



**Universiteit
Leiden**
The Netherlands

Leukocytes and complement in atherosclerosis

Alipour, A.

Citation

Alipour, A. (2012, February 9). *Leukocytes and complement in atherosclerosis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/18459>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/18459>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

**General discussion and
future perspectives**

**Nederlandse samenvatting
en toekomstperspectieven**



GENERAL DISCUSSION

Despite major advances in cardiovascular management, atherosclerosis remains a major contributor of morbidity and mortality worldwide. Presently, cardiovascular mortality accounts for 30% of all deaths in the Netherlands and this is more or less similar for the industrialized world population.

Hyperlipidemia and hyperglycemia remain important risk factors for cardiovascular disease (CVD), despite the identification of many novel risk factors. Both, hyperlipidemia and hyperglycemia are frequently found in disorders related to premature atherosclerosis like the metabolic syndrome and diabetes mellitus. In the postprandial phase both hyperlipidemia and hyperglycemia, become more critical due to insulin resistance and competition between endogenous and exogenous TG-rich lipoproteins (TRLs) at different TG catabolic sites.

One of the proposed key steps in the initiation of atherosclerosis is the activation of leukocytes in the circulation. Especially, activated monocytes have been suggested to play an important role in the formation of atheroma's by the transformation to macrophages and foam cells. Besides the well established role of these inflammatory cells, neutrophils are also involved in the generation of CVD. However, so far there are no comprehensive mechanistic explanations for the pro-atherogenic role of neutrophils. One of the possible mechanisms may be that the neutrophils also become activated in the circulation by the same triggers as monocytes (namely glucose and lipoproteins) thereby generating a situation of increased inflammation and oxidative stress whereby other cells like monocytes and endothelial cells also become activated. This reflects the "lipoprotein-induced inflammatory cascade" in the circulation, as proposed by our group.

Using flowcytometrie, we were able to measure specific leukocyte activation markers, reflecting a state of activation and therefore inflammation. CD11b (also known as MAC-1 or CR3) which is expressed on both monocytes and neutrophils is one of the most important markers involved in early adhesion of these leukocytes to the endothelium. CD66b (CEACAM8) is a degranulation marker of neutrophils. Increased expression of these markers on fasting leukocytes in patients with CVD and type 2 diabetes mellitus (T2DM) has been described before, suggesting a state of increased activation. In the first two chapters of **part I** of this thesis, we studied the role of TRLs and glucose on leukocyte activation. The goal of **Chapter I-a** was to investigate the effects of TRLs on leukocyte activation. The mechanisms of this activation were also studied. *In vivo* studies using oral fat loading tests (OFLT) showed that monocyte CD11b and neutrophil CD11b and CD66b in the acute postprandial phase were significantly increased. Moreover, by *ex vivo* experiments, we demonstrated that the expression of these markers increase dose dependently after incubating with physiological concentrations of TRLs (15 minutes incubation). The monocyte CD11b expression, after incubation with artificial TRL's at higher TG concentrations (10 mmol/L) was even higher than the increase observed after incubation with our positive control (fMLP). The TRLs-induced CD66b expression was oxidative stress driven since it was

reversed after adding a oxidative stress scavenger. Finally, using stable isotopes we found that postprandial leukocytes become enriched with meal-derived fatty acids in the postprandial phase and that leukocytes carry apoB-containing lipoproteins. All these data suggest that acute hypertriglyceridemia is a leukocyte activator most likely by direct interaction between TRLs and leukocytes and by direct uptake of dietary fatty acids in the circulation. Interestingly, acute hyperglycemia (15 minutes) did not result in an up-regulation of monocyte and neutrophil activation markers in *ex vivo* experiments. So, TG may be a more potent activator of inflammatory cells than glucose, especially in the acute (postprandial) situation.

Patients with familial hypercholesterolemia (FH) and familial combined hyperlipidemia (FCH) have higher levels of leukocyte activation and oxidative stress status than healthy subjects. This pro-inflammatory situation has been ascribed to their dyslipidemia and is associated with atherosclerosis. The effects of glucose loading in these conditions on leukocyte activation patterns was not studied before. In **chapter I-b**, we showed that after an oral glucose tolerance test (OGTT) the postprandial glucose response was significantly higher in FH and FCH patients compared to controls. The 2 hours post glucose leukocyte activation (monocyte CD11b and neutrophil CD11b and CD66b) expressed as the incremental area under the curve (dAUC), showed persistent activation in FH and FCH patients, whereas controls showed at least two times lower leukocyte activation dAUCs than these patients. There was a consistent positive correlation between postprandial leukocyte activation markers and glucose excursions. Our data suggest that the differences may be explained by a more efficient postprandial glucose handling in controls than in FH and FCH. These data were somewhat unexpected because, so far, glucose handling in FH subjects is considered to be normal. In FCH subjects the results were less surprising, because these subjects are known to be insulin resistant and have been reported to have a higher level of continuous subclinical inflammation. It remains to be shown whether the response in hyperlipidemic patients can be restored by improving insulin sensitivity. We speculate that their persistent leukocyte activation in the postprandial phase contributes to their higher cardiovascular risk burden.

ApoB48 is the unique protein to the TRLs from the small intestine and is a non-exchangeable apolipoprotein serving as the marker for chylomicrons and their remnants. Increased fasting levels of these apolipoproteins may suggest inefficient TRL metabolism (or intestinal overproduction of chylomicrons) and eventually increased formation of chylomicron remnant particles which has been associated to the generation of atherosclerosis. In **chapter I-c**, we studied the usefulness of measuring fasting levels of apoB48 as a marker of subclinical atherosclerosis in different patient groups compared to controls. The patient groups consisted of patients with FH, FCH, T2DM and CAD. A group consisting of both T2DM and CAD was also included. Intima-media thickness (IMT) of the carotid artery was used to quantitate subclinical atherosclerosis. Despite the use of lipid lowering drugs, the highest levels of apoB48 were found in FCH patients and in patients with T2DM and CAD, whereas other lipid measures such as total cholesterol,

LDL, HDL, total apoB and apoAI did not differ between the groups. As expected no correlations were found between the lipid measures including apoB48 and IMT in the total group. However, after excluding subjects using lipid lowering drugs, the strongest correlation with IMT was found for apoB48 levels ($r=0.52$; $P<0.001$), whereas total apoB did not correlate with IMT. So, in subjects not on lipid lowering therapy, fasting apoB48 levels may help to detect subjects at risk for cardiovascular disease. Despite the fact that large prospective studies are needed to reach final conclusions, we speculate that apoB48 may be used in the clinical practice for patients being screened for risk factors for CVD.

As described before, leukocyte activation is an essential factor in atherosclerosis. **Part II** describes differences in leukocyte activation between genders and in different vascular components. Moreover, the role of leukocyte activation as predictor of CAD was explored. In **chapter II-a**, we showed that women with CAD display significant lower leukocyte activation markers than men with CAD, whereas no differences could be demonstrated between men and women without CAD. Women with CAD also showed lower expression of leukocyte activation than women without CAD. No differences were found for leukocyte activation markers between CAD- and CAD+ men. We could not find any relationship with the use of medication or the severity of CAD. The variable most clearly associated with leukocyte activation was plasma triglycerides, but only in men. Positive correlations with apoB and total cholesterol, and negative correlation with HDL were also found, but still, only in men. The fact that these cardiovascular risk factors did not correlate with the leukocyte activation markers in women is illustrative and suggests that other, not yet found, variables affect leukocytes in women. Since no correlation exists with the severity of CAD, we do not know whether this lower activation in women is good or bad. However, this hypothesis generating study may suggest that women's pathways to atherosclerosis is less leukocyte dependent than in men. Larger prospective studies evaluating leukocyte activation between genders and their atherosclerotic status must be done to explain this gender difference.

Atherosclerosis is considered as a generalized inflammatory phenomenon. However, an increasing body of evidence suggests that inflammation may also be a localized phenomenon with predilection for specific sites. It has been shown that the expression of markers like monocyte and neutrophil CD11b and neutrophil myeloperoxidase (MPO) is increased specifically at sites of vulnerable plaques in the coronaries in patients with unstable angina. For patients with stable CAD, these differences have not been established yet. In **chapter II-b**, we evaluated the differences in leukocyte activation in subjects with and without stable CAD in five different vascular compartments (peripheral vein of the forearm, the femoral artery, abdominal aorta and the right and left (main) coronary artery). Moreover, the mRNA expression of inflammatory genes using microarray analysis, as well as at the whole genome level were studied. Patients with CAD were under standard cardiovascular therapy and had even lower total cholesterol,

LDL and apoB than controls. We found that MPO expression was higher in CAD patients *at all sites* compared to controls, with no differences for the other leukocyte activation markers. Furthermore, a gradient of increased inflammation from peripheral vessels to the coronaries was observed by differences in MPO in both groups. Microarray analysis showed up-regulation of genes linked to endothelial dysfunction, smooth muscle cell proliferation, and especially the macrophage scavenger receptor gene in CAD patients when compared to those without CAD. Therefore, we speculated that even stable atherosclerotic patients under standard cardiovascular control and therapy, display an up-regulation of inflammatory factors in various steps in the atherosclerotic cascade, from the initiation of it by neutrophil activation (by MPO secretion), macrophage formation and endothelial dysfunction to smooth muscle cell proliferation. These data may, at least in part, explain why patients with atherosclerotic burden under standard therapy, still have higher risk of new atherosclerotic events than their healthy counterparts. While many risk factors were well controlled in our CAD patients, the process of atherosclerosis seems to be active. So, the question is how to influence this pro-atherogenic situation toward a 'normal' situation. For this purpose, another question needs to be answered: which exact factors are predominantly responsible and negatively influence this pro-inflammatory/atherosclerotic processes?

In the past few years much attention has been paid to markers predicting future cardiovascular events. The focus was mostly on markers of inflammation such as C-reactive protein (CRP). However, no studies have been conducted to investigate whether leukocyte activation markers may also be useful markers to detect the risk of future events. **Chapter II-c** showed a prospective follow-up study to evaluate the predictive value for future cardiovascular events (CV) of leukocyte activation markers compared to other inflammatory variables and classical CV risk factors in patients with and without CAD. After a follow-up of (mean±SEM) 2.0±0.03 years, multiple logistic regression analysis demonstrated that pre-existing CAD, monocyte CD11b expression and systolic blood pressure were determinants of future CV events in total group. In patients with CAD under standard therapy, monocyte CD11b expression remained the only predictor of CV events. So, monocyte activation is not only the inductor of atherogenesis, but it also appears to be important in the progression of it. One has to realize that our study may have been underpowered to elicit the other inflammatory factors as predictors for future cardiovascular disease. Larger studies with enough power should be performed to truly compare the different markers as predictors.

In the last decade, another inflammatory player besides leukocytes has been redundantly associated to atherosclerosis. This is the complement system. Its central component, complement component 3 (C3) has been associated to CAD, insulin resistance, obesity, elevated fasting and postprandial TG and disturbed postprandial free fatty acid handling. These associations are

beyond that of atheroma formation by inflammation. Indeed, there is evidence suggesting that the complement system is involved in the metabolism of apoB-containing lipoproteins.

Mannose binding lectin is the key activating factor in the lectin pathway of the complement system, one of the three well-known routes of complement activation. Mutations of the MBL2 gene, resulting in decreased activity, have been associated with atherosclerosis, but also high levels of MBL have been linked to CAD. **Part III** of this thesis studied the role of MBL in TRL metabolism, in atherosclerotic progression and postulates a novel TRL transport pathway by TRL-MBL binding.

Since the missing link between complement and postprandial lipemia could be MBL, we explored the postprandial metabolism of TRLs in MBL deficient and sufficient subjects in **chapter III-a**. OFLTs in MBL deficient and sufficient subjects showed similar postprandial TG, free fatty acid, hydroxybutyric acid and C3 concentrations. However, MBL deficient subjects had 2.4 times lower postprandial Sf>400(chylomicron)-apoB48 concentrations, but in contrast a 2-3.5 times increased Sf 60-400(VLDL1-TG) and Sf 60-400-apoB100 response. MBL activity was inversely related to the postprandial Sf 60-400-TG increase. Our data suggested that MBL deficient subjects have an increased postprandial Sf 60-400 lipoproteins, which are to be more atherogenic than Sf>400(chylomicron)-apoB48 concentrations. We postulate that this subtle difference in postprandial TRL changes may, in part, explain the atherogenic tendency of MBL deficient subjects.

In **Chapter III-b**, we explored whether MBL2 haplotypes corresponding to low, intermediate and high MBL production are also associated to the *progression* of atherosclerotic process which was expressed as the rate of angiographic progression of coronary atherosclerosis during pravastatin treatment in the REGRESS cohort, a placebo-controlled 2 years intervention study in men with proven CAD. We found that MBL2 secretor haplotypes were not associated to the rate of progression of coronary sclerosis. Furthermore, pravastatin treatment did not influence the progression of atherosclerotic burden based on MBL2 haplotypes. Despite the fact that the literature shows a relation between MBL and atherogenesis, no association could be found between MBL and the *progression* of the atherosclerotic disease in these CAD patients.

As described before, the complement system and TRLs seem to be connected. The binding of LDL and other apoB-containing lipoproteins to leukocytes have been established before (chapter I-a). Three decade ago, the binding of these particles to erythrocytes had been suggested. It has been shown that the cholesterol content of erythrocyte membranes is more than 2 times higher in patients presenting with acute coronary syndrome than in patients with stable angina. **Chapter III-c**, launches a novel concept for the transport of apoB-containing lipoproteins in the circulation. Preliminary data from our laboratory suggest that subjects with CAD have a lower signal of apoB on erythrocytes than subjects without CAD. Since erythrocytes do not express LDL-receptor, we hypothesized that complement receptor 1 (CR1) facilitates this

attachment. Since complement activation can only take place on proteins and glycoproteins, we propose that MBL binds to certain sugars on the surface of the apoB containing lipoproteins to enable the binding. The clinical consequence is that in theory, binding of apoB-containing lipoproteins to erythrocytes can be an anti-atherogenic mechanism by preventing these atherogenic particles to interact with the endothelium.

FUTURE PERSPECTIVES

Adhesion of leukocytes to the endothelium is a prerequisite for the development of atherosclerosis. As shown in part I, binding of TRLs to the leukocytes and opsonization, especially in the postprandial situation may be one of the first events in the activation of neutrophils and monocytes. Concomitant activation of endothelial cells may occur, making this the first step in the process of atherosclerosis already occurring in the bloodstream in contrast to the current view that atherosclerosis starts by the migration of LDL and TRL-remnants to the sub-endothelium. Since we did not study the 'true' binding of the activated leukocytes to the endothelium, the next step would be to investigate whether activated leukocytes indeed bind to the activated endothelium. In the light of the increased MPO activation in the coronaries, it would be even more interesting to evaluate whether the activated leukocytes bind more at sites of high shear stress such as the coronaries. Since there are gender differences in leukocyte activation, it would be interesting to study the specific leukocyte-endothelium binding between genders. Another factor which deserves more exploration is the difference between TRLs and glucose in their effects on leukocyte activation. Direct *in vivo* comparisons, for example using oral fat loading tests in comparison to glucose tests may help to reveal the differences between these nutrients. Moreover, specific interventions need to be designed to modulate these postprandial changes in order to further characterize the *in vivo* importance of the observed leukocyte changes.

Leukocyte activation markers in the clinical practice should also be evaluated. Therefore, larger epidemiological follow-up studies are needed with enough power to detect whether these markers are able to compete with other powerful parameters such as CRP and C3. Moreover, the role of leukocyte activation markers in other inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis which is associated to atherosclerosis, should be explored.

MBL was another subject in this thesis. As mentioned before, the postprandial phase has been linked to complement activation. It would be interesting to explore the molecular mechanism behind the activation of complement by TRLs. Preliminary data from our laboratory show that apoB binds to both leukocytes and erythrocytes. Since MBL deficiency seems to promote a more atherogenic TRL pattern in the postprandial phase, we postulate that MBL plays a key role in the activation of complement by apoB-TRLs. These studies, including their clinical significance are underway.

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Ondanks significante verbeteringen in cardiovasculaire management blijven de gevolgen van atherosclerose (slagaderverkalking) een grote bijdrage leveren aan morbiditeit en mortaliteit in de wereld. In Nederland was in 2010 het aandeel van hart- en vaatziekten aan de totale sterfte ongeveer 30%. Dit komt min of meer overeen met de prevalentie in de geïndustrialiseerde wereld.

Hyperlipidemie en hyperglycemie blijven, ondanks de identificatie van vele nieuwe factoren, belangrijke risicofactoren voor cardiovasculaire ziekten (CVZ). Beide komen vaak voor in aandoeningen die gerelateerd zijn aan premature atherosclerose zoals het metabool syndroom en diabetes mellitus. Hyperlipidemie en hyperglycemie zijn meer uitgesproken in de postprandiale fase, met name door insuline resistentie en competitie tussen endogene en exogene triglyceride (TG)-rijke lipoproteïnen (TRL's) voor dezelfde metabole routes.

Jaren geleden is voorgesteld dat een belangrijke stap in de initiatie van atherosclerose de activatie is van de leukocyten in de bloedbaan. Zo hebben geactiveerde monocytten een speciale rol in de vorming van plaques doordat ze kunnen transformeren naar macrofagen en schuimcellen. Naast monocytten zijn neutrofiële granulocyten ook betrokken bij het ontstaan van CVZ. Echter, tot nu toe zijn er geen duidelijke mechanistische verklaringen gevonden voor de pro-inflammatoire rol van neutrofiële granulocyten. Een van de mogelijke mechanismen zou kunnen zijn dat neutrofiële granulocyten ook kunnen worden geactiveerd door dezelfde factoren die de monocytten activeren (voornamelijk glucose en lipoproteïnen), waardoor een situatie ontstaat van verhoogde ontsteking en oxidatieve stress. Dit zou een van de eerste stappen van inflammatie kunnen zijn wat zich afspeelt in de circulatie. Vervolgens zouden andere cellen zoals monocytten en endotheelcellen geactiveerd kunnen worden mede onder invloed van producten uit de neutrofielen. Onze groep heeft dit mechanisme voorgesteld als de 'lipoproteïne-geïnduceerde ontstekingskaskade'.

Door gebruik te maken van flowcytometrie zijn wij in staat om specifieke leukocytenactivatiemarkers te meten die een weerspiegeling geven van de activatiestatus van een leukocyt en dus van een ontstekingsproces. CD11b (MAC-1 of CR3) is een van de deze markers die op zowel monocytten als neutrofiële granulocyten tot expressie komt. CD11b is een van de belangrijkste markers die betrokken is bij de binding van leukocyten aan het geactiveerde endotheel. CD66b (CEACAM8) is een andere marker van met name neutrofiële granulocyten en is een zogenaamde degranulatiemarkers. Verhoogde expressie van deze markers zijn aangetoond bij patiënten met diabetes mellitus type 2 (T2DM) en CVZ. In de eerste twee hoofdstukken van **deel I** van dit proefschrift, hebben wij de rol van TRL's en glucose bestudeerd op leukocytenactivatiemarkers. Het doel van **hoofdstuk I-a** was om het effect van TRL's op leukocytenactivatiemarkers te onderzoeken. Wij laten zien dat na orale vetbelastingstesten (OVBT) de leukocyten een significante verhoging van de expressie in CD11b en CD66b tonen in gezonde vrijwilligers. Verder hebben wij door middel van *ex vivo* experimenten laten zien dat er een acute dosisafhankelijke

verhoogde expressie is van deze leukocytenactivatiemarkers met fysiologische concentraties van TRL's (15 minuten). Monocyt CD11b expressie was na toevoegen van 10 mmol/L aan TRL's zelfs hoger dan onze positieve controle (fMLP). Gezien het feit dat de expressie van CD66b afnam na toevoeging van een oxidatieve stress 'scavenger' (wegvanger), is aannemelijk gemaakt dat deze expressie oxidatieve stressafhankelijk is. Tenslotte, door gebruikmaking van stabiele isotopen lieten wij zien dat postprandiale leukocyten zich verrijkten met uit een maaltijd afgeleide vetzuren en dat leukocyten, en in het bijzonder neutrofiële granulocyten in staat zijn om apolipoproteïne (apo)B te binden. Al deze data laten zien dat acute hypertriglyceridemie een activator is van leukocyten door directe interactie tussen TRL's en leukocyten, en opname van vetzuren. Verrassend was dat acute hyperglycemie (15 minuten) niet resulteerde in een verhoogde expressie van de leukocytenactivatiemarkers in onze *ex vivo* experimenten. TG zijn dus potentere activatoren voor leukocyten dan glucose, zeker in de acute postprandiale fase.

Patiënten met familiale hypercholesterolemie (FH) en familiair gecombineerde hyperlipidemie (FGH) hebben ten opzichte van gezonde mensen verhoogde leukocytenactivatiemarkers en oxidatieve stress-status. Deze pro-inflammatoire situatie is toegeschreven aan hun dyslipidemie en is geassocieerd met atherosclerose. De effecten van glucose op leukocytenactivatiestatus in deze patiënten is niet eerder onderzocht. In **hoofdstuk I-b** laten wij zien dat na een orale glucose tolerantietest (OGTT), patiënten met FH en FGH significant hogere glucosewaarden hebben dan gezonde vrijwilligers. De 2-uurs post-OGTT leukocytenactivatiestatus (monocyt CD11b en neutrofiële granulocyt CD11b en CD66b) uitgedrukt in 'incremental area under the curve' (dAUC) liet persisterende activatie zien in FH- en FGH-patiënten, terwijl gezonde vrijwilligers een daling hadden van ten minste 2 keer de uitgangswaarde. Er was een consistente positieve correlatie tussen postprandiale leukocytenactivatiestatus en glucose-excursies. Onze data suggereren dat de verschillen mogelijk kunnen worden verklaard door een efficiëntere postprandiale glucosemetabolisme in controles ten opzichte van FH- en FGH-patiënten. Deze data waren onverwacht gezien het feit dat glucosemetabolisme in FH-patiënten 'normaal' werd geacht. In FGH-patiënten zijn de data overigens minder verbazend omdat deze patiënten te boek staan als insulineresistent. Het is verder onduidelijk of het verbeteren van insulineresistentie in deze patiënten ook een gunstiger effect heeft op de leukocytenactivatiestatus. Wij speculeren dat persisterende leukocytenactivatie door glucose een bijdragende factor is voor de verhoogde cardiovasculaire risico in patiënten met FH en FGH.

ApoB48 is het unieke eiwit van de vanuit het intestinale systeem afkomstige TRL's en dient als de marker van chylomicronen en hun overblijfselen (remnants). Verhoogde nuchtere waarden van deze apolipoproteïnen zouden een inefficiënte metabolisme van TRL's (of intestinale overproductie van chylomicronen) kunnen suggereren. Dit leidt tot verhoogde productie van chylomicronenremnants die geassocieerd zijn met atherosclerose. In **hoofdstuk I-c** werd de geschiktheid van nuchtere apoB48 als marker van subklinische marker voor atherosclerose

bepaald in verschillende groepen patiënten in relatie tot gezonde vrijwilligers. De patiëntengroepen bestonden uit mensen met FH, FGH, T2DM en coronairlijden (CAD). Ook werd een groep mensen toegevoegd die zowel T2DM als CAD hadden. Intima-media dikte (IMT) van arteria carotis werd gebruikt om subklinische atherosclerose te kwantificeren. Ondanks het gebruik van lipidenverlagende middelen werd de hoogste apoB48-waarde gevonden in FGH-patiënten en in patiënten met zowel T2DM als CAD. Dit terwijl de andere waarden van lipiden (totaal cholesterol, LDL, HDL, TG, totaal apoB en apoA1) niet verschilden tussen de groepen. Zoals verwacht werden geen correlaties gevonden tussen de lipidenwaarden, inclusief apoB48, en IMT in de totale groep. Echter, na exclusie van patiënten die lipidenverlagende middelen gebruikten, werd de sterkste correlatie gevonden tussen IMT en apoB48 ($r=0.52$, $P<0.001$), terwijl we geen correlatie vonden tussen totaal apoB en IMT. Dus, bij mensen die geen lipidenverlagende middelen gebruiken, zou nuchtere apoB48-bepaling ons kunnen helpen in het herkennen van patiënten met een verhoogd risico op CAD. Ondanks het feit dat er grote prospectieve studies nodig zijn om definitieve conclusies te kunnen trekken, speculeren wij dat apoB48 gebruikt kan worden in de klinische praktijk voor patiënten die gescreend worden voor CAD.

Zoals eerder beschreven is leukocytenactivatie essentieel in atherosclerose. **Deel II** beschrijft verschillen in leukocytenactivatiemarkers tussen mannen en vrouwen en in verschillende vasculaire compartimenten. Verder wordt de rol van leukocytenactivatie als voorspeller van CAD onderzocht. In **hoofdstuk II-a** laten wij zien dat vrouwen met CAD een lagere leukocytenactivatiestatus hebben dan mannen met CAD, terwijl we geen verschillen vonden tussen mannen en vrouwen zonder CAD. Vrouwen met CAD lieten tevens lagere leukocytenactivatiestatus zien dan vrouwen zonder CAD. Deze verschillen werden niet gevonden tussen mannen met en zonder CAD. Wij konden geen relaties vinden tussen de leukocytenactivatiemarkers en het gebruik van medicatie of de ernst van CAD. De variabele die het duidelijkst geassocieerd was met deze markers was plasma TG, maar alleen in mannen. Ook werden, alleen in mannen, positieve correlaties gevonden met apoB en totaal cholesterol, en negatieve correlatie met HDL. Het feit dat deze klassieke risicofactoren geen correlaties tonen met leukocytenactivatiemarkers in vrouwen is illustratief en suggereert dat andere, nog niet gevonden, factoren de leukocyten in vrouwen beïnvloeden. Gezien het feit dat er geen relatie bestaat tussen de markers en de ernst van CAD, weten we ook niet of een lagere leukocytenactivatiestatus bij vrouwen goed of slecht is. Echter, dit hypothese genererende onderzoek suggereert dat het pad richting atherosclerose voor vrouwen, op zijn minst, minder leukocytenafhankelijk is dan bij mannen. Grotere prospectieve onderzoeken zijn nodig om de verschillen tussen mannen en vrouwen in leukocytenactivatie en atherogenese te onderzoeken.

Atherosclerose wordt gezien als een gegeneraliseerde ontstekingsfenomeen. Echter, er komt meer bewijs dat suggereert dat er ook gelokaliseerde ontsteking is met een voorkeur voor specifieke plaatsen in het bloedvatensysteem. Zo is er in het verleden aangetoond dat de expressie

van monocyt en neutrofiële granulocyt CD11b en myeloperoxidase (MPO) uit de neutrofiële granulocyt verhoogd is in de coronairen ter hoogte van de 'kwetsbare' plaques in patiënten met instabiele angina pectoris. In patiënten met stabiele angina pectoris zijn deze verschillen nog niet aangetoond. In **hoofdstuk II-b** hebben wij de verschillen in leukocytenactivatiestatus onderzocht op vijf verschillende plaatsen in het vaatbed (perifere vene van de arm, arteria femoralis, aorta abdominalis en de linker (hoofdstam) en rechter coronairarterie) in mensen met en zonder stabiele CAD. Tevens hebben wij de expressie van mRNA van ontstekingsgenen betrokken bij processen in atherosclerose onderzocht door gebruik te maken van 'microarray' analyse. De patiënten met CAD waren onder standaard cardiovasculaire therapie en hun totaal cholesterol, LDL en totaal apoB waren zelfs lager dan die van de controlegroep. Wij vonden dat MPO een hogere activatiegraad had in patiënten met CAD dan in controles in alle onderzochte plaatsen. Andere leukocytenactivatiemarkers lieten deze verschillen niet zien. Verder was er een gradiënt van verhoogde ontsteking vanaf perifeer richting de coronairen voor MPO in beide groepen. Microarray analyse liet een 'up-regulatie' zien van genen die geassocieerd zijn met endotheeldysfunctie, glad spierweefselproliferatie, en in het bijzonder, de macrofaag receptor-gen in patiënten met CAD ten opzichte van controles. Derhalve speculeren wij dat zelfs stabiele patiënten met CAD onder standaard cardiovasculaire therapie een hogere up-regulatie hebben van ontstekingsfactoren betrokken bij verschillende stappen in het atherosclerotische proces, van de initiatie tot macrofaagformatie, endotheeldysfunctie en uiteindelijk glad spierweefselproliferatie. Deze data kunnen, op zijn minst deels, verklaren waarom patiënten met pre-existente CAD onder standaard therapie nog steeds hogere kans hebben op het krijgen van nieuwe CVZ dan gezonde mensen. Terwijl vele risicofactoren redelijk goed onder controle waren in deze patiënten, was het atherosclerotische proces actief. De vraag is dan ook hoe we deze pro-atherogene situatie kunnen beïnvloeden richting een 'normale' situatie. Om dit doel te bereiken moet eerst een andere vraag worden beantwoord: welke exacte factoren zijn hoofdzakelijk verantwoordelijk en kunnen deze pro-ontstekings/atherosclerotische processen negatief beïnvloeden?

In de afgelopen jaren is er veel aandacht besteed aan specifieke markers die het optreden van toekomstige CAD of HVZ kunnen voorspellen. De meeste aandacht ging uit naar ontstekingsmarkers zoals C-reactive protein (CRP). Echter, er zijn geen studies gedaan naar de rol van leukocytenactivatiemarkers als voorspellers van toekomstige CVZ. **Hoofdstuk II-c** toont een prospectieve follow-up studie die de voorspellende waarde voor toekomstige CVZ evalueert van leukocytenactivatiemarkers ten opzichte van andere ontstekingsfactoren en cardiovasculaire variabelen in mensen met en zonder CAD. Na een follow-up van (gemiddeld \pm SEM) 2.0 \pm 0.03 jaren, hebben wij met behulp van logistische regressieanalyse laten zien dat pre-existente CAD, monocyt CD11b expressie en systolische bloeddruk de determinanten zijn van toekomstige CVZ in de gehele groep. In patiënten met CAD onder standaard therapie was monocyt CD11b expressie de enige voorspeller van CVZ. De activatie van monocyten is dus niet alleen een

initiator van atherosclerose, maar het is ook belangrijk in de progressie ervan. We moeten ons wel realiseren dat onze studie niet genoeg power had om andere ontstekingsvariabelen als voorspeller aan het licht te brengen. Grotere studies met voldoende power zijn nodig om goede vergelijkingen te kunnen maken.

In de laatste decade is er ook een andere ontstekingselement geweest die veelal is geassocieerd met atherosclerose. Dit is het complementsysteem. De centrale component van het complementsysteem, complement component 3 (C3), is geassocieerd met CAD, insuline resistentie, obesitas, verhoogde nuchtere en postprandiale TG en gestoorde postprandiale vrije vetzuurmetabolisme. Deze associaties gaan verder dan alleen atheroomvorming door ontstekingsprocessen. Inderdaad is er bewijs suggererend dat het complement systeem betrokken is bij het metabolisme van apoB-bevattende lipoproteïnen.

Mannose bindend lectine (MBL) is de sleutelfactor in de lectineroute van het complement systeem. Deze route is een van de drie gekende routes van het complement systeem. Mutaties in het MBL2 gen, resulterend in een verlaagde activiteit, zijn geassocieerd met atherosclerose. Ook verhoogde waarden van MBL zijn geassocieerd met atherosclerose. **Deel III** van dit proefschrift beschrijft de rol van MBL in TRL-metabolisme en in de progressie van atherosclerose, en postuleert een nieuwe TRL transport-route door binding van TRL-MBL.

Omdat de 'missing link' tussen complement en postprandiale hyperlipidemie MBL kan zijn, hebben wij in **hoofdstuk III-a** onderzocht of er verschillen waren in postprandiale TRL-metabolisme tussen MBL-deficiënte en sufficiënte mensen. OVBT in MBL-deficiënte en sufficiënte mensen liet vergelijkbare concentraties van postprandiale TG, vrije vetzuren, hydroxyboterzuren en C3 zien. Echter, MBL-deficiënte mensen hadden 2.4 maal lagere postprandiale Sf>400(chylomicronen)-apoB48 concentraties, maar ook een 2-3.5 maal hogere Sf 60-400(VLDL1-TG) en Sf 60-400-apoB100 respons dan MBL-sufficiënte mensen. De activiteit van MBL was omgekeerd gerelateerd aan de postprandiale stijging in Sf 60-400-TG. Onze data suggereren dat MBL-deficiënte mensen een verhoogde postprandiale Sf 60-400 lipoproteïnen hebben die meer atherogeen zijn dan Sf>400(chylomicronen)-apoB48. Wij postuleren dat deze subtiele verschillen in postprandiale TRL-metabolisme, deels de neiging tot meer atherosclerose in MBL-deficiënte mensen kunnen verklaren.

In **hoofdstuk III-b** hebben wij onderzocht of MBL2 haplotypes corresponderend met lage, intermediaire en hoge MBL-productie ook geassocieerd zijn met de *progressie* van het atherosclerotische proces. Dat proces werd uitgedrukt in angiografische progressie van coronaire atherosclerose tijdens de behandeling met pravastatine in de REGRESS cohort, een placebo-gecontroleerde 2-jaars interventiestudie in mannen met bewezen CAD. Wij vonden dat geen enkele MBL2 haplotype geassocieerd was met de progressie van coronaire atherosclerose. Verder speelden MBL2 haplotypes geen rol bij de progressie van het atherosclerotisch lijden tijdens de behandeling met pravastatine. Ondanks het feit dat de literatuur een relatie laat zien

tussen MBL en atherogenese, hebben wij geen associatie gevonden tussen MBL en de *progressie* van het atherosclerotisch lijden in mannen met bewezen CAD.

Zoals eerder beschreven lijkt er een relatie te zijn tussen het complement systeem en TRLs. De binding van LDL en andere apoB-bevattende lipoproteïnen aan de leukocyten is eerder beschreven (hoofdstuk I-a). Ongeveer 30 jaar geleden werd de binding van deze partikels aan erythrocyten ook gesuggereerd. Men heeft laten zien dat het cholesterolgehalte van de membraan van erythrocyten meer dan 2 maal hoger is in patiënten met acute coronaire syndromen dan in patiënten met stabiele angina pectoris. **Hoofdstuk III-c** lanceert een nieuwe concept voor het transport van apoB-bevattende lipoproteïnen in de bloedbaan. Voorlopige data van onze groep suggereren dat mensen met CAD een lagere signaal hebben van apoB op erythrocyten dan mensen zonder CAD. Omdat erythrocyten geen LDL-receptor met zich meedragen, hebben wij de hypothese gepostuleerd dat complement receptor 1 (CR1) deze binding faciliteert. Gezien het feit dat complementactivatie alleen kan geschieden op eiwitten en glycoproteïnen stellen wij voor dat bepaalde suikers op het oppervlak van apoB-bevattende lipoproteïnen deze binding mogelijk kunnen maken. De klinische consequentie hiervan is in theorie dat de binding van apoB-bevattende lipoproteïnen aan erythrocyten de interactie tussen het endotheel en deze atherogene partikels blokkeert en dat dit dus een anti-atherogene mechanisme kan zijn.

TOEKOMSTPERSPECTIEVEN

Binding van leukocyten aan het endotheel is een eerste vereiste voor de ontwikkeling van atherosclerose. Zoals getoond in deel I is de binding en opsonisatie van TRLs aan en door leukocyten, specifiek in de postprandiale situatie, een van de eerste gebeurtenissen in de activatie van monocyten en neutrofile granulocyten. Gelijktijdige activatie van endotheelcellen zou ook kunnen geschieden, hetgeen dit proces dat in de bloedbaan ontstaat, de eerste stap maakt in de route naar atherosclerose. Dit is in contrast met de klassieke hypothese dat atherosclerose start met de migratie van LDL en TRL-remnants naar het sub-endotheliale ruimte. Omdat we de 'ware' binding tussen de geactiveerde leukocyten en het endotheel niet hebben onderzocht, zou dit de volgende stap zijn. In het licht van verhoogde activatie van MPO in de coronairen zou het nog interessanter zijn om te evalueren of geactiveerde leukocyten meer binding vertonen op plaatsen met hoge 'shear stress' (afschuifspanning) zoals in de coronairen. Gezien het feit dat er ook verschillen zijn in leukocytenactivatiestatus tussen mannen en vrouwen zou het ook interessant zijn om de verschillen in specifieke leukocyten-endotheel binding tussen mannen en vrouwen te onderzoeken.

Een andere factor die meer exploratie verdient is het verschil in tussen TRLs en glucose in hun vermogen om leukocytenactivatie te bewerkstelligen. Directe *in vivo* vergelijkingen,

bijvoorbeeld door gebruik te maken van orale vetbelastingstesten versus glucosebelastingstesten, zouden de verschillen beter kunnen onthullen. Verder zijn er specifieke interventies nodig om deze postprandiale veranderingen te moduleren.

Leukocytenactivatiemarkers in de klinische setting zouden ook meer moeten worden geëvalueerd. Daarvoor hebben wij grote epidemiologische follow-up studies nodig met genoeg power om te kunnen detecteren of deze markers geschikte concurrenten zijn voor andere parameters zoals CRP en C3. Tenslotte zou de rol van leukocytenactivatiemarkers in andere inflammatoire ziekten zoals reumatoïde artritis die op zijn beurt ook is geassocieerd met atherosclerose, kunnen worden onderzocht.

MBL was een andere onderwerp in dit proefschrift. Zoals eerder beschreven is de postprandiale fase gerelateerd aan complementactivatie. Het zou interessant zijn om het moleculaire mechanisme achter de activatie van complement door TRLs te weten te komen. Voorlopige data van onze groep laten zien dat apoB kan binden aan zowel leukocyten als erythrocyten. Omdat MBL-deficiëntie een meer atherogene postprandiale TRL-patroon lijkt te scheppen, postuleren wij dat MBL een sleutelrol speelt in de activatie van complement door apoB-TRLs. Deze studies, inclusief de klinische significantie ervan, zijn op dit moment gaande.

