



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Chemokines in atherosclerotic lesion development and stability : from mice to man

Jager, S.C.A. de

Citation

Jager, S. C. A. de. (2008, October 23). *Chemokines in atherosclerotic lesion development and stability : from mice to man*. Faculty of Science, Leiden University|Department of Biopharmaceutics, Leiden Amsterdam Center for Drug Research. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13158>

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/1887/13158>

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

NL

Nederlandse Samenvatting



Cardiovasculaire ziekten zijn de belangrijkste doodsoorzaak in de westelijke wereld en manifesteren zich voornamelijk als een hartinfarct en beroerte. Hartinfarcten en beroertes zijn vaak het gevolg van een dichtslibbing van de (middel)grote slagaders, ook wel aderverkalking of atherosclerose genoemd.

De bekendste risicofactoren voor het ontstaan van aderverkalking zijn een vetrijk dieet, hoge bloeddruk en suikerziekte. Daarnaast kunnen diverse andere factoren zoals roken, zwaarlijvigheid, spanning en fysieke inactiviteit de ontwikkeling van atherosclerose versterken. Behandeling van aderverkalking patienten met behulp van medicatie berust met name op verlaging van het cholesterol niveau en de bloeddruk. Desondanks is vaak ook chirurgische interventie door middel van bijvoorbeeld ballon-dilatatie (*dotteren*), soms in combinatie met plaatsing van een metalen buisje in het verkalkte bloedvat (*stent*) of van een omleiding (*bypass chirurgie*), vereist om de belemmerde bloedstroom te herstellen.

Over het algemeen wordt atherosclerose beschouwd als een progressieve ziekte. Atherosclerose ontstaat na beschadiging van de bloedvatwand, de endotheellaag, als gevolg waarvan witte bloedlichaampjes (*leukocyten*) aan de endotheellaag kunnen hechten, om zich hier vervolgens doorheen te dringen en zich in de vaatwand op te hopen. Deze leukocyten kunnen vetten, zoals cholesterol, dat ook door het endotheel heen gedrongen is, opnemen en onder invloed van ontstekingsmediatoren uitgroeien tot zogenaamde 'schuimcellen': het beginstadium van de atherosclerotische plaque. Als reactie op de sterke ophoping van vetmateriaal en schuimcellen in de bloedvatwand bewegen gladde spiercellen vanuit de wand naar de endotheellaag om daar, in combinatie met bindweefsel en collageen, een beschermend kapsel te vormen. Gedurende de verdere ontwikkeling van atherosclerose kan de balans tussen de structuurloze/vloeibare vetdeposities en de stevigheid van het kapsel verstoord raken waardoor het kapsel kan scheuren. Dit gebeurt meestal in de wat zwakkere 'schouder' regio van de plaque, welke is blootgesteld aan de sterkste mechanische krachten. In het geval van een scheur (*ruptuur*) in het kapsel zal de inhoud van de plaque aan het bloed worden blootgesteld, waardoor de bloedstolling in gang wordt gezet en er een bloedprop ontstaat. Tengevolge hiervan kan het bloedvat totaal afgesloten worden, waardoor het achterliggende weefsel verstoken blijft van voedingsstoffen en zuurstofrijk bloed met een hart- of herseninfarct als gevolg.

Atherosclerose wordt de laatste jaren niet alleen als een vet opstapelingsziekte gezien maar ook als een chronische ontstekingsziekte. De eerste aanwijzingen hiervoor werden verkregen uit pathologie studies waarin de aanwezigheid van ontstekingscellen in de plaque werd aangetoond. Een van de belangrijkste cellen in de initiatie en de ontwikkeling van atherosclerose is de macrofaag. Macrofagen spelen een belangrijke rol in afweer en immuunreacties tegen ziekteverwekkers zoals bacteriën, virussen, en parasieten. Macrofagen in de plaque worden na opname van vetten sterk geactiveerd en deponeren als gevolg hiervan verschillende ontstekingsmediatoren in de plaque. De verplaatsing van leukocyten uit de bloedsomloop naar de atherosclerotische plaque verloopt niet willekeurig maar wordt gedirigeerd door een specifieke klasse van eiwitten, de chemokines.

Chemokines maken deel uit van een grote familie van ontstekings eiwitten, de cytokinen. Chemokines hebben echter de specifieke eigenschap om leukocyten aan te trekken naar de ontstekingshaard een proces dat ook wel 'chemotaxis' genoemd wordt. Chemokines zijn oorspronkelijk ingedeeld in vier families op basis van hun structurele samenstelling (C, CC, CXC en CX3C chemokines). Daarnaast kunnen chemokines ook functioneel worden geclassificeerd als stabiliserende (*homeostatisch*) of ontstekings (*inflammatoire*) chemokines. Vooral de inflammatoire chemokines reguleren de rekrutering van leukocyten naar de ontsteking. Chemokines worden door veel celtypen uitgescheiden, zoals endotheel cellen, gladde spiercellen, bloedplaatjes, mestcellen, macro-

fagen en lymfocyten. Chemokines binden specifiek aan G eiwit gekoppelde receptoren (GPCR). Na binding van het chemokine aan de desbetreffende receptor treden er in de celskelet veranderingen op waardoor de cel mobiel wordt en zich richting een ontstekingshaard gaat bewegen.

In dit proefschrift wordt de zoektocht beschreven naar chemokine of chemokine patronen die karakteristiek zijn voor patiënten met hart- en vaatziekten. Tevens wordt onderzocht in hoeverre de ontwikkeling van atherosclerose geremd kan worden door correctie/modulatie van de activiteit van een aantal chemokines of verwante eiwitten in een muismodel voor atherosclerose. In Hoofdstukken 3 en 4 zijn bloedmonsters van patiënten uit twee verschillende populaties, die leiden aan een acuut hartinfarct dan wel aan hartkramp (*angina pectoris*), geanalyseerd op het chemokineprofiel. Binnen de acute hartinfarct populatie bleek met name het chemokine CCL3 sterk verhoogd ten opzichte van gezonde individuen. Deze verhoging werd ook gevonden in patiënten met *angina pectoris*. Daarnaast was de hoeveelheid CCL3 in de bloedsomloop tevens een indicatie voor het risico op toekomstige acute hart- en vaatandoeningen. Binnen de patiëntengroep met *angina pectoris* kan een onderscheid gemaakt worden tussen patiënten die na behandeling in het ziekenhuis stabiel zijn en geen klinische symptomen meer ervaren, dan wel patiënten die opnieuw klachten van vaatvernauwing ondervinden. Deze laatste groep vertoont een verhoogd gehalte van de chemokines CCL5 en CCL18 in de bloedsomloop. Daarnaast bleek vooral CCL18 een sterke voor-speller voor het opnieuw optreden van vaatvernauwing. Mogelijkerwijs zijn de drie hierboven beschreven chemokines niet alleen interessante kandidaten voor de vroege diagnose van toekomstige aandoeningen, maar ook voor therapeutische behandeling het acute hartinfarct.

Voor één van de chemokines die in de patiënten studies verhoogd werd aangetroffen, CCL3, is in Hoofdstuk 5 de bijdrage aan atherosclerose bestudeerd. CCL3 is een ontstekingschemokine dat ook als macrofaag ontstekings eiwit 1 alfa (MIP1 α) bekend staat. CCL3 wordt met name geproduceerd door macrofagen, lymfocyten en mestcellen. CCL3 bindt aan drie verschillende chemokinereceptoren, CCR1, CCR3 en CCR5. Allereerst is bepaald in welke fase van atherosclerose CCL3 het sterkst wordt geproduceerd. Analyse van het tijdsprofiel van CCL3 productie liet duidelijk zien dat CCL3 met name belangrijk is in de ontstekingsfase van atherosclerose. Om de rol te van CCL3 te kunnen bepalen hebben we een beenmergtransplantatie (BMT) uitgevoerd, waarbij het beenmerg van een CCL3 deficiënte muis getransplanteerd is naar een LDL receptor deficiënte ontvangermuis (LDLr^{-/-}) waarvan het eigen beenmerg door bestraling is verwijderd. De circulerende leukocyten in deze getransplanteerde ontvangermuis zullen daardoor geen CCL3 meer kunnen produceren. Door de afwezigheid van de LDL receptor ontwikkelen deze muizen, wanneer ze geplaatst worden op een vetrijk dieet, spontaan atherosclerose. Nadat het donorbeenmerg zich volledig heeft genesteld in het beenmerg van de ontvanger zijn de dieren op een vetrijk dieet geplaatst. Na 12 weken van vetrijk dieet is de hoeveelheid ontstane atherosclerose geanalyseerd in de aortaboog van deze muizen. De afwezigheid van CCL3 leidde tot een aanzienlijke remming van de ontwikkeling van atherosclerose. Verdere analyse van de plaque liet zien dat zowel het aantal macrofagen als het aantal lymfocyten in de plaque ongewijzigd was, terwijl het aantal neutrofielen significant lager was. De exacte bijdrage van neutrofielen aan atherosclerose is nog niet bekend. Recentelijk is echter gesuggereerd dat een verhoogde migratie van neutrofielen naar de plaque de ontwikkeling hiervan versneld. Analyse van het aantal neutrofielen in de bloedsomloop suggereert dat CCL3 alleen belangrijk is voor neutrofielmigratie onder condities van ontsteking. Concluderend zouden we kunnen stellen dat CCL3 afkomstig van de plaque ervoor zorgt dat meer neutrofielen in de plaque ophopen hetgeen gepaard gaat met een versnelde atherosclerose ontwikkeling en mogelijk zelfs een destabilisatie van de plaque.

Chemokine receptor CXCR3 staat bekend om zijn rol in lymfocyt migratie naar

ontstekingshaarden en het lymfatisch stelsel. In Hoofdstuk 6 werd een specifieke blokker van CXCR3 signalering, de antagonist NBI-74330, gebruikt om de rol van CXCR3 in atherosclerose en met name in lymfocyt chemotaxie vast te stellen. LDL receptor deficiënte muizen werden dagelijks behandeld met NBI-74330 gedurende het volledige experiment. In dit experiment werd bij de dieren een licht afsluitend manchet (*collar*) om beide halsslagaders geplaatst, waardoor direct stroomopwaarts van dit manchet zeer snel atherosclerose ontstaat. Remming van CXCR3 resulteerde in significant kleinere atherosclerotische plaques, zowel in manchet-geïnduceerde als spontane atherosclerose in de aorta. Deze remming was met name te wijten aan een verminderde migratie van macrofagen en T-cellen naar de plaque. Naast een verminderde T-cel migratie was de samenstelling van de T-cel populatie verschoven van een meer ontstekings-bevorderend naar een ontstekingsregulerend type. Samenvattend hebben we vastgesteld dat het stilleggen van CXCR3 de vorming van atherosclerose remt door een geremde chemotaxie en een verminderde lokale ontsteking.

In Hoofdstuk 7 wordt de rol van een groeifactor, het zogenaamde macrofaag remmend cytokine-1 (MIC-1), in vroege atherogenese en in plaquestabiliteit bestudeerd. MIC-1 staat bekend als een onafhankelijke risicofactor voor acute hart- en vaatziekten en is prominent aanwezig in macrofagen in de plaque. Voor deze studie gebruikten wij een beenmergtransplantatiestrategie, waardoor de leukocyten in de bloedsomloop niet meer in staat zijn MIC-1 te produceren. De afwezigheid van MIC-1 resulteerde in de remming van hele vroege plaques, maar had geen effect op rijpe plaques. Ondanks dat het totale oppervlak van deze late, rijpe plaques ongewijzigd bleef, was de plaque van samenstelling veranderd met kenmerken van een meer stabiele plaque. Plaques uit MIC-1 deficiënte ontvangermuizen bevatten minder macrofagen, maar meer collageen, hetgeen duidt op een verhoogde stabiliteit. In overeenstemming hiermee, bleek ook de hoeveelheid dood celmateriaal, zowel ontstaan uit spontane (necrose) als uit geprogrammeerde celdood (apoptose), significant verminderd. Experimenten in de reageerbuis (*in vitro*) hebben aangetoond dat MIC-1 de gevoeligheid van macrofagen voor CCR2 afhankelijke migratie moduleert. Verder werd aangetoond dat MIC-1 de celdeling van macrofagen kan beïnvloeden, maar geen geprogrammeerde celdood veroorzaakt. Vanwege de plaque destabiliserende effecten van MIC-1 zou medicamenteuze remming van MIC-1 in angina pectoris patiënten kunnen leiden tot een verdere stabilisering van de plaque en het uitblijven van een infarct.

Als beschermingsmechanisme van het lichaam bestaan er verschillende eiwitten die de signaaloverdracht van chemokine receptoren kunnen remmen, dit om te voorkomen dat er een chronische toestroom van leukocyten naar het ontstekingsgebied zou ontstaan. In Hoofdstuk 8 hebben we het effect bestudeerd van een verminderde activiteit van dit beschermingsmechanisme op de ontwikkeling van atherosclerose en plaquestabiliteit. Van een specifieke groep enzymen, de GPCR kinases, is bekend dat zij chemokine receptoren ongevoelig maken voor het chemokine. De GPCR kinases kunnen worden geclassificeerd in 3 groepen: (1) de rodopsine kinases (GRK1 en GRK7) (2) β -adrenerge receptor kinases (GRK2 en GRK3) en (3) GRK4-achtige kinases (GRK4, GRK5 en GRK6). Van deze kinases lijkt GRK2 het meest betrokken bij cardiovasculaire aandoeningen. Zo draagt het bijvoorbeeld bij aan chronisch hartfalen, doordat het bij verhoogde activiteit, via een complex mechanisme, de pompcapaciteit van het hart vermindert. Verder speelt GRK2 een rol bij het ontstaan van hoge bloeddruk door regulatie van de bloedvatweerstand. Theoretisch zou afwezigheid van GRK2 de leukocytmigratie naar de plaque kunnen stimuleren, hetgeen resulteert in een versterkte ophoping van ontstekingscellen en dus verhoogde productie van ontstekingsmediatoren in de vaatwand. Voor deze studie hebben wij opnieuw de beenmergtransplantatiestrategie toegepast, om muizen te genereren waarvan de leukocyten slechts 50% van de normale hoeveelheid GRK2 aanmaken. In deze muizen hebben we de gevolgen bestudeerd van een verminderde aanwezigheid van GRK2 in leukocyten op de ontwikkeling van atherosclerose en de plaque samenstelling. In tegenstelling tot onze

verwachtingen veroorzaakte de gedeeltelijke afwezigheid van GRK2 voor een remming van de plaque ontwikkeling. Naast deze remming zorgt een afgezwakte GRK2 aanmaak, onafhankelijk van het plaque stadium, voor een aanmerkelijke vermindering van de hoeveelheid dood celmateriaal in de plaque. Een van de mogelijke mechanismen voor de verminderde plaqueontwikkeling is een verhoogde gevoeligheid van GRK2 deficiënte leukocyten voor apoptose. Eerdere studies hebben aangetoond dat verhoogde apoptose van macrofagen in een vroeg stadium van atherosclerose beschermend kan werken, terwijl dit in een late fase het ziekteproces juist kan verergeren. Apoptose wordt gereguleerd door diverse eiwitten en kinases, waaronder het kinase p38. Recentelijk is aangetoond dat p38 betrokken is bij apoptose van macrofagen. Tevens is bekend dat GRK2 de productie van p38 in de cel reguleert. Mogelijkerwijs zorgt de afwezigheid van GRK2 er in ons model voor dat er meer macrofaagapoptose optreedt met name in ontstekingshaarden zoals de plaque, waardoor er minder vetten opgestapeld en minder ontstekingsmediatoren geproduceerd worden in de plaque. Dit tezamen zou kunnen resulteren in een vertraagde plaqueontwikkeling.

De mestcel is een bijzondere ontstekingscel en wordt gekenmerkt door de aanwezigheid van opslagblaasjes (*granules*) in de cel. Een unieke eigenschap van de mestcel is dat zij deze blaasjes uitscheidt na activatie, een proces dat degranulatie genoemd wordt. Aangezien mestcel granules een grote diversiteit aan cytokines, chemokines en groeifactoren bevatten, zal degranulatie de lokale ontstekingsreactie sterk bevorderen. Mestcellen zijn met name berucht voor hun rol in astma, allergie en andere overgevoeligheidsreacties, waar zij zorgen voor jeuk en de slijmvorming in slijmvliesen en de longen. Mestcellen zijn overvloedig aanwezig in de buitenste laag (*adventitia*) van de bloedvatwand van patiënten met een plaqueruptuur. Hoewel de aanwezigheid van de adventitiële mestcel wijst op een mogelijke rol in het ziekteproces, bleef het lang onduidelijk of deze cellen oorzakelijk bijdragen aan de plaque ruptuur of juist als gevolg van de ruptuur worden aangetrokken. In Hoofdstuk 9 hebben wij zowel in het hele lichaam (systemisch) als in de buurt van de plaque (lokaal) mestcellen geactiveerd en de effecten van deze activatie op de ontwikkeling en stabiliteit van atherosclerose bestudeerd. Lokale activatie van adventitiële mestcellen ging gepaard met een destabilisatie van reeds bestaande atherosclerotische plaques. Deze destabilisatie wordt gekenmerkt door een toename in intra plaque bloedingen (IPH), waarbij een correlatie werd gevonden met de verhoogde apoptose van macrofagen in de plaque en met de aanwezigheid van lekkende haarvaatjes. Het gebruik van een mestcelstabilisator, die de degranulatie blokkeert, voorkwam het optreden van deze destabilisatie. Met deze studie laten we duidelijk zien dat mestceldegranulatie leidt tot destabilisatie van de atherosclerotische plaque en mogelijkerwijs dus ook plaqueruptuur kan induceren.

De preventie van het hart- of herseninfarct tengevolge van scheuring van een atherosclerotisch plaque zal resulteren in een verminderd cardiovasculair sterftecijfer in de westelijke samenleving. Momenteel is de behandeling van angina pectoris hoofdzakelijk gericht op anti-stolling en cholesterol verlaging, vaak vergezeld met een invasieve behandeling zoals dotteren. Om ziekenhuisopname en invasieve chirurgie te verminderen, kunnen strategieën om plaque ontwikkeling te remmen of plaque-stabiliteit te verbeteren een geschikt therapeutisch alternatief bieden. Het onderzoek dat beschreven staat in dit proefschrift heeft verschillende nieuwe kandidaten opgeleverd die niet alleen van waarde kunnen zijn voor de vroege diagnose van hoog-risico patiënten maar in potentie ook een aanknopingspunt kunnen vormen voor de ontwikkeling van nieuwe medicijnen tegen atherosclerose. Zo kan lokale remming van chemokine productie leiden tot een vertraagde plaqueontwikkeling, terwijl remming van MIC-1 of voorkoming van mestcelactivatie de plaque stabiliteit bevordert.

De beschreven resultaten dragen bij aan een beter inzicht in de gecompliceerde rol van chemokines die een belangrijke rol spelen in de vorming en destabilisatie van een atherosclerotische plaque. Remming van een aantal chemokines heeft een gunstig

effect op de vorming van atherosclerose. Gesuggereerd kan worden dat een gecombineerde anti-chemokine therapie een veelbelovende optie is voor therapeutische behandeling van hart- en vaatziekten, mogelijk leidend tot een meer patient gerichte bestrijding van de voornaamste doodsoorzaak in de westerse samenleving.

