



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Cholesterol metabolism in mouse models of atherosclerosis and adrenal steroidogenesis

Sluis, R.J. van der

Citation

Sluis, R. J. van der. (2020, November 19). *Cholesterol metabolism in mouse models of atherosclerosis and adrenal steroidogenesis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/138374>

Version: 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/1887/138374>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/138374> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Sluis, R.J. van der

Title: Cholesterol metabolism in mouse models of atherosclerosis and adrenal steroidogenesis

Issue date: 2020-11-19



NEDERLANDSE SAMENVATTING

CURRICULUM VITAE

SCIENTIFIC PUBLICATIONS

PHD PORTFOLIO

INDEX OF ABBREVIATIONS

Cholesterol is een essentieel onderdeel voor cellulair metabolisme en een bouwsteen voor de productie van diverse steroïd-hormonen zoals glucocorticoïden. Een verstoorde balans in de concentratie cholesterol in het bloed is gelieerd aan diverse ziektebeelden, waaronder hart- en vaatziekten (HVZ) en het metabool syndroom. In dit proefschrift zijn studies beschreven over de rol van cholesterol, en specifiek de rol van het cholesterol transporterende hoge-dichtheidslipoproteïne (HDL) deeltje, gedurende de progressie en regressie van HVZ. Daarnaast worden de effecten van intra- en extracellulair cholesterol op de productie van steroïd-hormonen afkomstig uit de bijnier uiteengezet.

HDL CHOLESTEROL EN ATHEROSCLEROSE

HVZ zijn de meest voorkomende doodsoorzaak in de Westerse wereld. Hieronder vallen myocard infarcten (MI), kortstondige ischemische aanvallen (TIA), beroertes (cerebrovasculair accidenten; CVA) en andere klinische aandoeningen geïnduceerd door het metabool syndroom. De pathologische aandoening die HVZ drijft is vaatwandverkalking (atherosclerose), plaquevorming in de bloedvatwand. Atherosclerose wordt geïnitieerd door een complex samenspel tussen relatief hoge cholesterolwaarden in het bloed die de vaatwand aantasten en inflammatoire componenten die hierop reageren. Het is algemeen geaccepteerd dat verlaging van de grootste risicofactor, de cholesterol fractie in het lage-dichtheidslipoproteïne (LDL), resulteert in een verminderd risico op een HVZ-gerelateerde aandoening. De huidige interventie therapieën zoals statines realiseren dit voornamelijk door de activiteit van HMG-CoA reductase te remmen. Statine-geïnduceerde cholesterolverlaging leidt tot een 25% vermindering van de kans om te overlijden aan een HVZ-gelieerde doodsoorzaak. Desondanks zijn er nog alternatieve therapieën nodig om het HVZ risico verder te verlagen. Epidemiologische studies laten zien dat er een sterke relatie bestaat tussen een lage concentratie HDL en een verhoogd risico op HVZ. De hypothese was daarom dat het verhogen van HDL-waarden verdere ontwikkeling van atherosclerose zou remmen of zelfs de grootte van bestaande plaques zou kunnen verminderen (atherosclerose regressie). Studies in genetisch gemodificeerde diermodellen hebben laten zien dat de aanwezigheid van HDL essentieel is voor regressie van atherosclerotische plaques. Verhoging van de concentraties van HDL in het bloed, door middel van overexpressie van het humane HDL eiwit Apolipoproteïne A1 (ApoA1) of infusie van humaan ApoA1-Milano, resulteert in een afname van

de plaque progressie en leidt zelfs tot een regressie van de plaque in muizen. Daarnaast speelt HDL een belangrijke rol in het transport van cholesterol vanuit de perifere organen naar de lever via een proces genaamd *reverse cholesterol transport* (RCT). Deze bevindingen hebben ertoe geleid dat er verscheidene strategieën zijn ontwikkeld die de concentratie van HDL cholesterol in het bloed van mensen kunnen manipuleren. Helaas waren de uitkomsten van deze therapieën in diverse klinische onderzoeken echter teleurstellend. Er werd aangetoond dat het verhogen van HDL cholesterol, boven op een statinebehandeling, geen vermindering in de plaquegrootte teweeg brengt. Het nut van enkel het verhogen van de HDL cholesterol-concentratie als therapie tegen HVZ werd verder in twijfel gebracht door onderzoeksresultaten uit patiënten en muismodellen met een genetisch defect in de *scavenger receptor B type I* (SR-BI). SR-BI is een belangrijke receptor in het metabolisme van HDL en komt onder andere tot expressie in de lever. Daar faciliteert het de heropname en metabolisme van cholesteryl esters uit HDL. Defecten in het SR-BI-gen resulteren in een verhoging van HDL cholesterol-concentraties in het bloed en een vergroting van de circulerende HDL-deeltjes. Toch leiden deze, in eerste instantie positieve kenmerken, tot een toename in de gevoeligheid voor de ontwikkeling van atherosclerotische plaques. Gecombineerd markeerden de voorgaande observaties een verschuiving in de discussie rond HDL en zijn anti-atherosclerotische eigenschappen, van kwantiteit naar functionaliteit van het HDL-deeltje.

Het eiwit *phospholipid transfer protein* (PLTP) speelt een sleutelrol in het metabolisme van HDL en daarmee de bepaling van de hoeveelheid, grootte en compositie van het HDL-deeltje. PLTP faciliteert de transport van fosfolipiden van het zeer-lage-dichtheidslipoproteïne (VLDL) deeltje naar de beide subgroepen van HDL: pre- β -HDL en α -HDL. Deze functie van PLTP is gebleken uit onderzoek met muizen die gevoed zijn met een vetrijk dieet. Uitschakeling van PLTP in alle weefsels van deze muizen leidde tot een vermindering van de concentratie HDL cholesterol, fosfolipiden en ApoA1 in het bloed en een verhoging van de overige niet-HDL lipoproteïne fracties die fosfolipiden bevatten.

Door een muismodel te genereren waarin zowel PLTP als de HDL receptor SR-BI waren uitgeschakeld hebben we een normalisatie van de grootte en reductie in de plasmaconcentratie van HDL geforceerd in SR-BI knock-out dieren (**Hoofdstuk 2**). We zagen in dit PLTP x SR-BI dubbel knock-out muismodel naast een vermindering van de hoeveelheid cholesterol die door de HDL-deeltjes getransporteerd werd ook een verminderde gevoeligheid voor het ontwikkelen van atherosclerotische plaques. Deze bevindingen onderstrepen de hypothese dat HDL-kwantiteit niet per

se een voorspellende waarde heeft voor de gevoeligheid voor het ontwikkelen van atherosclerotische plaques. Onder normale condities komt PLTP ook tot expressie in CD68-positieve macrofagen, de immuuncellen die in de vaatwand cholesterol opnemen en afvoeren. Opname van grote hoeveelheden cholesterol door macrofagen verandert ze in schuimcellen, die vervolgens vast komen te zitten in de vaatwand en daar het begin van de atherosclerotische plaque vormen. Macrofagen vertonen onder gekweekte condities een verhoogde expressie van PLTP als ze geladen worden met atherogene LDL deeltjes. Onze groep heeft recent in muizen met een LDL-receptor deficiëntie die een cholesterolrijk “Westers” dieet gevoerd werden aangetoond, dat uitschakeling van de productie van PLTP door macrofagen leidt tot een verlaging van cholesterol concentraties in het bloed en een verminderde gevoeligheid voor atherosclerotische plaquevorming. Deze bevindingen suggereren dat lokaal in de bloedvatwand geproduceerd PLTP van invloed kan zijn op de stapeling van cholesterol in macrofagen en dus op de gevoeligheid voor plaquevorming. In **Hoofdstuk 2** laten we dus zien dat de verminderde gevoeligheid voor plaquevorming in dieren met gecombineerde PLTP- en SR-BI-deficiëntie het resultaat is van de herstelde HDL-functionaliteit.

De functionaliteit van HDL wordt o.a. bepaald door zijn capaciteit om cholesterol op te nemen vanuit macrofagen. De effectiviteit van dit proces hangt sterk af van de dikte van de vaatwand (intima-media-dikte) en is, mede door de heterogeniteit van HDL grootte en proteïne lading, onafhankelijk van de concentratie HDL. Het normaliseren van de grootte van het HDL-deeltje in SR-BI-deficiënte muizen dmv uitschakeling van PLTP, leidde tot de vorming van deeltjes die effectiever cholesterol opnemen vanuit macrofagen. Afgelopen jaren is de kennis rondom het metabolisme en de functionaliteit van het HDL-deeltje exponentieel toegenomen. Hieruit is gebleken dat HDL een heterogene populatie van deeltjes bevat die drager zijn van diverse eiwitten in hun membraan met een directe invloed op de functionaliteit van het deeltje. Dit bemoeilijkt nieuwe strategieën om specifiek de functie van HDL te bevorderen. Het lijkt daarom zinnvoller om specifiek de macrofagen in de atherosclerotische plaque te benaderen en zo de macrofaag-cholesterol-efflux te stimuleren.

Macrofaag-specifieke cholesterol efflux wordt voornamelijk bewerkstelligd via de ATP-binding cassette transporters A1 en G1 (ABCA1 en ABCG1). Deze eiwitten faciliteren respectievelijk het cholesteroltransport naar de cholesterol-arme voorlopers van het HDL of reeds volgroeide HDL-deeltjes (**Hoofdstuk 1 Figuur 2**). De voornaamste regulator van de ABC transporterfamilie is de liver X receptor (LXR). LXR-agonist

geïnitieerde op-regulatie van ABCA1 en ABCG1 stimuleert cholesterol efflux vanuit macrofagen in kweek. Daarnaast geeft behandeling met een LXR-agonist als resultaat dat macrofagen uit de atherosclerotische plaque verdwijnen. Dit heeft plaqueregressie tot gevolg. Deze twee bevindingen suggereren dat LXR een potentieel doelwit is om zo het risico op en incidentie van HVZ te verminderen. Helaas heeft LXR een bijzonder brede rol in het lipiden-metabolisme, waaronder de regulatie van lever-specifieke aanmaak van lipiden (lipogenese). Toediening van synthetische LXR-agonisten in muizen leidt daarom tot een vermindering van het risico op HVZ, maar verhoogt daarnaast de triglyceride- en VLDL-concentraties in plasma. Daarnaast ontstaat er als reactie op de LXR-agonist behandeling leververvetting. Nieuwe strategieën gericht op specifieke verbetering van het transport van cholesterol uit macrofagen, bijvoorbeeld door selectieve afgifte van een LXR-agonist aan de macrofagen via nano-deeltjes, moeten de bijwerkingen tegen gaan. Deze macrofaag-specifieke therapieën zouden verdere plaque progressie kunnen stoppen en mogelijk misschien wel regressie van de atherosclerotische plaque kunnen bewerkstelligen.

Menigmaal hebben studies in diermodellen al laten zien dat regressie van de atherosclerotische plaque daadwerkelijk mogelijk is, al zijn de meningen verdeeld over het achterliggende werkingsmechanisme. Muismodellen waar regressie van de plaque is gestimuleerd door gecontroleerde normalisatie van de hyperlipidemie (de Reversa muis) of een transplantatie van een plaque-bevattende aortaboog naar een muis met normale cholesterolwaarden (het aorta transplantatie model), suggereren dat onder extreem cholesterolverlagende condities het verdwijnen van macrofagen de drijvende factor is achter de regressie van de plaque. Daarnaast is aangetoond door Rahman en collega's dat het aanvoeren van nieuwe Ly6C^{hi}-positieve monocytten (de voorlopers van macrofagen) ook essentieel is voor het laten verdwijnen van bestaande atherosclerotische plaques. Dit wekt de suggestie dat er een dynamische rol is weggelegd voor monocytten in de plaque, enerzijds stimuleren ze de ontwikkeling, maar anderzijds zijn ze ook nodig om materiaal in de plaque op te ruimen. Er zijn ook alternatieve theorieën voor de macrofaag-migratie-hypothese. Deze zijn vooral gebaseerd op studies waarbij veelal gebruik is gemaakt van ApoE knock-out muizen waarbij de genetische hypercholesterolemie is genormaliseerd door middel van ApoE herintroductie, bijvoorbeeld door middel van virale transfectie. Deze specifieke studies laten zien dat regressie van bestaande atherosclerotische plaques juist gebaseerd is op een combinatie van een verminderde aantrekking van monocytten en apoptose (het gecontroleerd afsterven) van de macrofagen die in de plaque vastzitten. De verschillende hypothesen en daaruit getrokken conclusies over

het achterliggende mechanisme van regressie zouden theoretisch afhankelijk kunnen zijn van het gebruikte diermodel. Beide hypothesen zijn gebaseerd op diermodellen waarin de non-HDL-fractie is verlaagd en tegelijkertijd de HDL-fractie is behouden om te fungeren als drager voor heropname van cholesterol uit de plaques. Onze groep heeft recent een additioneel diermodel voor plaque regressie ontwikkeld. Van der Stoep et al. hebben laten zien dat door de herintroductie van ApoE-producerende beenmerg-afgeleide cellen in een ApoE knock-out muis de hypercholesterolemie van deze dieren kan worden genormaliseerd en dat als gevolg daarvan regressie van bestaande plaques kan worden bewerkstelligd. In **Hoofdstuk 3** hebben we in dit model de hypothese getest dat de aanwezigheid van HDL essentieel is om regressie van bestaande plaques te initiëren. We laten zien dat wanneer de hoeveelheid HDL in de circulatie extreem wordt verminderd door toediening van het cholesterol-verlagende medicijn Probucol er geen regressie van bestaande plaques meer optreedt. Uit deze bevinding kan dus geconcludeerd worden dat, onafhankelijk van het gebruikte model, de functionaliteit en aanwezigheid van HDL essentieel is om regressie van bestaande plaques te initiëren in muizen.

CHOLESTEROL EN GLUCOCORTICOÏDEN

Cholesterol is het belangrijkste substraat voor de productie van steroïd-hormonen (steroïdogenese), waaronder het door de bijnier geproduceerde cortisol in mensen en corticosteron in knaagdieren. Helaas is de bijdrage van de verschillende lipoproteïnen-fracties in deze processen nog onduidelijk. In mensen is aangetoond dat een deficiëntie in de aanmaak van zowel LDL als HDL resulteert in een verminderde productie van glucocorticoïden. Dit wekt de suggestie dat zowel LDL-cholesterol als HDL-cholesterol bijdragen aan de cholesterolpool in de bijnier die gebruikt wordt voor steroïdogenese. In mensen is de non-HDL-fractie (LDL en VLDL) de dominante lipoproteïnen-fractie, maar knaagdieren hebben voornamelijk de HDL fractie in hun bloed. In de studies beschreven in **Hoofdstuk 3** hebben we laten zien dat concentratieveranderingen in de HDL-fractie in muizen resulteert in een vermindering van de cholesteryl-ester-pool in de bijnier en daarmee een verminderde productie van corticosteroïden. Het is interessant om te zien dat muizen met een meer humaan lipoproteïnen profiel juist een totale depletie van de bijnier cholesteryl-ester-pool hebben. Dit terwijl ApoA1 x LDL receptor dubbel-deficiëntie muizen (deze dieren missen de HDL fractie en hebben een verhoogde concentratie van de non-HDL fractie) een normale plasma-

corticosteronrespons op stress laten zien, ondanks het missen van een cholesteryl-ester-pool in de bijnier. ApoE-deficiënte dieren tenslotte, met een verhoogde non-HDL fractie, hebben interessant genoeg ook hypercorticosteronemia, terwijl de bijnier cholesteryl-ester-pool van normale grootte is. Vanwege deze observaties hebben wij de hypothese gesteld dat in muizen de bijnier cholesteryl-ester-pool niet de primaire bron van cholesterol is voor de aanmaak van steroïd-hormonen en dat bij het wegvallen van de HDL-fractie de bron voor cholesterol gecompenseerd kan worden door de non-HDL fracties. In **Hoofdstuk 4** zijn wij ingegaan op de impact van non-HDL-specifieke verlaging in het bloed op de cholesteryl-ester-pool in de bijnier en de homeostase van glucocorticoiden. Hiertoe hebben ApoE-deficiënte muizen een beenmergtransplantatie ondergaan met wildtype (ApoE-bevattend) beenmerg. Herintroductie van ApoE in ApoE-deficiënte muizen leidde tot normalisatie van de hypercholesterolemie en een verminderde steroïdeproductie in de bijnier. Dit ging samen met een onveranderde cholesteryl-ester-pool. Deze studies suggereren dat er tenminste twee routes te onderscheiden zijn die de bijnier steroïdogeenese van cholesterol voorzien (**Hoofdstuk 6 Figuur 2**): 1) de route waarbij de HDL-fractie de bijnier van cholesterol voorziet voor de cholesteryl-ester-pool die gebruikt kan worden voor steroïdogeenese en cellulaire metabolisme doeleinden en 2) de route waarbij cholesterol opgenomen wordt in de bijnier via de VLDL/LDL-fracties. Deze laatste kan direct gebruikt worden voor de aanmaak van steroïd-hormonen.

Naast de rol van de verschillende lipoproteïnen is er ook nog veel onduidelijk over het belang van de verschillende receptoren op de bijniercellen die cholesterol opnemen. De drie voornaamste cholesterol-opname gerelateerde lipoproteïne-receptoren die op de bijnier zitten zijn: 1) de LDL-receptor, 2) LDL-receptor related proteïne 1 (LRP1), en 3) SR-BI. We hebben aangetoond, middels een bijniertransplantatie model, dat de LDL-receptor niet bijdraagt aan de cholesteryl-ester-pool in de bijnier van muizen. Muizen met functionele deficiëntie van LRP1 zijn niet levensvatbaar en dus blijft de exacte impact van cholesterol opname via deze receptor in de bijnier tot nu onduidelijk. De derde route voor cholesterolopname door de bijnier is via SR-BI. SR-BI is niet alleen een receptor met een grote affiniteit voor HDL-deeltjes betrokken bij de selectieve opnamen van cholesteryl-esters door de lever, maar ook in de bijnier. Mensen met een functionele mutatie in het SR-BI-gen (P297S missense mutatie) hebben een verhoogde HDL-concentratie in het bloed en een verlaagde cortisolafgifte. Toch is de contributie van SR-BI in cholesterolopname niet beperkt tot de HDL-fractie, want SR-BI kan de opnamen van hele VLDL/LDL-deeltjes faciliteren. Onze hypothese is dan ook dat in de bijnier van een muis de opname van cholesterol uit VLDL/LDL-deeltjes zou kunnen worden gefaciliteerd door SR-BI (**Hoofdstuk 6 Figuur 2** en **Hoofdstuk 4 Figuur 5**). Er is

echter verder onderzoek nodig om het exacte mechanisme, de rol en relevantie in de humane setting te verduidelijken.

Verschillende lipoproteïne fracties die in het bloed circuleren hebben een direct effect op de cholesterolpool in de bijnier en daardoor op de productie van steroïd hormonen. Daarnaast hebben diverse in vivo studies aangetoond dat de aanwezigheid van cholesterol in de bijnier-cel (intracellulair) van invloed zou kunnen zijn op de aanmaak van glucocorticoïden. Opvallend is dat ApoE-deficiënte muizen naast hypercholesterolemie ook hypercorticosteronemia ontwikkelen. Deels kan dit fenomeen verklaard worden door de overmatige aanwezigheid van het substraat voor steroïdogenese. Echter, in-vitro studies hebben aangetoond dat ApoE geproduceerd in de bijnier zelf ook een direct effect heeft op de steroïd productie. Prack et al. en ook Reyland et al. suggereren dat ApoE een rol speelt bij het intracellulair transport van cholesterol en zodanig ook de productie van steroïd-hormonen kan reguleren. Dit is mede interessant omdat de adrenocorticotropie hormoon (ACTH) geregleerde respons op cyclic adenosine monophosfaat (cAMP) direct de ApoE expressie kan reguleren. In **Hoofdstuk 5** wordt het effect van een bijnier-specifieke ApoE-depletie besproken en de uitwerking hiervan op het bijnier-cholesterolmetabolisme en de steroïdogenese. In deze studie hebben we een bijnier van een ApoE-deficiënte muis naar een bijnierloos gemaakte wildtype muis getransplanteerd. Deze bijnier-specifieke ApoE-depletie had geen effect op de glucocorticoïdconcentraties in het bloed, maar resulteerde in een accumulatie van cellulair cholesterol tezamen met een verhoogd endoplasmatisch reticulum (ER) stressniveau in de bijnier. Op basis van deze data stellen wij een nieuwe rol voor ApoE voor waarbij het in de bijnier geproduceerde ApoE actief cholesterol mobiliseert en de uitwisseling van overmatige hoeveelheid cholesterol bevordert om zo ER stress in de bijniercellen te voorkomen.

TOEKOMSTPERSPECTIEVEN

Atherosclerose en aan HVZ-gerelateerde ziektebeelden zijn wereldwijd doodsoorzaak nummer één. Wetenschappelijk behaalde mijlpalen, zoals de ontdekking van de link tussen cholesterolniveaus en progressie van de atherosclerotische plaque door Nikolay Anitschkow en het belang van ontstekingscomponenten in de plaque-ontwikkeling door Russel Ross, hebben gezorgd voor een beter begrip van de pathobiologie achter atherosclerose. Cohortstudies naar statine-geïnduceerde LDL-verlaging, hebben aangetoond dat het mogelijk is om het risico op HVZ te verminderen en

verdere progressie van de plaque een halt toe te roepen. Desondanks veranderen de plaquecompositie en -grootte maar nauwelijks met de huidige interventiestrategieën. Alhoewel een groot deel van de patiënten baat heeft bij de verlaging van de LDL-cholesterol concentratie in het bloed middels statines, blijft er een grote groep patiënten die met een monotherapie van statines de cholesterolconcentraties niet of niet afdoende omlaag kan krijgen. Daarnaast zijn de bijwerkingen van statines vaak een reden om de medicatie te stoppen. Mede daarom worden er alternatieve niet-statine-gebaseerde therapieën ontwikkeld die het risico op HVZ verder moeten verminderen. Naar aanleiding van de ontdekking van het enzym proproteïne convertase subtilisin/kexintype-9 (PCSK9) en de daaropvolgende ontwikkeling van monoclonale IgG2-antilichamen met een remmende werking op PCSK9 (alirocumab en evolocumab) is een alternatieve cholesterolverlagende therapie ontwikkeld. Deze monoclonale antilichamen zorgen ervoor dat de LDL-receptor niet afgebroken kan worden en verlagen daarmee de concentratie LDL-cholesterol in het bloed met circa 50 tot 60 procent en verminderen de kans op een HVZ-gerelateerde aandoening met 9.8 % (evolocumab) en 15 % (alirocumab). Toch hebben deze medicijnen een keerzijde. De hoge kosten en subcutane injecties die om de 2 tot 4 weken gegeven moeten worden maken deze therapie alleen geschikt voor een selecte groep patiënten. Alternatieve therapieën die PCSK9 remmen zijn nog in ontwikkeling. Hieronder vallen kleine interfererende RNA moleculen (siRNAs), vaccin/virus-achtige partikels waar peptiden uit kunnen voortkomen en kleine moleculen. Deze technieken openen deuren naar een geheel nieuw tijdperk waarin het risico op HVZ verminderd wordt door extreme verlaging van de LDL-cholesterol-concentratie en dragen bij aan de algehele discussie die gaat over de vraag of in de toekomst een "lager is beter" beleid voor cholesterol concentraties gevolgd zou moeten worden.

Alhoewel het verlagen van de LDL-cholesterol-concentratie een direct verband heeft met het verlagen van het risico op HVZ, blijft er een resterend risico aanwezig. Omdat plaqueprogressie een samenspel is tussen cholesterol en de respons van het aangeboren en verworven deel van het immuunsysteem, is de hypothese dat beïnvloeding van de immuunrespons gunstige effecten kan hebben bovenop strategieën gericht op cholesterolverlaging. Desalniettemin geven therapieën gericht tegen het immuunsysteem, o.a. corticosteroïden en non-steroïdogene anti-inflammatoire drugs (NSAID), juist een verhoging van het risico op HVZ. Een eerste succesvol onderzoek met als doelwit het aangeboren deel van het immuunsysteem was de Canakinumab anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS), uitgevoerd door NOVARTIS. Hierbij werd gebruik gemaakt van een monoclonaal antilichaam dat

de productie van interleukine-1 β (IL-1 β) remt. Deze ontstekingsremmende therapie verlaagde op een dosis-afhankelijke manier de concentratie interleukine-6 (IL-6) in het bloed en verminderde daarmee de kans op het krijgen van een van de primaire HVZ eindpunten (hartinfarct, beroerte en andere HVZ-gerelateerde doodsoorzaken) terwijl de LDL-cholesterol-concentratie onveranderd bleef. Daarnaast hebben studies in ApoE-deficiënte muizen met verregaande ontwikkeling van atherosclerose laten zien dat een behandeling met een IL-1 β -antilichaam leidt tot onveranderde plaquegrootte. Dit terwijl er in de met IL-1 β -antilichaam behandelde dieren een vermindering van de gladde spiercellen en collageenvorming en een toename van de hoeveelheid macrofagen gemeten werd. Toch zou dit positieve op het eerste gezicht positieve effect in mensen een tweezijdig effect kunnen geven. Enerzijds omdat het verminderen van de collageenrijke cap over de plaque het vergemakkelijkt om de macrofagen te laten verdwijnen uit de plaque. Anderzijds zorgt collageen juist voor stabiliteit. Dit voorkomt dat er een instabiele plaque ontstaat die eerder kan scheuren. NOVARTIS heeft er uiteindelijk in 2018 voor gekozen om de ontwikkeling van Canakinumab te stoppen. Deze beslissing was gebaseerd op de milde verlaging van de primaire eindpunten en de hoge prijs per quality-adjusted per life-year (QALY) (\$6.4 miljoen per QALY). Alternatieve onderzoeken die de ontstekingshypothese testen, zijn onder meer de COLCOT-studie waarin een goedkoper en al goedgekeurd ontstekingsremmende medicijn wordt getest, namelijk Colchicine. De uitkomsten van deze studie lijken positief uit te vallen, met een verlaging van het risico op ischemische HVZ-gerelateerde aandoeningen in patiënten die recent een hartinfarct hebben gekregen. Desalniettemin zijn er ernstige bijwerkingen die de bruikbaarheid van deze ontstekingsremmer in de weg kunnen staan. Samenvattend is het mogelijk dat therapieën die het immuunsysteem targeten een positieve bijdrage kunnen leveren aan het verminderen van het risico op HVZ bovenop conventionele therapieën, mits daarbij de veiligheid en de kosten niet in het geding komen.

Regressie van gevorderde of instabiele kwetsbare plaques kan worden omschreven als a) een reductie van de plaquegrootte (regressie) of b) positieve veranderingen in de samenstelling van de plaque (stabilisatie). In het verleden was de De hypothese dat regressie van (gevorderde) plaques niet mogelijk was door de onomkeerbare elementen in de compositie van de (gevorderde) plaque zoals een necrotische kern, fibrose en calcificaties. Deze zienswijze veranderde rond de eeuwwisseling, toen diervormen aantoonde dat regressie en stabilisatie van (gevorderde) kwetsbare plaques tot de mogelijkheden behoorde. Daarnaast leerden deze modellen ons dat plaque-regressie niet simpelweg het omgekeerde is van het ontstaan van een plaque. Om regressie

te induceren zijn er specifieke processen nodig die aanzetten tot het verwijderen van ongewilde celtypes of componenten (stabilisatie) uit de plaque om zo een compositie te krijgen die leidt tot het verminderen (regressie) van de plaquegrootte. Non-invasieve onderzoeken die zich richten op het visualiseren van de plaqueprogressie door middel van IVUS, CIMT ultrasound of angiografie hebben laten zien dat door het verlagen van de concentratie cholesterol in het bloed de plaquecompositie in de coronaire vaten collageenrijker werden en dus stabiliseerde. Daarnaast geldt dat het juist de coronaire vaten zijn die als een voorspellende bio-marker aangemerkt kunnen worden voor de staat van het totale vasculaire systeem. Ondanks dat deze plaquestabilisatie goed nieuws is en gelinkt wordt aan een verminderde kans op HVZ, blijft de ideale situatie dat alle plaque verdwijnt uit het vasculaire systeem (regressie). Dit is de uitdaging voor de toekomstige therapieën waartoe een flink aantal horden zullen moeten worden genomen, waaronder het vermijden van atherothrombose, verminderen van de aangroei van collageen lidtekenweefsels en het herstel van de beschadigde endotheelcellaag.

PROEFDIEREN IN DE WETENSCHAP

Voor de studies beschreven in dit proefschrift is gebruik gemaakt van diverse muismodellen en technieken (waaronder transplantatietechnieken) om genexpressie te moduleren als instrument om onze hypothesen te testen. Geschat wordt dat jaarlijks alleen al in Amerika 14 tot 16 miljoen dieren, waarvan 85-90 % knaagdieren, gebruikt worden voor biomedisch onderzoek. In Nederland werden in 2017 naar schatting 530.000 dieren, waarvan 305.000 knaagdieren, gebruikt voor dit doel. Ondanks de vele lessen die we als wetenschappers hebben geleerd door het gebruik van proefdieren, blijft het algemene probleem dat de bevindingen uit bijvoorbeeld de muis niet simpelweg geëxtrapoleerd kunnen worden naar de humane situatie. Mede hierdoor wordt de voorspellende waarde van proefdieren voor het testen van nieuwe medicijnen in twijfel getrokken. In de algemene discussie rond het gebruik en de voorspellende waarde van proefdieren speelt de evolutiebiologie en daarmee de genetische (on)gelijkheid tussen verschillende diersoorten een cruciale rol. Dieren die genetisch veel gelijkenissen hebben met mensen, de primaten, worden maar op kleine schaal gebruikt voor biomedisch onderzoek door ethische bezwaren en de dure huisvesting. De meest gebruikte proefdieren (knaagdieren) zijn juist dieren die genetisch verder afstaan van mensen. Desondanks worden ze veel toegepast omdat ze makkelijk te hanteren zijn, tegen een lage kostprijs te huisvesten zijn en zich snel voortplanten. Alhoewel het duidelijk mag zijn dat het begrijpen van een biologisch mechanisme in de ene diersoort helpt om het proces in een andere diersoort te ontrafelen, maken juist de complexiteit

van de biologische mechanismen het lastig om er een voorspellende waarde aan te hangen. Pasterkamp et al. hebben in een systematische review de genen gevalideerd die gelinkt zijn aan atherosclerose in ApoE- en LDL-receptor-deficiënte muizen versus de humane orthologen. Hierbij vonden ze in de plaques van muizen geen associatie in de genen van het verworven en aangeboren immuunsysteem versus de genen gelinkt in de humane plaque compositie van patiënten met coronair vaatlijden of arteriële ischemische beroertes. Desalniettemin kwamen genen die gerelateerd zijn aan het lipiden-metabolisme in muizen significant overeen met hun orthologen in plaques van patiënten. Een verklaring voor deze discrepantie zou kunnen liggen in de gebruikte muismodellen. Voor muizen studies wordt voornamelijk gebruik van totale knock-out modellen terwijl in de humane situatie altijd delen van genen gemuteerd zijn wat dus een milder effect zou kunnen geven. Ondanks deze verschillen verschaffen proefdieren t.o.v. bijvoorbeeld in vitro gekweekte cellijnen juist inzichten in de complexiteit van biologische mechanismen. Hierin ligt ook de kracht voor het ontrafelen van complexe ziektebeelden zoals HVZ.

Het vervangen van proefdieren in de wetenschap heeft de afgelopen periode zijn vlucht genomen binnen de wetenschappelijke gemeenschap. Afgelopen decennium zijn het gebruik van de drie V's, Vervangen Verminderen en Verfijnen, meer ingeburgerd in het ontwerpen van experimenten met dieren. Daarnaast zijn er tegenwoordig betere alternatieven voor het gebruik van proefdieren. Hieronder vallen de ontwikkelingen in het stamcel-veld, waarbij het nu mogelijk is om uit pluripotente stamcellen nagenoeg ieder mogelijk celtype te genereren. Dit, in combinatie met het in 3D kweken van cellen, vormt de basis van de vorming van organoids, mini-organen, waarop medicijnen in kweek getest kunnen worden. Verder is er de ontwikkeling van de organ-on-a-chip modellen, een statische setting waarin verschillende celtypen interactie met elkaar hebben en zo diverse organen kunnen nabootsen. Dit platform is speciaal ontwikkeld als 3D in vitro model voor het farmacokinetisch testen en voorspellen van de effecten van nieuwe medicijnen. De potentie van beide platformen opent een nieuw tijdperk waarin we Vermindering en Vervanging van proefdieren kunnen stimuleren en toch complexe ziektebeelden kunnen blijven bestuderen. Volledig in lijn met deze ontwikkeling ligt het streven van de voormalig staatssecretaris van Economische zaken, Martijn van Dam, die in 2016 de ambitie heeft uitgesproken om Nederland in 2025 als eerste land proefdiervrij te maken. Ook de Amerikaanse Environmental Protection Agency (EPA) heeft verkondigd dat ze per 2035 geen studies meer willen bekostigen die gebruik maken van proefdieren. De Nederlandse ambitie komt voort

uit het publieke debat rondom het verminderen van het gebruik van proefdieren en de opkomende nieuwe technieken die dit zouden kunnen vervangen. De staatssecretaris heeft het Nationale Comité Advies Dierproevenbeleid (NCAD) gevraagd om met aanbevelingen te komen aangaande dit onderwerp. Zij hebben gesteld dat een substantiële vermindering van dierproeven haalbaar is binnen de gestelde termijn. Om deze doelstellingen te halen zou de overheid gefaseerd moeten stoppen met de verplichte toetsing op de biologische veiligheid van producten op proefdieren. Ondanks de ontwikkelde alternatieve platformen is de Commissie er niet van overtuigd dat vermindering van het gebruik van proefdieren in preklinisch en fundamenteel onderzoek op dezelfde voet kan worden gevolgd. Er is daarom aan de Nederlandse wetenschappelijke gemeenschap gevraagd om mee te denken hoe deze doelstelling gehaald zou kunnen worden in de komende 10 jaar. De ontwikkeling van de technieken en voorstellen die nodig zijn om deze transitie te bewerkstelligen zal met grote interesse gevolg worden. De gehele transitie zal namelijk moeten worden afgerond zonder onze huidige expertisepositie binnen de internationale wetenschappelijke gemeenschap te verliezen en moet tegemoetkomen aan de behoefte om complexe biologische systemen te kunnen blijven bestuderen.