi C.J The PAI-1 4G/5G gene polymorphism and ischemic stroke: an association study and meta-analysis. *Stroke Cerebrovasc Dis.* 2007 Jul-Aug;16(4):173-9.
61. Tsantes AE, Nikolopoulos GK, Bagos PG, Tsiara CG, Kapsimali V, Travlou A, Vaiopoulos Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and risk of ischemic stroke: a meta-analysis. *G.Blood Coagul Fibrinolysis.* 2007 Jul;18(5):497-504.
62. Hatano S. Experience from a multicenter Stroke register; a preliminary report. *Bull World Health Organ* 1976;54: 541e53.

63. Cuspidi C, Meani S, Salerno M, Severgnini B, Fusi V, Valerio C, Catini E, Magrini F, Zanchetti A. Cardiovascular risk stratification according to the 2003 ESH-ESC guidelines in uncomplicated patients with essential hypertension: comparison with the 1999 WHO/ISH guidelines criteria. *Blood Press*. 2004;13(3):144-51
64. Adams H.P, Bendixen B.H, Kappelle J, Biller J, Love B, Gordon M.D, Marsh E.E. and the TOAST Investigators. Classification of subtype of acute ischemic stroke. *Stroke* 1993; *e24*..358.
65. Karapanayiotides T, Piechowski-Jozwiak B, van Melle G, Bogousslavsky J, Devuyst G. Stroke patterns, etiology, and prognosis in patients with diabetes mellitus. *Neurology*. 2004 May 11;62(9):1558-62
66. Megherbi SE, Milan C, Minier D, Couvreur G, Osseby GV, Tilling K, Di Carlo A, Inzitari D, Wolfe CD, Moreau T, Giroud M; European BIOMED Study of Stroke Care Group Association between diabetes and stroke subtype on survival and functional outcome 3 months after stroke: data from the European BIOMED Stroke Project. *Stroke*. 2003 Mar;34(3):688-94.
67. Tuttolomondo A, Pinto A, Salemi G, Di Raimondo D, Di Sciacca R, Fernandez P, Ragonese P, Savettieri G, Licata G. Diabetic and non-diabetic subjects with ischemic stroke: differences, subtype distribution and outcome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2008 Feb;18(2):152-7.
68. Forte GI, Scola L, Misiano G, Milano S, Mansueto P, Vitale G, Bellanca F, Sanacore M, Vaccarino L, Rini GB, Caruso C, Cillari E, Lio D, Mansueto S. Relevance of gamma interferon, tumor necrosis factor alpha,

- and interleukin-10 gene polymorphisms to susceptibility to Mediterranean spotted fever. *Clin Vaccine Immunol.* 2009 Jun;16(6):811-5.
69. Forte GI, Calà C, Scola L, Crivello A, Gullo A, Marasà L, Giacalone A, Bonura C, Caruso C, Lio D, Giammanco A. Role of environmental and genetic factor interaction in age-related disease development: the gastric cancer paradigm. *Rejuvenation Res.* 2008 Apr;11(2):509-12.
70. Pes GM, Lio D, Carru C, Deiana L, Baggio G, Franceschi C, Ferrucci L, Oliveri F, Scola L, Crivello A, Candore G, Colonna-Romano G, Caruso C. Association between longevity and cytokine gene polymorphisms. A study in Sardinian centenarians. *Aging Clin Exp Res.* 2004; 16:244-8.
71. Naran NH, Chetty N, Crowther NJ. The influence of metabolic syndrome components on plasma PAI-1 concentrations is modified by the PAI-1 4G/5G genotype and ethnicity. *Atherosclerosis.* 2008; 196:155-63.
72. Armstrong CA, Bevan SN, Gormley KT, Markus HS, Koblar SA. Tissue plasminogen activator -7351C/T polymorphism and lacunar stroke. *Stroke.* 2006; 37:329;
73. Santiago Rodriguez, Tom R. Gaunt and Ian N. M. Day. Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies. *American Journal of Epidemiology* Advance Access published on January 6, 2009, DOI 10.1093/aje/kwn359
74. Ross, R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 1999, 340, 115–126.
75. Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002, 420, 868–874.

76. Fan, J. and Watanabe, T. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *J. Atheroscler. Thromb* 2003., 10, 63–71.4. Tiong, A.Y. and Brieger, D. Inflammation and coronary artery disease. *Am. Heart. J.* 2005, 150, 11–18.5.
77. Frostegard, J., Ulfgren, A.K., Nyberg, P., Hedin, U., Swedenborg, J., Andersson, U. and Hansson, G.K. (1999) Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis*, 145, 33–43.
78. Tedgui, A. and Mallat, Z. (2006) Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol. Rev.*, 86, 515–581.
79. Nilsson-Ardnor S, Janunger T, Wiklund PG, Lackovic K, Nilsson AK, Lindgren P, Escher SA, Stegmayr B, Asplund K, Holmberg D Genome-wide linkage scan of common stroke in families from northern Sweden..*Stroke*. 2007 Jan;38(1):34-40.
80. Matarín M, Brown WM, Scholz S, Simón-Sánchez J, Fung HC, Hernandez D, Gibbs JR, De Vrieze FW, Crews C, Britton A, Langefeld CD, Brott TG, Brown RD Jr, Worrall BB, Frankel M, Silliman S, Case LD, Singleton A, Hardy JA, Rich SS, Meschia JFA genome-wide genotyping study in patients with ischaemic stroke: initial analysis and data release.. *Lancet Neurol*. 2007 May;6(5):414-20.
81. Matarin M, Brown WM, Singleton A, Hardy JA, Meschia JF; ISGS investigators Whole genome analyses suggest ischemic stroke and heart disease share an association with polymorphisms on chromosome 9p21. *Stroke*. 2008 May;39(5):1586-9.

82. A.J. De Craen, D. Posthuma, E.J. Remarque, *et al.* 2005. Heritability estimates of innate immunity: an extended twin study. *Genes Immun.* **6**: 167–170.
83. Lowe, P. R., Galley, H. F., Abdel-Fattah, A., Webster, N. R. (2003) Influence of interleukin-10 polymorphisms on interleukin-10 expression and survival in critically ill patients. *Crit. Care Med.* 31, 34–38.
84. Eder, T., Mayer, R., Langsenlehner, U., Renner, W., Krippel, P., Wascher, T. C., Pummer, K., Kapp, K. S. (2007) Interleukin-10 [ATA] promoter haplotype and prostate cancer risk: a population-based study. *Eur. J. Cancer* 43, 472–47.
85. Yilmaz, V., Yentur, S. P., Saruhan-Direskeneli, G. (2005) IL-12 and IL-10 polymorphisms and their effects on cytokine production. *Cytokine* 30, 188–194.
86. Berglundh, T., Donati, M., Hahn-Zoric, M., Hanson, L. A., Padyukov, L. (2003) Association of the -1087 IL 10 gene polymorphism with severe chronic periodontitis in Swedish Caucasians. *J. Clin. Periodontol.* 30, 249–254
87. Shin, H. D., Park, B. L., Kim, Y. H., Cheong, H. S., Lee, I. H., Park, S. K. (2005) Common interleukin 10 polymorphism associated with decreased risk of tuberculosis. *Exp. Mol. Med.* 37, 128–132.
88. Chung, E. Y., Liu, J., Zhang, Y., Ma, X. (2007) Differential expression in lupus-associated IL-10 promoter single-nucleotide polymorphisms is mediated by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Genes Immun.* 8, 577–589.

89. Grilli M, Barbieri I, Basudev H, Brusa R, Casati C, Lozza G, Ongini E. Interleukin-10 modulates neuronal threshold of vulnerability to ischaemic damage. *Eur J Neurosci*. 2000 Jul;12(7):2265-72
90. Spera PA, Ellison JA, Feuerstein GZ, Barone FC. IL-10 reduces rat brain injury following focal stroke. *Neurosci Lett*. 1998 Jul 31;251(3):189-92.
91. van Exel E, Gussekloo J, de Craen AJ, Bootsma-van der Wiel A, Frölich M, Westendorp RG. Inflammation and stroke: the Leiden 85-Plus Study . *Stroke*. 2002 Apr;33(4):1135-8
92. Arend WP 2002 The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 13:323–340
93. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, Herrera J, Lissowska J, Yuan CC, Rothman N, Lanyon G, Martin M, Fraumeni Jr JF, Rabkin CS 2000 Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 404:398–402 13.
94. Santtila S, Savinainen K, Hurme M 1998 Presence of the IL-1RA allele 2 (IL1RN*2) is associated with enhanced IL-1- production *in vitro*. *Scand J Immunol* 47:195–198.
95. Hurme M, Santtila S 1998 IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) plasma levels are co-ordinately regulated by both IL-1Ra and IL-1 β genes. *Eur J Immunol* 28:2598–2602.
96. Matsuno H, Kozawa O, Niwa M, Ueshima S, Matsuo O, Collen D, Uematsu T. Differential role of components of the fibrinolytic system in the formation and removal of thrombus induced by endothelial injury. *Thromb Haemost*. 1999;81:601– 604.

97. Eriksson P, Kallin B, van't Hooft FM, Båvenholm P, Hamsten A. Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci. U S A.* 1995;92:1851–1855.
98. Catto AJ, Carter AM, Stickland M, Bamford JM, Davies JA, Grant PJ. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G promoter polymorphism and levels in subjects with cerebrovascular disease. *Thromb Haemost.* 1997;77:730–734.
99. Endler G, Lalouschek W, Exner M, Mitterbauer G, Haring D, Mannhalter G. The 4G/4G genotype at nucleotide position -675 in the promoter region of the plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) gene is less frequent in young patients with minor stroke than in controls. *Br J Haematol.* 2000;110:469–471.
100. Roest M, van der Schouw YT, Banga JD, Tempelman MJ, de Groot PG, Sixma JJ, Grobbee DE. Plasminogen activator inhibitor 4G polymorphism is associated with decreased risk of cerebrovascular mortality in older women. *Circulation.* 2000;101:67–70.
101. Elbaz A, Cambien F, Amarenco P. Plasminogen activator inhibitor genotype and brain infarction. *Circulation.* 2001;103:E13–E14.
102. Hindorff LA, Schwartz SM, Siscovick DS, Psaty BM, Longstreth WT Jr, Reiner AP. The association of PAI-1 promoter 4G/5G insertion/deletion polymorphism with myocardial infarction and stroke in young women. *J Cardiovasc Risk.* 2002;9:131–137

103. Hoekstra T, Geleijnse JM, Kluft C, Giltay EJ, Kok FJ, Schouten EG. 4G/4G genotype of PAI-1 gene is associated with reduced risk of stroke in elderly. *Stroke*. 2003;34:2822–2828.
104. Ladenvall P, Jern S, Wall C, Jern C. Identification of eight novel singlenucleotide polymorphisms at human tissue-type plasminogen activator (tPA) locus: associations with vascular release rate of tPA *in vivo*. *Thromb Haemost*. 2000;84:150–155.
105. Ladenvall P, Johansson L, Jansson J-H, Jern S, Nilsson TK, Tjærnlund A, Jern C, Boman K. Tissue-type plasminogen activator -7,351C/T enhancer polymorphism is associated with a first myocardial infarction. *Thromb Haemost*. 2002;87:105–109.
106. Jannes J, Hamilton-Bruce MA, Pilotto L, Smith BJ, Mullighan CG, Bardy PG, Koblar SA. Tissue plasminogen activator -7351C/T enhancer polymorphism is a risk factor for lacunar stroke. *Stroke*. 2004;35:1090 – 1094.
107. Tuttolomondo A, Di Sciacca R, Di Raimondo D, Serio A, D'Aguanno G, La Placa S, Pecoraro R, Arnao V, Marino L, Monaco S, Natalè E, Licata G, Pinto A. Plasma levels of inflammatory and thrombotic/fibrinolytic markers in acute ischemic strokes: relationship with TOAST subtype, outcome and infarct site. *J Neuroimmunol*. 2009 Oct 30;215(1-2):84-9.
108. Licata G, Tuttolomondo A, Di Raimondo D, Corrao S, Di Sciacca R, Pinto A. Immuno-inflammatory activation in acute cardio-embolic

- strokes in comparison with other subtypes of ischaemic stroke. *Thromb Haemost.* 2009 May;101(5):929-37.
109. Harcos P, Laki J, Kiszél P, Széplaki Z, Szolnoki Z, Kovács M, Melegh B, Széplaki G, Füst G, Blaskó B Decreased frequency of the TNF2 allele of TNF-alpha-308 promoter polymorphism is associated with lacunar infarction. *Cytokine.* 2006 Jan 21;33(2):100-5.
110. Hoekstra T, Geleijnse JM, Kluit C, Giltay EJ, Kok FJ, Schouten EG. 4G/4G genotype of PAI-1 gene is associated with reduced risk of stroke in elderly. *Stroke.* 2003 Dec;34(12):2822-8.