



Universiteit
Leiden
The Netherlands

The natural history of human atherosclerosis : a histopathological approach

Dijk, R.A. van

Citation

Dijk, R. A. van. (2017, May 18). *The natural history of human atherosclerosis : a histopathological approach*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/48859>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/48859>

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

Cover Page



Universiteit Leiden

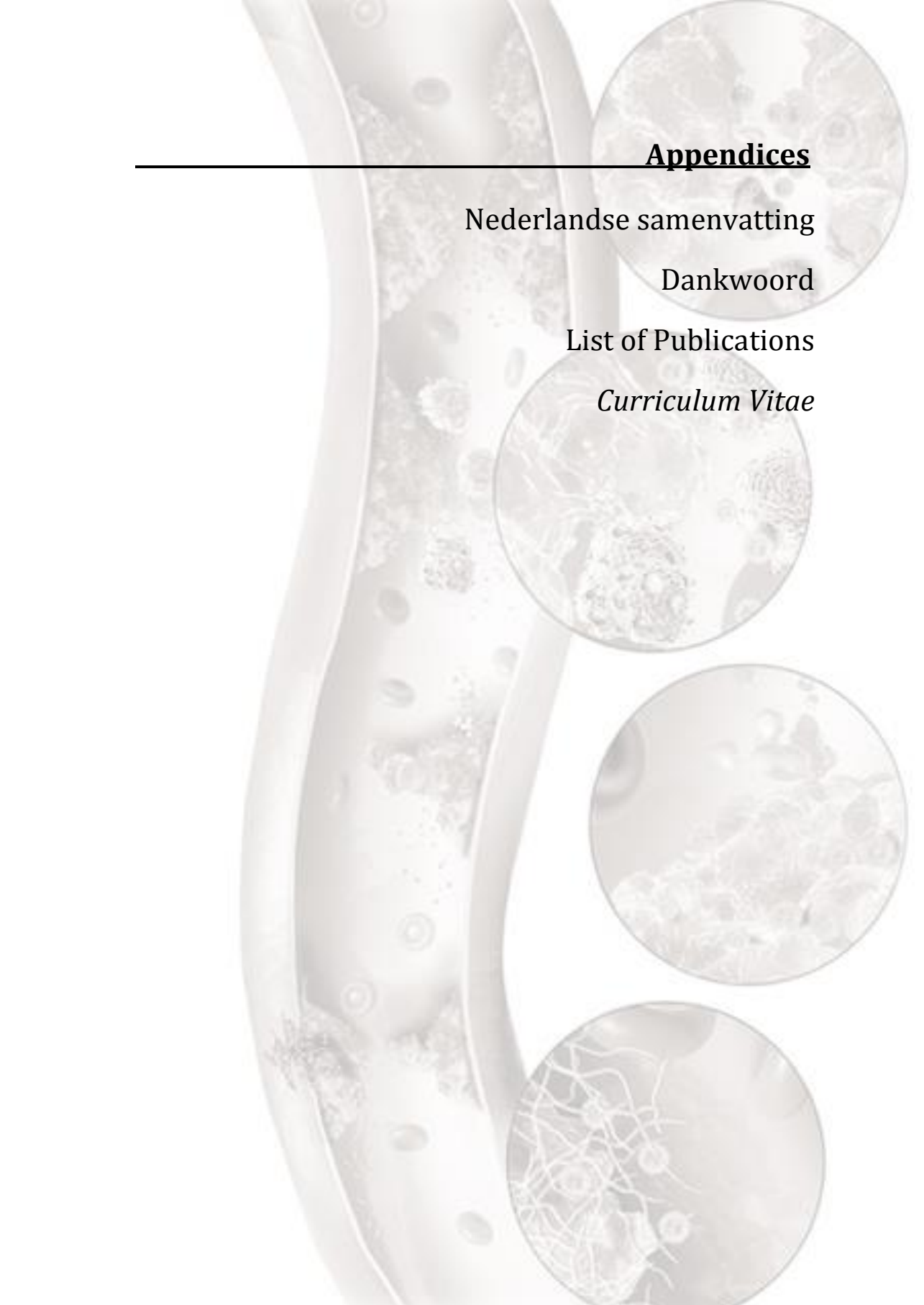


The handle <http://hdl.handle.net/1887/48859> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Dijk, Rogier A. van

Title: The natural history of human atherosclerosis : a histopathological approach

Issue Date: 2017-05-18



Appendices

Nederlandse samenvatting

Dankwoord

List of Publications

Curriculum Vitae

Samenvatting

Atherosclerose is wereldwijd de voornaamste ziekte- en doodsoorzaak¹. Een overvloed aan preklinisch onderzoek heeft de afgelopen decennia geleid tot vele overtuigende hypothesen over de biologische, pathofysiologische en immunologische grondslagen van het atherosclerotische proces en de bijkomende complicaties zoals een myocard- en herseninfarct². Ondanks alle vooruitgang blijft het op vele vlakken een uitdaging om de experimentele successen van proefdieronderzoek op het gebied van atherosclerose te vertalen naar de mens^{3,4}. Het invullen van deze kennislacunes is een vereiste om uiteindelijk volledige wetenschappelijke vooruitgang te kunnen boeken in atherosclerotisch onderzoek².

In een poging deze vertaalslag te realiseren hebben we systematisch het humane atherosclerotische proces geëvalueerd aan de hand van een unieke biobank van ruim 500 individuele secties van de peri-renale aorta en ruim 600 segmenten van de linker coronair arterie; verkregen tijdens lever-, nier- of pancreastransplantatie (aorta) en van weefseldonoren die hun aortaklep doneerden (coronairen). Deze biobanken stelden ons in de gelegenheid om vaatweefsel met een gelijke distributie van leeftijd en geslacht te analyseren van een grote groep relatief gezonde (overleden) individuen. Dientengevolge konden potentiële bias vermeden worden welke wel geïntroduceerd worden bij het gebruik van primair autopsie materiaal van slachtoffers van hart- en vaatziekten (voornamelijk jonge of oude patiënten) of van patiënten die een vasculaire ingreep ondergaan (voornamelijk eindstadium atherosclerotisch vaatlijden). Tezamen geven de studies in dit proefschrift een overzicht van de morfologische, pathofysiologische en immunologische karakteristieken van het humane atherosclerotische proces vanaf de vroege niet progressieve laesies tot aan de vergevorderde, instabiele plaques, die ten grondslag liggen aan de klinische manifestaties van humane atherosclerose.

Morfologische aspecten van het atherosclerotische proces

Kwalitatieve karakterisering van het atherosclerotische proces is volledig gebaseerd op een morfologische classificatie op basis van histologische kenmerken van de plaque. Op basis van de observaties van atherosclerotische plaques in de coronairen van slachtoffers van een myocard infarct hebben Virmani *et al.* de bestaande AHA classificatie verfijnd, met als doel een betere en meer chronologische afspiegeling te creëren van de heterogeniteit van de vergevorderde stadia van atherosclerose^{5,6}. Het is vooralsnog onduidelijk hoe en of deze menselijke indeling op basis van de coronair arterie kan worden toegepast op de andere vasculaire structuren. In **Hoofdstuk 2** beschrijven en valideren we de op de coronaire gebaseerde Virmani classificatie voor de humane peri-renale aorta.

Atherosclerotische laesies in de aorta volgen een vergelijkbaar patroon van ontwikkeling in vergelijking met de coronair arterie, maar zijn aanzienlijk groter in omvang. Bij atherosclerose van de aorta spelen macrofagen en schuimcellen een aanzienlijke bijdragende rol in de evolutie van de necrotische kern, plaque progressie en plaque destabilisatie. Het wordt verondersteld dat macrofagen, door afgifte van matrix metalloproteinasen, bijdragen aan plaque destabilisatie. De directe associatie tussen het verdunnen van de fibrotische cap en de focale infiltratie van macrofagen, en de significante daling van het gehalte aan macrofagen in stabiliserende, geruptureerde plaques ondersteunen deze veronderstelling, ook voor de aorta.

De intima media dikte (IMT) van de carotis en de calciumscore in de coronairen zijn ontwikkeld als epidemiologische meetinstrumenten voor de mate van atherosclerose⁷. Gesuggereerd wordt dat deze instrumenten ook gebruikt kunnen worden voor individuele risico-inventarisatie en dat veranderingen van de IMT gebruikt kunnen worden als surrogaat eindpunt in klinische studies gericht op het stabiliseren en/of omkeren van het atherosclerotische proces⁸. **Hoofdstuk 3** test de validiteit van IMT metingen en calciumscores als surrogaat voor de mate van atherosclerose.

De resultaten bevestigen een associatie tussen de IMT en het stadium van atherosclerose, maar tonen tevens een afvlakking en zelfs een afname van de IMT in de instabiele plaques en voornamelijk de gestabiliseerde plaques. De bevindingen tonen een aanzienlijke variabiliteit in IMT, resulterend in een zeer ruim betrouwbaarheidsinterval rond de trend.

Voor wat betreft de calciumscore; deposities van calcium reflecteren de latere stadia van atherosclerose en zijn voornamelijk prominent in de zogenaamde gestabiliseerde fase. De calciumscore moet beschouwd worden als een retrospectieve marker welke hoofdzakelijk patiënten kan identificeren met manifest atherosclerotisch vaatlijden. Daarentegen sluit een negatieve calciumscore de aanwezigheid van atherosclerose plaques zeker niet uit.

Hoewel de kennis over de initiatie en de progressie van atherosclerotische plaques grotendeels is gebaseerd op informatie afkomstig van muismodellen van atherosclerose is het een opmerkelijk gegeven dat een eenduidige en consistente classificatie van atherosclerose in de muis nog ontbreekt. In **Hoofdstuk 4** tonen we aan dat de op de coronair arterie gebaseerde “Virmani classificatie” kan worden toegepast op de atherosclerose in de muis op het niveau van de aortaklep. Dit betekent dat het mogelijk is om plakstadia van mens en muis 1 op 1 te vergelijken. Het is hiermee mogelijk om de preklinische bevindingen te plaatsen in een humane context.

De vroege stadia van atherosclerose in de muis zijn vergelijkbaar met de vroege stadia van humane atherosclerose. Op basis van de histologische karakteristieken kan geconcludeerd worden dat de atherosclerotische laesies in muizen zich niet verder ontwikkelen dan een 'early fibroatheroma' en dat dientengevolge de aspecten van de instabiele, geruptureerde plaques met opeenvolgende genezing in deze modellen ontbreken.

In vergelijking met humane atherosclerose zien we dat plaques in muizen significant kleiner zijn en dat de *vaso vasorum* in de adventitia ontbreken. Door de beperkte omvang van de laesies in muizen ontbreekt een ischemische trigger en kan de vitaliteit van het atherosclerotisch weefsel worden onderhouden door middel van diffusie. Een consequentie hiervan is dat kritieke aspecten van humane atherosclerose zoals ischemie en neovascularisatie ontbreken.

Moleculaire en cellulaire aspecten van humane atherosclerose

Een fundamentele, cruciale stap in het atherosclerotische proces is accumulatie van LDL in de intima van de vaatwand⁹. Een overvloed aan experimentele data definieert een centrale rol voor geoxideerd LDL cholesterol in de progressie van atherosclerose. In **Hoofdstuk 5** wordt systematisch de relatie beschreven tussen de verschillende oxidatie-specifieke LDL epitopen (OSE); *i.e.* malondialdehydelysine (MDA2), E06, en IK17, and lipoproteïne (a) (Lp(a)) in vroege stadia en de klinisch relevante geavanceerde humane atherosclerotische plaques.

Parallel aan het vorderen van het atherosclerotisch proces treedt in de laesies een verrijking op van apo(a), geoxideerde fosfolipide (OxPL), en MDA gerelateerde epitopen (IK17). In zowel de vroege stadia en de meer gevorderde laesies zijn in het bijzonder de apo(a) epitopen aanwezig. De epitopen van OxPL en IK17 epitopen zijn zeer dominant aanwezig in de macrofagen schuimcellen in de dunne fibrotische cap, de necrotische kern en de geruptureerde plaque. Dit suggereert dat deze gerelateerd zijn aan de vergevorderde en instabiele plaques. De geobserveerde patroonvariatie van immunoreactiviteit tussen de verschillende antilichamen vormen een kader voor het begrijpen van de relaties tussen OSE en lipoproteïnen en de progressie en stabilisatie van humane atherosclerotisch plaques. Specifieke epitopen kunnen worden gegenereerd of accumuleren tijdens de verschillende pathofysiologische stadia van plaque ontwikkeling, progressie en destabilisatie.

Het is alom geaccepteerd dat er in het atherosclerotische proces een cruciale rol is weggelegd voor de cellulaire componenten van het aangeboren immuunsysteem (en in het bijzonder de macrofagen)^{10,11}. Macrofagen vormen een zeer heterogene en dynamische celpopulatie. Verondersteld wordt dat de pro-inflammatoire

processen (klassieke geactiveerde M1 macrofagen) de initiatie en progressieve fase van de ziekte domineren en de alternatieve geactiveerde M2 macrofagen het dominante fenotype zijn in plaque resolutie en herstel¹². Voornamelijk experimentele muismodellen impliceren een belangrijke verschuiving in het macrofaag fenotype tijdens atherosclerose.

Hoofdstuk 6 beschrijft de cellulaire componenten van het aangeboren immuunsysteem en dan in het bijzonder de relatie tot de gecompliceerde plaques die ten grondslag liggen aan symptomatisch vaatlijden.

Een opmerkelijke bevinding was dat de transitie naar een pathologische verdikking van de intima (PIT), de eerste vorm van progressieve en irreversibele atherosclerose, wordt gekarakteriseerd door accumulatie van apolipoproteïne B100 in de media. Deze transitie is geassocieerd met het verlies van integriteit van de *lamina elastica interna* en kenmerkt het begin van de betrokkenheid van de media en adventitia in atherosclerose, een fenomeen dat nader onderzoek verdient.

Macrofagen vertolken een cruciale rol in het aangeboren en verworven immuunsysteem. Ze zijn betrokken in alle fases van de ontwikkeling van de atherosclerotische plaque en in het bijzonder in relatie tot de ontwikkeling van de lipide kern, re-modellering van de plaque en degradatie van de fibrotische cap door afgifte van matrix metalloproteinasen zoals gezien wordt in symptomatisch vaatlijden. In tegenstelling tot de bevindingen in atherosclerotische muismodellen vonden wij geen bewijs voor een verschuiving in fenotypering van de macrofaag tijdens initiatie, progressie, ruptuur of stabilisatie van humane atherosclerotische plaques. Een nog interessanter feit is dat we een dominant fenotype van macrofagen hebben geïdentificeerd die dubbel positief is voor zowel de M1 als M2 marker. Dit betwist het huidige paradigma van een eenduidige M1-M2 dichotomie. De heterogeniteit van macrofagen is complexer dan de huidige op muismodellen gebaseerde theorie momenteel beschrijft. Ons onderzoek ondersteunt de betrokkenheid van additionele (slecht gedifferentieerde) subtypen macrofagen en suggereert zelfs een groter dynamisch bereik van de plasticiteit van macrofagen.

De resultaten laten verder een sterke positieve relatie zien tussen progressieve ziekte en fascine positieve dendritische cellen in zowel de intima, de media en de adventitia. Er zijn echter verschillende rollen geïdentificeerd voor dendritische cellen in de atherogenese en/of progressie van de atherosclerotische plaque in muismodellen. Een specifieke bijdrage van de dendritische cellen en de exacte moleculaire mechanismen zijn tot op heden nog niet helder.

Onze bevindingen in de humane atherosclerotische laesies betwisten claims die zijn gebaseerd op muismodellen van atherosclerose. In tegenstelling tot bevindingen in muismodellen zijn mestcellen niet geassocieerd met de progressie

van humane atherosclerotische laesies. Natural Killer T-cellen, in overvloed aanwezig in de atherosclerotische laesies in de muis, zijn minimaal aanwezig in de humane laesies. Verder impliceren muismodellen een rol voor neutrofielen gedurende de initiatie van het atherosclerotische proces en plaque angiogenese in de latere fase van het de ziekte; onze observationele data in de mens ondersteunen deze primaire rol voor neutrofielen niet. De aanwezigheid van neutrofielen lijkt principieel primair gerelateerd te zijn aan de chirurgische manipulatie tijdens het verwijderen van de aorta.

Het is duidelijk dat de verschillen in waarnemingen tussen muismodellen van atherosclerose en onze humane atherosclerose studies duidt op een beperkt translationeel aspect van dierlijke bevindingen.

De cellulaire componenten van het verworven immuunsysteem zijn systematisch geëvalueerd gedurende de initiatie en ontwikkeling van de atherosclerotische plaque, de progressie, destabilisatie en stabilisatie en komen uitgebreid ter discussie in **Hoofdstuk 7**. De bevindingen wijzen op diepgaande veranderingen in de aard van de reactie in aanloop naar plaquedestabilisatie en laten zien dat het inflammatoire proces uitdooft bij stabilisatie van de plaque.

Ons onderzoek toont fundamentele verschillen aan tussen humane atherosclerose en de muismodellen van atherosclerose; in het bijzonder met betrekking tot het zeer beperkte aantal regulatoire T-cellen, de afwezigheid van Th17 cellen gedurende het gehele atherosclerotische proces en het gebrek aan B-cellen in de vroege, intermediaire en latere stabiele stadia van de ziekte. Diffuse infiltratie van cytotoxische T-cellen domineren de vroege fase, echter gedurende progressie van de ziekte worden er in toenemende hoeveelheid T-helper cellen geïdentificeerd in de atherosclerotische plaques. In tegenstelling tot de bevindingen in muizen konden wij een Th1 dominantie niet bevestigen in het humane atherosclerotische proces.

Een zeer opmerkelijke en niet eerder beschreven observatie is een karakteristiek inflammatiepatroon in de adventitia van de vaatwand die de destabilisatie van de plaque lijkt te begeleiden en weer volledig uitdooft in de stabiliserende fase. Op cellulair niveau wordt deze verandering gekarakteriseerd door een forse toename van T-helper cellen, een exodus van natieve T-cellen en de opkomst van B-cellen met een enkele plasma cel in een follikel-achtige structuur in de adventitia. De expressie van CXCL-13 (een centraal homeostatisch migratie-siginaal voor follikelformatie) wordt exclusief geobserveerd in associatie met de follikel-achtige structuren in de instabiele laesies. N.B. CXCL-13 wordt niet gedetecteerd in alle andere stadia van atherosclerose.

Onze bevindingen van een zeer beperkte aanwezigheid van B-cellen in het humane atherosclerotische proces en de complete afwezigheid van B-cel maturatie

in de infiltrerende B-cellen sluiten een autocrine of paracrine rol voor B-cellen gedurende humane atherosclerose uit. Samenvattend toont deze studie illustratieve veranderingen aan in de cellulaire componenten van het aangeboren immuunsysteem voorafgaand en gedurende destabilisatie van de atherosclerotische plaque. Het is verleidelijk om te speculeren dat het visualiseren van deze keten van gebeurtenissen kan bijdragen aan een vroegtijdige detectie van de symptomatische plaque en plaque stabilisatie.

Op basis van experimentele dierstudies is de activiteit van transcriptiefactor Activator protein-1 (AP-1) in verband gebracht met de initiatie en progressie van atherosclerose^{13,14}. Hierop is gesuggereerd dat AP-1 geregleerde inflammatie een centrale rol speelt in de initiatie en progressie van vasculaire dysfunctie en atherogenese met de inhibitie van AP-1 als mogelijk aangrijppingspunt ter preventie van progressie van atherosclerose. In **Hoofdstuk 8** demonstreren we dat er inderdaad sprake is van geactiveerde AP-1 in de wand van de aorta in de vroege en latere fase van humane atherosclerose. Vervolgens werd in een dubbel-blind gecontroleerde cross-over studie doxycycline toegediend aan patiënten met perifeer vaatlijden om zodoende de AP-1 activatie te onderdrukken en de mogelijke rol van AP-1 activatie gedurende vergevorderde atherosclerose te testen. De afwezigheid van een effect bij alle onderzochte activatie-markers leidde tot de conclusie dat AP-1 (en dus AP-1 inhibitie) mogelijk wel betrokken is bij het ontstaan van atherosclerose, maar geen rol van betekenis heeft in de latere, symptomatische atherosclerose.

De algemene gedachte is dat de acute manifestaties van atherosclerose het gevolg zijn van de destabilisatie en het ruptureren van een pre-existente kwetsbare 'thin cap fibroatheroma'⁵. Naar aanleiding van een groot aantal dierstudies zijn de leden van de Transforming Growth Factor-Beta (TGF- β) super familie (*i.e.* TGF- β , Activin en de Bone Morphogenetic Proteins (BMP)), vanwege hun uitgebreide effecten op inflammatie en matrix homeostase, voorgesteld als zijnde kritische regulatoren van het atherosclerotische proces^{15,16}. De rol van de TGF- β en BMP signaleringsroute gedurende het complete spectrum van humane atherosclerose is geëvalueerd in **Hoofdstuk 9**. De TGF- β familieleden vertonen uitgebreide anti-inflammatoire effecten op een groot aantal cellen, inclusief endotheel cellen, macrofagen, T-cellen, fibroblasten en gladde spiercellen. De effecten worden allemaal gemedieerd door de klassieke signaleringsroute van Smad fosforylatie. Onze resultaten laten zien dat de TGF- β familieleden effect hebben op alle vasculaire geassocieerde celtypen in alle lagen van de vaatwand en gedurende alle stadia van humane atherosclerose. De progressie van atherosclerotische laesies naar de meer gecompliceerde plaques (*i.e.* progressive

atherosclerotic lesions, vulnerable lesions en stabilized lesions) gaat niet gepaard met veranderingen in Smad fosforylatie.

Concluderend worden de TGF- β en BMP signaleringsroutes niet gekarakteriseerd als essentiële regulatoren van de progressie van atherosclerotische laesies en/of de complicaties van atherosclerose.

Toekomstperspectief

De studies in dit proefschrift tonen opmerkelijke morfologische parallellen tussen progressie van de ziekte in veelgebruikte muismodellen van atherosclerose en de humane pathologie. Ondanks deze overduidelijke overeenkomsten bestaan er grove verschillen tussen geavanceerde atherosclerose in muis en mens. Hierbij wordt in het bijzonder gedacht aan aspecten die geassocieerd zijn met de maturatie van de fibrotische cap en destabilisatie van de plaque welke allen ontbreken in de muismodellen. Deze essentiële verschillen belemmeren de vertaling van de experimentele bevindingen naar de klinische context waarin plaque destabilisatie en plaqueruptuur wordt toegeschreven aan nagenoeg alle acute manifestaties die aan atherosclerose ten grondslag liggen. Het aanpakken van de beperkingen in de vertaalslag en kennislacunes is een grote uitdaging voor toekomstig atherosclerotisch onderzoek. Dit onderzoek zou baat hebben bij de ontwikkeling van een authentiek mensachtig model; één die in het bijzonder de biologie van de cap omvat zoals fibrose en plaque-neovascularisatie in de vergevorderde laesies.

In dit opzicht zijn er al verschillende veelbelovende vooruitgangen geboekt in varkensmodellen van atherosclerose die essentieel zouden kunnen blijken voor het verder exploreren van de processen aangaande de latere fases van atherosclerose¹⁷. De atherosclerotische laesies in de varkensmodellen komen qua grootte, cardiovasculaire anatomie, fysiologie en op genetisch vlak meer overeen met de mens dan met de muis. De progressievere atherosclerotische laesies in varkens hebben een algemenere morfologie en vertonen een aantal specifieke histopathologische kenmerken die ook worden gezien in de mens, zoals plaque neovascularisatie, intraplaque bloedingen en solide verkalkingen vergelijkbaar met de verschillende stadia van verkalking in de humane laesies¹⁸. Deze kenmerken worden niet primair gezien bij muizen. Het is echter belangrijk te realiseren dat ook in de varkens modellen trombotische complicaties als gevolg van atherosclerose en geavanceerde verkalkte plaques zeldzaam zijn en dat ook in dit model enkele kritische aspecten van humane atherosclerose ontbreken.

Onze vasculaire databank toont een overvloed aan fibrotische gecalcificeerde plaques (FCP) in patiënten van middelbare leeftijd. In de Virmani classificatie is de

FCP het eindstadium van humane atherosclerose waarbij de initiële plaque na een ruptuur (of rupturen) en heling nagenoeg volledig geconsolideerd is^{5,6}. De hoge prevalentie van (meerdere) FCPs in onze biobank betekent dat al deze patiënten een plaqueruptuur (of rupturen) hebben gehad zonder verdere klinische symptomen of consequenties. Op morfologisch niveau is de meerderheid van de FCPs bijna volledig acellulair en bevatten gecondenseerde verkalkte restanten van de necrotische kern. Op basis hiervan lijkt het geschikter om deze laesies te benaderen als een fibrotische gecalcificeerd litteken in plaats van een plaque.

De studies in dit proefschrift bevestigen de gepostuleerde verschillen in de betrokkenheid van de inflammatoire componenten tussen atherosclerose in de mens en in de muis¹⁹. Terwijl NK-cellen, regulatoire T-cellen en Th17 cellen gevestigde factoren zijn in de muismodellen van atherosclerose, zijn ze vrijwel afwezig in het humane atherosclerotische proces. Derhalve wordt de toegeschreven rol van deze cellen uit muisstudies in humane atherosclerose betwist. Verder tonen onze gegevens over humane atherosclerose een aanzienlijke heterogeniteit en diversiteit onder macrofagen, één die veel complexer is dan het eenvoudigere dichotome classificatieschema zoals die wordt voorgesteld voor de differentiatie van macrofagen bij muizen. Standaard histologische onderzoeksmethoden schieten te kort om deze variabiliteit nader te verkennen. Hoewel technisch uitdagend, zou 'single-cell analyses' waardevolle inzichten kunnen verschaffen in de verdere studie naar de heterogeniteit van macrofagen.

In tegenstelling tot de mens kan in muismodellen atherosclerotische proces pas geschieden na genetische modificatie en op een immunologische achtergrond van Th1-cellen²⁰. In humane atherosclerose zijn cytotoxische T-cellen en T-memory cellen continu en in overvloed aanwezig, terwijl natieve T-cellen en B-cellen vrijwel uitsluitend aanwezig zijn in de instabiele fase. B-cellen worden beschouwd als kritische spelers in het atherosclerotische proces; hoewel hun rol, hetzij beschermend of schadelijk, nog steeds ter discussie staat en dat nader onderzoek verdient.

Bij muizen resulteert een anti-inflammatoire therapie bijna altijd in plaque regressie. Hoewel een anti-inflammatoire behandeling algemeen beschouwd wordt als een valide therapie bij de mens is het belangrijk erop te wijzen dat dit optimisme niet wordt ondersteund door klinisch onderzoek. De potente anti-inflammatoire werking van bijvoorbeeld statines en ACE-remmers op de vaatwand zijn herhaaldelijk aangetoond²¹. Dit betekent echter niet dat deze therapievormen klinisch superieur zijn aan andere vormen van cholesterol- of bloeddrukverlagende behandeling^{22, 23, 24}. Men zou kunnen betogen dat de pleiotrope anti-inflammatoire effecten van statines en ACE-remmers te zwak zijn om het gewenste klinische effect te bereiken. In dit verband is het tevens

belangrijk om op te merken dat systemische remming van IL-1 β evenmin een positief effect heeft op de functie en structuur van de vaatwand bij atherosclerose in de aorta en de carotiden²⁵. Dit gegeven betwist in zekere zin de algemeen aangenomen sleutelrol van inflammatie in atherosclerose en zou kunnen suggereren dat de inflammatoire componenten in atherosclerose slechts een randverschijnsel zijn in plaats van een oorzakelijke factor. Dit laatste denkbeeld wordt ondersteund door onze interventie studie waarbij het onderdrukken van de AP-1 activatie geen significante rol bleek te hebben in de latere, klinisch manifeste stadia van atherosclerose. Gezien de centrale rol van ontsteking een belangrijke bijdragende en onmisbare factor is in wondgenezing en weefselherstel bestaat er zelfs de mogelijkheid dat geavanceerde atherosclerotische laesies zijn niet meer te repareren zijn.

De studies in dit proefschrift, waarbij de mens centraal staat, laten duidelijk zien dat we verder moeten reiken dan de bestaande en beschikbare experimentele modellen van atherosclerose om uiteindelijk de pathofysiologie van atherosclerose in de mens te ontrafelen²⁶. Er zal bijzondere aandacht uit moeten gaan naar vergevorderde atherosclerotische plaques gezien het feit dat deze essentiële fases ontbreken in de huidige toegepaste diermodellen. Mede gezien de hoge prevalentie van FCPs in mensen van middelbare en oudere leeftijd, zou een relevant model er één zijn van neo-atherosclerotische plaquevorming op al bestaande fibrotische verkalkte plaques. Dit type plaque lijkt zich namelijk te ontwikkelen zonder directe communicatie met de onderliggende adventitia en *vasa vasorum* en zou beschouwd kunnen worden als een unieke, symptomatische fase in het atherosclerotische proces.

REFERENCES

- 1 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index1.html>
- 2 Libby, P., Ridker, P. M., & Hansson, G. K. (2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*, 473(7347), 317-325.
- 3 Zadelaar, S., Kleemann, R., Verschuren, L., de Vries-Van der Weij, J., van der Hoorn, J., Princen, H. M., & Kooistra, T. (2007). Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 27(8), 1706-1721.
- 4 Daugherty, A. Mouse models of atherosclerosis. *The American journal of the medical sciences*, 2002, 323.1: 3.
- 5 Virmani, R., Kolodgie, F. D., Burke, A. P., Farb, A., & Schwartz, S. M. (2000). Lessons from sudden coronary death a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 20(5), 1262-1275.
- 6 Yahagi, K., Kolodgie, F. D., Otsuka, F., Finn, A. V., Davis, H. R., Joner, M., & Virmani, R. (2015). Pathophysiology of native coronary, vein graft, and in-stent atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology*.
- 7 Greenland P, Alpert JS, Beller GA, et al. American College of Cardiology Foundation; American Heart Association. 2010 ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010; 56 :e50-103.
- 8 Costanzo P, Cleland JG, Atkin SL, Vassallo E, Perrone-Filardi P. Use of Carotid Intima-Media Thickness Regression to Guide Therapy and Management of Cardiac Risks. *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine*. 2012; 14: 50-56.
- 9 Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine*. 1999;340(2):115-126.
- 10 Fernández-Velasco M, González-Ramos S, Bosca L. Involvement of monocytes/macrophages as key factors in the development and progression of cardiovascular diseases. *Biochemical Journal*. 2014; 458(2):187-193.
- 11 Hansson GK, Libby P, Schönbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation Research*. 2002;91(4):281-291.
- 12 Chinetti-Gbaguidi G, Colin S, Staels B. Macrophage subsets in atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology*. 2015;12(1):10-17.
- 13 Wang, J., An, F. S., Zhang, W., Gong, L., Wei, S. J., Qin, W. D., Wang, X. P., Zhao, Y. X., Zhang, Y., Zhang, C. and Zhang, M. X. (2011) Inhibition of c-Jun N-terminal kinase attenuates low shear stress-induced atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice. *Molecular Medicine* 17, 990–999
- 14 Osto, E., Matter, C. M., Kouroedov, A., Malinski, T., Bachschmid, M., Camici, G. G., Kilic, U., Stallmach, T., Boren, J., Iliceto, S. et al. (2008) c-Jun N-terminal kinase 2 deficiency protects against hypercholesterolemia-induced endothelial dysfunction and oxidative stress. *Circulation* 118, 2073–2080
- 15 Engelse M.A., Neele J.M., van Achterberg T.A.E., van Aken B.E., van Schaik R.H.N., Pannekoek H. and de Vries C.J. (1999). Human activin-A is expressed in the atherosclerotic lesion and promotes the contractile phenotype of smooth muscle cells. *Circulation Research*. 85, 931-939.

- 16 Singh N.N. and Ramji D.P. (2006). The role of transforming growth factor- β in atherosclerosis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 17, 487-499.
- 17 Shim J1, Al-Mashhadi RH1, Sørensen CB1, Bentzon JF. Large animal models of atherosclerosis--new tools for persistent problems in cardiovascular medicine. *Journal of Pathology*. 2016 Jan;238(2):257-66.
- 18 Hamamdžić D, Wilensky RL. Porcine models of accelerated coronary atherosclerosis: role of diabetes mellitus and hypercholesterolemia. *Journal of Diabetes Research*. 2013.
- 19 Lichtman AH. Adaptive immunity and atherosclerosis: mouse tales in the AJP. *American Journal of Pathology*. 2013; 5-9.
- 20 Schulte S, Sukhova GK, Libby P. Genetically programmed biases in Th1 and Th2 immune responses modulate atherogenesis. *American Journal of Pathology*. 2008; 1500-1508.
- 21 Kortekaas KE, Meijer CA, Hinnen JW, Dalman RL, Xu B, Hamming JF, Lindeman JH. ACE inhibitors potentially reduce vascular inflammation, results of an open proof-of-concept study in the abdominal aortic aneurysm. *PloS one*. 2014 Dec 4;9(12):e111952.
- 22 Ridker PM. Residual inflammatory risk: addressing the obverse side of the atherosclerosis prevention coin. *European heart journal*. 2016 Jun 7;37(22):1720-1722.
- 23 Robinson JG. Models for describing relations among the various statin drugs, low-density lipoprotein cholesterol lowering, pleiotropic effects, and cardiovascular risk. *American Journal of Cardiology*. 2008 Apr 1;101(7):1009-1015.
- 24 Law MR, Morris JK, Wald NJ. Use of blood pressure lowering drugs in the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of 147 randomised trials in the context of expectations from prospective epidemiological studies. *British Medical Journal*. 2009;338.
- 25 Choudhury RP, Birks JS, Mani V, Biasioli L, Robson MD, L'Allier PL, Gingras MA, Alie N, McLaughlin MA, Basson CT, Schechter AD. Arterial effects of canakinumab in patients with atherosclerosis and type 2 diabetes or glucose intolerance. *Journal of the American College of Cardiology*. 2016 Oct 18;68(16):1769-1780.
- 26 Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011; 317-325.

Dankwoord

Tijd voor het meest bescheiden deel van het proefschrift. Laat het meer dan duidelijk zijn dat dit proefschrift niet zou hebben bestaan zonder de steun van een heleboel mensen. Ik zou willen beginnen met het uiten van mijn uiterste dank aan iedereen die heeft bijgedragen aan dit proefschrift en mij de afgelopen jaren in welke vorm dan ook heeft gesteund.

Dank aan mijn promotor prof. dr. J.f. Hamming. Beste Jaap, dank voor je steun voor dit project dat ik in 2007 ben gestart als onderzoeker binnen jouw afdeling. Dank voor je heldere, klinische en kritische visie op het hedendaagse onderzoek en dank voor je begeleiding door de jaren heen en de vele productieve discussies tijdens ons samenkomen.

Dr. J.H.N. Lindeman, mijn co-promotor en meest directe begeleider. Beste Jan, na vele jaren samen aan dit project te hebben gewerkt en de vele congressen die we met en zonder ski's hebben bezocht heb ik je leren kennen als een rasoptimist en een vooruitstrevend onderzoeker met een onconventionele en soms onnavolgbare benadering van hedendaagse vraagstukken. Zonder jou zou dit proefschrift er niet zijn geweest. Dank voor alles. Dank voor al je steun en adviezen gedurende de tijd die wij samen hebben meegemaakt op zowel professioneel als persoonlijk vlak.

Dr. A.F.M. Schaapherder, mijn co-promotor. Beste Sandro, zonder jouw inzet en hulp zou de vasculaire Biobank in zijn huidige vorm niet bestaan en daarmee ook dit proefschrift niet. Dank hiervoor en ook dank voor alle adviezen voor de series die ik zou moeten kijken (en ook gekeken heb) ter ontspanning.

Dr. R. Virmani. Dear Renu, your enthusiasm for cardiovascular research is inspiring for many researchers all over the world. It has been an honor for me to have had the opportunity to work with you in direct collaboration during my time CVPath Institute Inc. On the same note I would especially like to thank dr. F.D. Kolodgie and all employees at CVPath Inc. for their amazing input and help during my stay. Dear Frank, thank you for all your constructive work on the manuscripts that we have published together.

Adri Mulder. Lieve Adri, dank je wel voor al je directe begeleiding in het onderzoekslaboratorium op TNO en het LUMC. Jij bent zo niet het meest verantwoordelijk voor de hoge kwaliteit van de vaatbank zoals die er nu is.

Verder wil ik mijn collega onderzoekers Hazem, Arnoud en Charla bedanken voor alle gezellige momenten samen op het lab en tijdens onze periode met Jan samen.

Dr. A.D. Montauban van Swijndregt, mijn opleider Radiologie. Beste Alexander, dankzij jouw steun en de steun van alle Radiologen in het Onze Lieve Vrouwe Gasthuis heb ik mijn onderzoek kunnen continueren naast mijn klinische werkzaamheden als Radioloog in opleiding. Dank voor al het vertrouwen en de fantastische opleidingstijd.

Beste collega AIOS Radiologie uit het Onze Lieve Vrouwe Gasthuis in Amsterdam. Dank voor jullie geweldige samenwerking.

Lieve familie en schoonfamilie, bedankt voor al jullie liefde en steun de afgelopen jaren. Bedankt voor alle begrip op de momenten dat ik vanwege werk of onderzoek niet aanwezig kon zijn op feesten en verjaardagen.

Lieve pappa en mamma, bedankt voor al jullie steun de afgelopen jaren. Jullie hebben mij geleerd wat doorzettingsvermogen is en hoe belangrijk dat is in het leven. Het was een lang traject en er waren soms bemoedigende en liefdevolle woorden voor nodig om het focus te behouden. Dank voor jullie onvoorwaardelijke liefde. Lieve Johan en Marijke, broer en zus, jullie ook bedankt voor de steun en liefde door de jaren heen.

Sharon-Joy, mijn allerliefste vrouw, mijn alles. Vanaf dag één dat ik je leerde kennen heb jij mij onvoorwaardelijk gesteund in de keuzes die ik heb gemaakt. Samen zijn we verder gegaan in het leven en samen hebben we inmiddels een prachtig gezin opgebouwd met twee heerlijke zoons. Bedankt voor al je liefde en support. Zonder je interesse en begrip zou het niet zijn gelukt. Samen dit leven.

List of publications

A. Meershoek, **R.A. van Dijk**, S. Verhage, J.F. Hamming, A.J. van den Bogaerdt, A.J. Bogers, A.F. Schaapherder, J.H.N. Lindeman.
Histological evaluation disqualifies IMT and calcification scores as surrogates for grading coronary and aortic atherosclerosis.
International Journal of Cardiology. 2016 Dec;224:328-34.

M. Hoekstra, E.L. Zwerus, **R.A. van Dijk**, N.W. Willigenburg, D.J.F. Moojen, R.W. Poolman.
Does pain relief after intra-articular anaesthetic hip injection predict success of hip arthroplasty?
Submitted to *Clinical Orthopaedics and Related Research*.

R.A. van Dijk, K. Rijs, A. Wezel, J. F. Hamming, F. D. Kolodgie, R. Virmani, J.H.N. Lindeman.
Systematic Evaluation of the Cellular Innate Immune Response During the Process of Human Atherosclerosis.
Journal of the American Heart Association. 2016, 5(6), e002860.

R. A. van Dijk, A.J.F. Duiniveld, A.F. Schaapherder, A. Mulder-Stapel, J.F. Hamming, J. Kuiper, J.H.N. Lindeman.
A change in inflammatory footprint precedes plaque instability: a systematic evaluation of cellular aspects of the adaptive immune response in human atherosclerosis.
Journal of the American Heart Association. 2015, 4(4), e001403.

A. F. Albersen, **R. A. van Dijk**, E. J. T. Krul, E. A. Heldeweg, (2015).
Case report. Liposarcom van het scrotum.
Tijdschrift voor Urologie. 2015, 5(2), 58-61.

P. le Haen, C.A. Meijer, **R.A. van Dijk**, M. Hira, J. Hajo van Bockel, J.H.N. Lindeman.
Activator Protein-1 (AP-1) signaling in Human Atherosclerosis. Results of a systematic evaluation and intervention study.
Clinical Science. 2012 May 1;122(9):421-428.

R.A. van Dijk, C.C. Engels, A.F. Schaapherder, A. Mulder-Stapel, J.H.N. Lindeman.
Visualizing TGF- β and BMP signaling in human atherosclerosis: a histological evaluation based on Smad activation.
Histology & Histopathology. 2012 Mar;27(3):387-96.

R.A.van Dijk, N. Cresswell, P.X. Shaw, F. Kolodgie, Cheng-Han Chen, J.L. Witztum, R. Virmani, Sotirios Tsimikas.

Differential Expression of Oxidation-Specific Epitopes and Lipoprotein (a) Reflect the Presence of Progressive and Ruptured Plaques in Human Coronary Arteries.

Journal of Lipid Research. 2012. 53, 2773-2790.

R.A.van Dijk, A.F. Schaapherder, J.H. von der Thüsen, R. Virmani, J.H.N. Lindeman. The natural history of aortic atherosclerosis: a systemic histopathological evaluation of the peri-renal region.

Atherosclerosis. 2010 May 1;210(1):100-106.

CURRICULUM VITAE

Rogier Alexander van Dijk is geboren op 16 januari 1979 te Alphen a/d Rijn. Na het behalen van zijn VWO diploma aan het Coenecoop College in Waddinxveen heeft hij, na meerdere malen uitgeloot te zijn voor Geneeskunde, Biologie gestudeerd aan de Universiteit van Leiden. Na het behalen van zijn Bachelor of Science diploma in 2003 is hij datzelfde jaar via een zij-instroom procedure alsnog gestart met de opleiding Geneeskunde aan de Universiteit van Leiden. Tijdens de doctoraalfase is hij een onderzoekslijn gestart naar humane atherosclerose binnen de afdeling Vaatchirurgie in het Leids Universitair Medisch Centrum. Na het behalen van zijn Artsexamen eind 2007 heeft hij gewerkt als Arts Assistent Heelkunde in het Medisch Centrum Haaglanden te Den Haag. Gedurende deze periode heeft hij in 2009 de mogelijkheid gekregen om zijn onderzoek naar atherosclerose voort te zetten binnen het gerenommeerde cardiovasculaire onderzoeksinstituut CVPath Inc. in de Verenigde Staten onder leiding van Dr. Renu. Virmani. Zijn enthousiasme voor wetenschappelijk onderzoek was overduidelijk en bij terugkomst in Nederland in 2010 is het humane atherosclerose onderzoek uitgebreid naar een promotietraject onder leiding van prof. dr. J.F. Hamming. Het promotieonderzoek heeft volledig plaatsgevonden naast zijn fulltime werkzaamheden als arts en gedurende deze periode ontwikkelde hij een affiniteit met de technische aspecten van de moderne geneeskunde. In 2012 is hij begonnen met de opleiding Radiologie aan het Onze Lieve Vrouwe Gasthuis te Amsterdam onder leiding van dr. A.D. Montauban van Swijndregt. In mei 2017 heeft hij de opleiding tot Radioloog afgerond en is aansluitend gestart als Fellow Thorax Radiologie in het Meander Medisch Centrum te Amersfoort. Hij woont in Amsterdam met zijn vrouw Sharon-Joy en hun twee zoons Thijmen en Bob.

