



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Novel modulators of lipoprotein metabolism : implications for steatohepatitis and atherosclerosis

Wang, Y.

Citation

Wang, Y. (2013, November 6). *Novel modulators of lipoprotein metabolism : implications for steatohepatitis and atherosclerosis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/22160>

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/1887/22160>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/22160> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Wang, Yanan

Title: Novel modulators of lipoprotein metabolism : implications for steatohepatitis and atherosclerosis

Issue Date: 2013-11-06

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Atherosclerose en non-alcoholische steatohepatitis (NASH) zijn de voornaamste oorzaken van respectievelijk hart- en vaatziekten (HVZ) en chronische leverziekte. Dit zijn beide belangrijke factoren voor morbiditeit en mortaliteit in de westerse wereld. Atherosclerose en NASH delen een vergelijkbare etiologie, waarbij een verstoord vetmetabolisme de belangrijkste factor is. Dit komt tot uiting door dyslipidemie, gekenmerkt door verhoogde plasmaniveaus van (V)LDL-cholesterol (C) en van triglyceriden (TG), en een verlaagd plasmaniveau van HDL-C. Lipidenverlagende geneesmiddelen die dyslipidemie verbeteren zijn effectieve middelen om atherosclerose te voorkomen en behandelen. Echter, omdat de mortaliteit en morbiditeit geassocieerd met HVZ slechts gedeeltelijk worden verbeterd door de huidige lipidenverlagende strategieën zijn momenteel nieuwe strategieën in ontwikkeling met als doel atherosclerose verder te reduceren. Aangezien het HDL-C niveau omgekeerd gecorreleerd is met het cardiovasculair risico, behoort het verhogen van HDL-C tot deze nieuwe strategieën. Omdat er nog geen farmacologische middelen zijn geïdentificeerd voor het behandelen van NASH en er nog geen biomarkers beschikbaar zijn om NASH te detecteren, is het ook noodzakelijk te zoeken naar behandelingsstrategieën en biomarkers voor NASH.

Omdat gereconstitueerd HDL (rHDL) een regressie van atherosclerose teweeg bracht in humane studies, lijkt infusie van rHDL, als onderdeel van HDL-verhogende strategieën, veelbelovend voor de behandeling van HVZ. Studies in muizen lieten zien dat rHDL het plasmaniveau van VLDL verhoogde, een effect dat minder duidelijk was in mensen. Dit verschil kan mogelijk verklaard worden door het feit dat de mens, in tegenstelling tot de muis, het cholesteryl ester transfer proteïne (CETP) tot expressie brengt. CETP speelt een belangrijke rol in het lipidenmetabolisme door het faciliteren van de overdracht van de neutrale lipiden triglyceriden (TG) en cholesteryl esters (CE) tussen (V)LDL en HDL. In **hoofdstuk 2** hebben we de rol van CETP in de effecten van rHDL op het VLDL-metabolisme onderzocht in *APOE*3-Leiden (E3L)* en *APOE*3-Leiden.CETP (E3L.CETP)* transgene muizen die uitstekende modellen vormen voor het lipoproteïnenmetabolisme in de mens. Eén uur na injectie verhoogde rHDL de niveaus van VLDL-C en TG in *E3L* muizen, maar niet in *E3L.CETP* muizen. Deze initiële toename in VLDL werd veroorzaakt door competitie tussen rHDL en VLDL voor de lipoproteïne lipase (LPL)-gemedieerde hydrolyse van TG, en werd dus voorkomen door de expressie van CETP. Vierentwintig uur na injectie van rHDL werd een tweede toename in VLDL-C en TG in *E3L* muizen waargenomen, terwijl het VLDL zelfs was verlaagd in *E3L.CETP* muizen. Deze secundaire stijging in VLDL werd veroorzaakt door een verhoogde VLDL-TG productie. Uit deze studie concludeerden wij

dat CETP beschermt tegen de rHDL-geïnduceerde stijging van VLDL en dat behandeling van atherogene dyslipidemie met rHDL niet gecombineerd zou moeten worden met middelen die CETP activiteit op een agressieve manier verlagen.

Thiazolidinediones (PPAR γ agonisten) verlagen het plasma TG niveau, verhogen het plasma HDL-C niveau, en reduceren hepatische steatose. Eerdere studies in muizen hebben aangetoond dat reductie van hepatische steatose door lipidenverlagende middelen samengaat met verlaagde hepatische CETP expressie en een verlaagd plasmaniveau van CETP, wat vervolgens kan leiden tot een verhoging van het HDL-C gehalte. Daarom hebben we in **hoofdstuk 3** het effect van de thiazolidinedione pioglitazon op het CETP niveau in patiënten met type 2 diabetes mellitus (T2DM) onderzocht. Patiënten met T2DM werden gerandomiseerd tot behandeling met pioglitazon of metformine, bovenop behandeling met glimepiride. Aan het begin van de behandeling en na 24 weken behandeling werden de plasmaniveaus van HDL-C en CETP gemeten en werd de hepatische TG inhoud bepaald door middel van proton magnetische resonantie spectroscopie. Pioglitazon verlaagde het hepatische TG gehalte, wat inderdaad geassocieerd was met een verlaagd plasma CETP niveau en een verhoogd plasma HDL-C gehalte, terwijl metformine geen effect had op deze parameters. Wij concludeerden dan ook dat de verlaging van de hepatische TG inhoud door pioglitazon vergezeld ging van een verlaging in plasma CETP concentratie, en daarom geassocieerd was met een verhoging in HDL-C.

12

Bij gebrek aan farmacologische geneesmiddelen, wordt NASH momenteel nog voornamelijk behandeld door aanpassing van gedrag, d.w.z. afvallen en meer bewegen. Recent toonden wij aan dat een zeer laag calorisch dieet (VLCD) gedurende 16 weken het plasma totaal cholesterol (TC) en TG niveau significant verlaagde, en daarbij het hepatisch TG gehalte verlaagde in obese patiënten met T2DM en hepatische steatose. Een mogelijk gunstig effect van een dergelijk VLCD op plasma CETP en HDL niveaus was echter nog niet onderzocht. In **hoofdstuk 4** onderzochten wij de effecten van een VLCD dat resulteerde in een forse verlaging van het hepatische TG gehalte op het plasma CETP en HDL niveau in obese patiënten met T2DM en hepatische steatose. Het VLCD verlaagde de plasma CETP concentratie en verhoogde het plasma apoA1 niveau, zonder een effect te hebben op het plasma HDL-C en HDL-fosfolipidengehalte. Hoewel het VLCD resulteerde in minder gelipideerd HDL was de functionaliteit van het HDL met betrekking tot het induceren van cholesterolflux vanuit macrofagen *in vitro* onveranderd. Wij concludeerden daarom dat de aanzienlijke verlaging van het hepatische TG gehalte door het VLCD vergezeld ging van een verlaging in plasma CETP

concentratie en een stijging in apoA1 niveau, zonder de eigenschappen van het HDL m.b.t. cholesterolefflux te verbeteren.

Niacine (nicotinezuur) is het meest potente HDL-verhogende middel dat in de kliniek wordt toegepast. Naast het verhogen van het HDL-C niveau verlaagt niacine ook het plasmaniveau van proatherogene lipoproteïnen en lipiden waaronder VLDL, LDL en TG. Daarom wordt niacine gezien als een goede kandidaat voor het behandelen van atherosclerose. In *E3L.CETP* muizen verlaagde niacine het hepatische TG gehalte, wat samenging met een verlaging van de hepatische genexpressie en het plasmaniveau van CETP en een verhoging van het HDL-C. In **hoofdstuk 5** hebben we het mechanisme onderzocht waardoor niacine CETP verlaagt door gebruik te maken van transgene muizen die humaan CETP tot expressie brengen. *In vitro* studies toonden aan dat niacine niet direct de CETP expressie in macrofagen verlaagde. *In vivo* studies lieten zien dat niacine in CETP transgene muizen op een westers dieet het hepatische cholesterolgehalte en de ontsteking in de lever verlaagde. Niacine reduceerde ook de hepatische genexpressie van CETP en het plasmaniveau van CETP. Tegelijkertijd verlaagde niacine de hepatische expressie van CD68 en ABCG1 (beide specifieke markers voor de macrofaaginhoud van de lever) als ook het gehalte aan macrofagen in de lever. De hepatische CETP expressie was zelfs significant gecorreleerd met de hepatische macrofaagmarkers. Wij concludeerden dat niacine de hepatische CETP expressie en de plasma CETP concentratie verlaagt door het reduceren van leverontsteking en de macrofaaginhoud van de lever ten gevolge van zijn primaire lipidenverlagende effect, en niet door de expressie van CETP in de macrofaag te verlagen.

Omdat CETP een huidig doel is voor de behandeling van dyslipidemie is het cruciaal om de bron van het CETP in de mens te identificeren. Eerdere studies toonden aan dat CETP vooral gesynthetiseerd wordt in vetweefsel en in de lever. Echter, de relatieve bijdrage van de weefsel specifieke CETP expressie aan het plasma CETP niveau was nog onbekend. Daarom was het doel van **hoofdstuk 6** om de cellulaire bron van CETP op te helderen door gebruik te maken van humane cohorten en *E3L.CETP* muizen. In een algemene populatie, de Rijswijk studie, bleek het plasma CETP niveau niet te correleren met de buikomvang, wat suggereert dat centraal vetweefsel niet bijdraagt aan de plasma CETP pool. Microarray analyse van lever- en vetweefselbiopten van patiënten die bariatrische chirurgie hadden ondergaan, toonden aan dat de CETP expressie in de lever het hoogst was en correleerde met inflammatoire reactiepaden. Via immunohistochemische technieken werd duidelijk dat CETP vooral tot expressie kwam in hepatische macrofagen. De expressie van CETP in de lever, maar niet in

vetweefsel, correleerde positief met het plasma CETP niveau en omgekeerd met het plasma HDL-C niveau. Selectieve eliminatie van macrofagen uit de lever ten opzichte van vetweefsel in *E3L.CETP* muizen deed de CETP expressie nagenoeg teniet in de lever, maar niet in vetweefsel, en leidde tot een sterk verlaagde plasma CETP concentratie en een verhoging van het plasma HDL-C. Behandeling van *E3L.CETP* muizen met lipidenverlagende middelen waarvan bekend is dat zij in de mens de plasma CETP concentratie verlagen en de HDL-C concentratie verhogen, reduceerde de hoeveelheid macrofagen in de lever, verlaagde het plasma CETP niveau en verhoogde het HDL-C. Wij concludeerden dat plasma CETP primair wordt gesynthetiseerd door macrofagen in de lever en dat plasma CETP een biomarker is voor de hoeveelheid macrofagen in de lever, een belangrijke factor van NASH waarvoor nog geen non-invasieve diagnostische middelen voorhanden zijn.

Toenemend bewijs toont aan dat strategieën gericht op het reguleren van de energiehomeostase en voedselopname ook het vetmetabolisme gunstig beïnvloeden en mogelijk zowel atherosclerose als NASH kunnen behandelen. De hersenen spelen een belangrijke rol bij de energiehomeostase, waarbij de belangrijkste rol is weggelegd voor de hypothalamus. Twee belangrijke neuronale populaties in de arcuate nucleus van de hypothalamus zijn betrokken in de regulatie van de voedselinname: de neuronen die het pro-opiomelanocortine/cocaine- and amphetamine-gereguleerde transcript tot expressie brengen, en de neuronen die neuropeptide Y (NPY)/agouti-gerelateerde proteïne tot expressie brengen. Eerdere studies lieten zien dat centrale toediening van NPY de productie van VLDL-TG door de lever verhoogde. In **hoofdstuk 7** wilden we het effect van centraal NPY op de hepatische VLDL-TG productie in muizen valideren om uiteindelijk te onderzoeken of NPY bijdraagt aan de ontwikkeling van atherosclerose door dyslipidemie te induceren. Toediening van NPY in zowel de laterale als derde ventrikel in de hersenen van muizen verhoogde de voedselinname binnen een uur na injectie, maar had geen effect op de hepatische productie van VLDL-TG of VLDL-apoB. Eveneens had het blokkeren van de centrale NPY signalering geen effect op de hepatische VLDL productie. We concludeerden dat acute centrale toediening van NPY in muizen de voedselinname verhoogt net zoals in ratten, maar dat het in tegenstelling tot in ratten de VLDL productie in muizen niet beïnvloedt. Dit diersoortafhankelijke effect met betrekking tot het effect van NPY op de hepatische VLDL-TG productie is van groot belang voor toekomstige studies naar de centrale regulatie van het hepatische VLDL metabolisme.

Studies in mensen suggereerden dat agonisme van de glucagon-like peptide-1 (GLP-

1) receptor niet alleen het energiemetabolisme en het glucosemetabolisme verbetert, maar ook het plasma VLDL niveau verlaagt. Het achterliggende mechanisme van de reductie in het plasma TG was echter nog onbekend. In **hoofdstuk 8** hebben we daarom de effecten onderzocht van GLP-1 receptor agonisme op het TG metabolisme door gebruik te maken van *E3L* muizen die een vetrijk dieet gevoerd werden. Behandeling met de GLP-1 receptor agonisten CNTO3649 en exendin-4 gedurende 4 weken d.m.v. subcutane osmotische minipompjes verbeterde de glucosehuishouding door het plasmaniveau van glucose en insuline in gevaste dieren te verlagen. Daarnaast reduceerden de GLP-1 receptor agonisten ook de hepatische productie van VLDL-TG en VLDL-apoB door een verlaagde productie van VLDL deeltjes en niet door minder lipidatie van apoB. Tegelijkertijd bleek GLP-1 receptor agonisme het hepatische lipidengehalte aanmerkelijk te verlagen. Deze verlaging ging samen met een downregulatie van de expressie van genen die betrokken zijn bij de hepatische lipogenese (*Srebp-1c*, *Fasn*, *Dgat1*) en de apoB synthese (*ApoB*). We concludeerden dat GLP-1 receptor agonisme, naast het verbeteren van de glucosehuishouding, ook in staat is dyslipidemie en hepatische steatose te verbeteren.

Omdat onze studies aantoonde dat exendin-4 het vetmetabolisme verbetert en vetrijk dieet-geïnduceerde hepatische steatose geheel kan voorkomen (hoofdstuk 8) anticipeerden wij dat GLP-1 receptor agonisme mogelijk ook atherosclerose en ziekte gerelateerd aan een vette lever zou kunnen behandelen. Echter, de impact van GLP-1 receptor agonisme op NASH was nog onduidelijk, zeker met betrekking tot het effect op hepatische ontsteking. Omdat de ontwikkeling van atherosclerose en NASH een gemeenschappelijke etiologie delen hebben we in **hoofdstuk 9** het effect van exendin-4 op de ontwikkeling van atherosclerose en NASH tegelijkertijd onderzocht door wederom gebruik te maken van *E3L.CETP* muizen op een westers dieet. Hoewel vier weken behandeling met exendin-4 slechts een lichte verlaging veroorzaakte van het plasmaniveau van lipiden en lipoproteïnen, bracht het een aanzienlijke verlaging teweeg in de mate en ernst van atherosclerose, vergezeld van een reductie in de adhesie van monocytten aan de vaatwand en het macrofaaggehalte in de atherosclerotische plaques. Exendin-4 bleek ook de hoeveelheid cholesterol en CD68⁺ en F4/80⁺ macrofagen in de lever te verlagen, wat aangeeft dat exendin-4 de dieet-geïnduceerde ontwikkeling van NASH remt. Dit ging samen met een verlaagde aantrekking van monocytten uit het bloed aangezien de hoeveelheid Mac-1⁺ macrofagen in de lever was verlaagd. Tenslotte reduceerde exendin-4 de expressie van chemokines *in vivo* en onderdrukte het de stapeling van oxLDL in peritoneale macrofagen *in vitro* afhankelijk van de GLP-1 receptor, wat suggereert dat exendin-4 zowel atherosclerose als NASH

vermindert door verlaagde aantrekking/activatie van macrofagen uit het bloed. Wij concludeerden dan ook dat GLP-1 receptor agonisme een waardevolle strategie zou kunnen zijn om naast T2DM ook atherosclerose en NASH te behandelen, met name in patiënten die lijden aan een combinatie van deze ziekten.

Naast lipidenverlagende strategieën zijn ook anti-inflammatoire strategieën in ontwikkeling voor het verlagen van het risico op HVZ. Glucocorticoïden hebben een sterk anti-inflammatoir karakter en worden extensief toegepast in de klinische praktijk als immunosuppressiva. Echter, een overmaat aan glucocorticoïden kan ook negatieve metabole effecten veroorzaken in vetweefsel, zoals centrale obesitas en insulineresistentie, die de mogelijke beschermende effecten van glucocorticoïden op HVZ kunnen tegengaan. In **hoofdstuk 10** onderzochten we de effecten van tijdelijke en continue behandeling met glucocorticoïden op de ontwikkeling van atherosclerose door gebruik te maken van *E3L.CETP* muizen op een westers dieet. Hoewel behandeling met corticosteron (CORT) gedurende 5 weken ('tijdelijk') en 14 weken ('continu') het lichaamsgewicht en de voedselinname deed toenemen gedurende de duur van de interventie, induceerde alleen continue behandeling met CORT een lager bijniorgewicht en hoger gewicht van gonadale en subcutane vetkussens na 17 weken. Bovendien nam de insulinespiegel en HOMA-IR index toe in de muizen die continu werden behandeld met CORT, wat erop duidt dat langdurige toediening van glucocorticoïden insulineresistentie induceert. Het was opvallend dat zowel tijdelijke als continue behandeling met CORT na 17 weken atherosclerose in gelijke mate deden afnemen zonder een effect te hebben op het plasmaniveau van lipiden en lipoproteïnen. Deze reductie in plaquegrootte ging vergezeld van een verlaagde hoeveelheid macrofagen in de atherosclerotische plaque. Wij concludeerden dat behandeling met CORT langdurige gunstige effecten heeft op de ontwikkeling van atherosclerose. In de klinische praktijk zouden anti-inflammatoire strategieën met glucocorticoïden dus aangepast kunnen worden van langdurende behandeling met een lage dosis naar kortdurende behandeling met een hoge dosis.

Samenvattend kan gezegd worden dat de studies die beschreven staan in dit proefschrift hebben bijgedragen aan de identificatie van CETP als een biomarker voor de hoeveelheid macrofagen in de lever, een belangrijke factor in NASH waarvoor nog geen non-invasieve diagnostische middelen voorhanden waren, en aan de identificatie van mogelijk nieuwe therapeutische handvatten voor atherosclerose en NASH. Allereerst verkregen we meer inzicht in de cellulaire bron van CETP (de macrofaag in de lever) en het mechanisme waardoor HDL-verhogende geneesmiddelen de plasma CETP concentratie verlagen (door het aantal macrofagen in de lever te verlagen). We waren

in staat de associatie tussen de reductie van de hepatische lipidenconcentratie en de plasma CETP concentratie na lipidenverlagende interventies te vertalen van de muis naar de mens. Ook toonden we de rol aan van CETP in de divergerende effecten van rHDL op het VLDL metabolisme in de muis en in de mens, en onthulden een verschil in de centrale regulatie van de hepatische VLDL productie tussen muizen en ratten. Deze bevinding onderstreept een algemene bezorgdheid over dierproefonderzoek met betrekking tot extrapolatie van bevindingen van specifieke dierstudies om observaties in mensen te verklaren. Eveneens toonden we aan dat CORT langdurige gunstige effecten heeft op de ontwikkeling van atherosclerose, wat een mogelijke toepassing van anti-inflammatoire strategieën in HVZ onderstreept. Tenslotte beschreven we continue GLP-1 receptor agonisme als een nieuwe strategie om zowel het lipidenmetabolisme als leverontsteking positief te beïnvloeden, wat kan resulteren in nieuwe strategieën om zowel atherosclerose als NASH te bestrijden.

