

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/21063> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Ewing, Mark McConnell

Title: Post-interventional atherosclerotic vascular remodeling : preclinical investigation into immune-modulatory therapies

Issue Date: 2013-05-23

Nederlandse samenvatting

Cardiovasculaire ziekten zijn verantwoordelijk voor het grootste aantal sterfgevallen wereldwijd en dit kan in het bijzonder worden toegeschreven aan atherosclerotische vaatziekten, die aanleiding geven tot beroertes of coronaire hartziekten. Verbeterde primaire preventie en de introductie en optimalisatie van percutane coronaire interventies (PCI), dotteren, heeft sterk bijgedragen aan de verbeteringen van mortaliteit en morbiditeit ten gevolge van deze aandoeningen. Het inzicht in de ziektepathofysiologie is in het afgelopen decennium enorm toegenomen. Nieuw onderzoek naar het ontstaan van post-interventionele atherosclerotische vasculaire veranderingen heeft de focus gelegd op een disfunctionele (auto)immuun respons en ontstekingsreactie. Ten gevolge hiervan ontstaan vaatwand verdikking, re-occlusie en de daaraan gerelateerde symptomen.

Het doel van dit promotieonderzoek was daarom gericht op het onderzoeken van de rol van het immuunsysteem in dit pathofysiologische proces, verantwoordelijk voor het optreden van vaatwandveranderingen. Deze nieuw verkregen inzichten werden toegepast bij de ontwikkeling van immuun modulerende therapieën in preklinische modellen. De belangrijke bijdragen van de verschillende delen van het immuunsysteem aan het ontstaan van vaatwandveranderingen in de klinische en preklinische situaties worden besproken in **hoofdstuk 1**. Het preklinisch screenen en testen van immuun modulerende therapie-effectiviteit is een belangrijke stap naar de klinische toepassing van dergelijke interventies ten tijde van PCI of coronaire arteriële bypass graft (CABG) operaties, om het ontstaan van vaatwand veranderingen en daarmee de noodzaak van re-interventies te voorkomen. Inzicht in de uitgelokte immuunreactie tijdens vasculaire ingrepen, zowel in de muis als in de mens, ligt aan de basis van de ontdekking en toepassing van nieuwe therapieën met de maximale klinische potentie.

Hoofdstuk 2 biedt een overzicht van de immuunreacties van het aangeboren en verworven immuunsysteem die plaatsvinden tijdens het ontstaan van atherosclerose en uitgelokt worden door revascularisatie procedures. Specifieke leukocyten receptoren, liganden, co-stimulatoire moleculen en ontstekingsmediatoren zoals cytokines, worden belicht. De nadruk ligt op hun rol bij het ontstaan en de progressie van de ontstekingsreactie in de vaatwand. Bovendien wordt hun associatie met de ernst van het ziekteproces beschreven, onafhankelijk van de traditionele risicofactoren zoals roken en hypertensie. Op basis hiervan zouden zij geschikt kunnen zijn om te dienen als biomarkers voor ziektestratificatie en diagnose. Hieronder valt hun geschiktheid om te dienen als markers voor patiënten die geïntensifieerde zorg behoeven, gericht op klinici die in deze patiëntengroep revascularisatie procedures uitoefenen. Daarnaast zouden dergelijke toekomstige biomarkers nuttig kunnen zijn voor het beoordelen van therapie-effectiviteit, hetgeen met de huidige meetbare risicofactoren, zoals plasma lipoproteïnen, niet mogelijk is. Plasmametingen verdienen de voorkeur boven metingen uitgevoerd ter plaatse van en tijdens angioplastiek. Desondanks kunnen lokale markers in de vaatwand op dit punt ook additionele informatie opleveren om de ernst van de laesies optimaal in te kunnen schatten. De

continue zoektocht naar nieuwe biomarkers is daarom essentieel. Met name markers van ontsteking, die causaal gerelateerd zijn met post-interventionele vasculaire veranderingen, bieden de meeste potentie en zijn van grote waarde voor klinici.

Hoofdstuk 3 illustreert dat het onderzoeksmatig screenen van therapeutische effectiviteit van medicamenteuze therapieën tegen vasculaire veranderingen en het optreden van versnelde atherosclerose niet mogelijk zou zijn zonder preklinische modellen. Zij bootsen de klinische situatie na vasculaire interventies optimaal na. Dit is niet slechts het geval op het gebied van anatomische aspecten van het vat zoals grootte, diameter en vaatwanddikte, maar ook in kenmerken van ziektestadia, conventionele risicofactoren en andere factoren voor atherosclerose. Voorts worden de gehumaniseerde muismodellen besproken die de pathofysiologische reactie, zoals deze optreedt ten tijde van restenose, alsmede de vasculaire veranderingen en versnelde atherosclerose het dichtst benaderen. Verscheidene vasculaire interventies in transgene muismodellen worden belicht met de sterkste focus op het arteria femoralis cuff model. Om effecten van lokale medicamenteuze therapie te kunnen bestuderen dienen de dieren ontvankelijk te zijn voor de specifieke therapie, maar behoren zij daarnaast ook een vergelijkbare metabole status, coaguloir fenotype en reactievermogen te hebben gelijk aan de mens. De toepassing van transgene muismodellen heeft de vergelijkbaarheid van humane en muislaesies sterk vergroot en daarmee de translatie van nieuwe therapieën richting de kliniek. Daarnaast hebben mechanistische en pathofysiologische studies aangetoond dat lokale vaatwand ontsteking, proliferatie en proteolyse centraal staan in het optreden van post-interventionele vaatwand veranderingen. Om deze redenen werd geconcludeerd dat sterk reproduceerbare diermodellen voor post-interventionele vaatwand veranderingen essentieel zijn voor het bestuderen van het ontstaan van restenose en het vinden van nieuwe medicamenteuze therapieën. Specifieke onderdelen van het immuunsysteem en hun geschiktheid om te dienen als doel van immuunmodulerende therapie worden tevens besproken. Vasculaire veranderingen worden geïnitieerd door schade aan het endotheel en aan de onderliggende atherosclerotische plaque tijdens ballon inflatie, stent positioneringen of de chirurgische procedure tijdens het prepareren van het bypass vaatsegment. Blootstelling van onderliggend trombose materiaal aan circulerend bloed geeft plaatjesadhesie, activering en trombusvorming, wat voor aantrekking van leukocyten naar het beschadigde vaatsegment zorgt. Plaatjesactivering en binding wordt ondersteund door de aanwezigheid van fosfatidylserine (PS) op geactiveerde en apoptotische cellen.

Hoofdstuk 4 toont een therapeutische rol aan voor het PS-bindende annexine A5 eiwit tegen vasculaire inflammatie, verdikkingen en disfunctie in verschillende muismodellen voor versnelde atherosclerose. Aangetoond werd dat annexine A5 injecties resulteren in een significante reductie van inflammatoire cytokine concentraties in plasma en daarmee de aantrekking van inflammatoire cellen naar de vaatwand na chirurgische interventie. Dit gaf uiteindelijk een verminderde intimale hyperplasie en ging gepaard met minder tekenen van plaque instabiliteit. Ondanks dat het niet volledig duidelijk werd waarom annexine A5 aanleiding gaf tot deze effecten, kon wel worden aangetoond dat annexine A5 functioneert via de aanhechting van leukocyten aan gebonden trombocyten en dat het de hierop volgende inflammatoire respons kan voorkomen. Deze bevindingen breiden de rol van annexine A5 uit als regulator eiwit van inflammatoire processen met een therapeutische toepassing in

inflammatoir-gedreven vaatziekten.

In **hoofdstuk 5** werd aangetoond dat er een sterke associatie bestaat tussen genetische polymorfismen in het humane annexine A5 gen en een toegenomen risico op het ontwikkelen van restenose bij patiënten die PCI ondergaan. Deze associatie werd gevonden bij 866 patiënten uit de GENDER studie. Binnen één jaar na PCI ontwikkelde 295 patiënten hiervan restenose, terwijl 571 patiënten vrij bleven van herhaalde klachten. Ondanks dat een sterke associatie bestaat, is hiermee nog niet bewezen dat er een direct causaal verband bestaat tussen deze polymorfismen en klinische uitkomsten. Om het inzicht hierin te vergroten zouden plasmametingen uitgevoerd kunnen worden naar de concentratie van circulerend annexine A5 bij deze patiënten. Verlaagde annexine A5 concentraties zijn immers al eerder gerelateerd aan een toegenomen ernst van coronairsclerose, terwijl verhoogde plasma niveaus meetbaar zijn na een myocard infarct. Desalniettemin tonen deze resultaten wel aan dat het annexine A5 genotype zou kunnen dienen als risicomarker voor het ontstaan van restenose na PCI. Deze resultaten tonen een hoge diagnostische en therapeutische potentiële waarde aan voor annexine A5 tegen PCI-geïnduceerde vaatwand veranderingen.

Hoofdstuk 6 beschrijft het proces van optimalisatie van het natuurlijk voorkomende en beschermende anti-phosphorylcholine (PC) T15/E06 IgM antilichaam naar een recombinant chimeer IgG antilichaam. Opmerkelijk genoeg gingen de beschermende effecten van het voorkomen van geoxideerd LDL (oxLDL) cholesterol opname door macrofagen met scavenger receptoren verloren na de transitie van een IgM naar een IgG antilichaam. Ondanks dit verlies was het recombinante anti-PC T15 IgG antilichaam effectief in het remmen van de monocyt-chemotactische eiwit (MCP)-1 expressie door macrofagen. Ook kon met passieve immunisatie van dit antilichaam versnelde atherosclerose vorming in gecuffde hypercholesterolemische muizen sterk geremd worden. Deze resultaten suggereren dat de inflammatoire reactie op oxLDL voorkomen wordt zonder dat het chimeer antilichaam een remming geeft van oxLDL opname. Wellicht komt dit door het maskeren van dit immunogene epitoom of door het stimuleren van de degradatie ervan en hiermee de verwijdering uit de circulatie. Volledig humane IgGs werden verkregen met behulp van phage display selectie van PC-specifieke fagen. Deze waren wel in staat om oxLDL opname door macrofagen te blokkeren en de MCP-1 expressie te remmen. Een selecte groep antilichamen werd in vivo getest en dit leverde het potente volledige humane monoclonale anti-PC T15 IgG (M99-B05) antilichaam op, dat zeer effectief was in het voorkomen van intimale verdikking in gecuffde hypercholesterolemische muizen. Deze studie bevestigt de bevindingen uit eerdere studies dat PC als een veelbelovende therapeutisch doel kan functioneren om versnelde atherosclerosevorming te voorkomen en te behandelen. Het unieke aan deze studie is echter dat er voor het eerst volledig humane anti-PC IgG antilichamen geproduceerd zijn die een atheroprotectieve functie hebben. Eerdere onderzoekers hebben anti-PC IgM antilichamen passief toegediend of muizen anti-PC IgM opgewekt via actieve immunisatie. Dit zijn veelbelovende technieken, maar zijn niet klinisch toepasbaar en eerdere actieve immunisatie met een pneumococcon-polysacharride vaccin gaf onvoldoende plasma titers van oxLDL-specifieke anti-PC antilichamen. In onze studie werden echter recombinante monoclonale anti-PC IgG antilichamen ontwikkeld, gescreend en getest welke geschikt zijn voor passieve therapeutische immunisatie in patiënten. Door

het verzorgen van directe en acute controle over de immunoreactie van de patiënt, specifiek voor één enkel immunogeen epitoom, kan deze immunisatie aanpak als een effectieve therapie dienen tegen post-PCI atherosclerotische vasculaire veranderingen.

De belangrijke rol van het aangeboren immuunsysteem werd bevestigd in **hoofdstuk 7**. In dit hoofdstuk werd in het arteria femoralis cuff model een nieuw ontwikkelde duale toll-like receptor (TLR) 7 en 9 antagonist getest. TLRs vormen een zeer belangrijk onderdeel van het aangeboren immuunsysteem en functioneren als pathogene herkenningsreceptoren (PRRs). Zij herkennen in deze functie zowel extracellulaire liganden die voorkomen op bacteriën en virussen (TLR2, 4 en 5), alsmede intracellulaire (endogene) liganden zoals beschadigd of viraal (dubbelstrengs) RNA (TLR3, 7 en 9). Deze endogene liganden kunnen vrijkomen na weefselschade of stress, zoals optreedt tijdens PCI procedures. Aanwezigheid van TLR7 en TLR9 werd aangetoond in de gebieden met uitgesproken macrofagen accumulatie in vasculaire laesies. In vitro reageerden deze cellen op TLR7 of TLR9 stimulatie met een toegenomen opname van oxLDL en secretie van tumor necrosis factor (TNF) α , wat voorkomen werd door simultane incubatie met de nieuwe inhibitor. Na cuff plaatsing in vivo leidden deze effecten tot een afname van de intimale verdikking. De bijdrage van individuele TLR signalering is nog onduidelijk, maar de therapeutische potentie van het remmen van TLR7 en TLR9 om het ontstaan van restenose en versnelde atherosclerose te voorkomen is duidelijk aangetoond. Aangezien TLRs gemakkelijk benaderbaar zijn voor circulerende medicijnen (direct of na cellulaire opname) en de eerste verdedigingslinie vormen van het aangeboren immuunsysteem, zijn zij geschikte therapeutische doelen voor medicamenteuze inhibitie of stimulatie tijdens de acute fase van vaatwand beschadiging. Nieuwe inhibitoren kunnen zo ontwikkeld worden dat zij de gewenste eigenschappen bezitten, terwijl ze specifiek gericht zijn tegen de gewenste TLRs. Tevens kunnen zij ontwikkeld worden met specificiteit voor meerdere receptoren, waardoor hun effectiviteit sterk kan toenemen, zoals werd aangetoond in deze studie.

In **hoofdstuk 8** werd de bijdrage van het verworven immuunsysteem onderzocht bij het optreden van post-interventionele atherosclerotische vaatwand veranderingen, door de rol van CD4⁺ T lymfocyten en CD28-CD80/86 co-stimulatoire moleculen te onderzoeken. Post-interventionele vasculaire veranderingen waren significant geremd in CD4^{-/-} en CD80^{-/-}CD86^{-/-} muizen. Om aan te tonen dat cytotoxic T-lymfocyt-antigen (CTLA)-4 een vitale factor is in de fysiologische co-stimulatie en betrokken is bij de T cel reacties tijdens vaatwand veranderingen, ontvingen controledieren injecties met abatacept. Dit gaf aanleiding tot een verminderde intimale verdikking. Deze methode werd herhaald in hypercholesterolemische ApoE3*Leiden muizen en gaf vergelijkbare opmerkelijke resultaten. Flow cytometrie analyse van geactiveerde lymfocyten in de milt en drainerende lymfeknopen toonde aan dat door abatacept de activering van CD4⁺ T cellen voorkomen werd en dit leidde tot een afname van de hoeveelheid regulatoire T cellen in de milt. De ratio tussen effector en regulatoire T cellen werd echter niet veranderd ten opzichte van de controledieren. Abatacept gaf geen aanleiding tot verschillen in cellulaire activeringsstatus in de drainerende lymfeknopen, hetgeen voor een systemische werkzaamheid pleit. Deze bevindingen werden later gecorreleerd met afgenomen plasma concentraties van interferon γ in dieren die met abatacept waren behandeld. De rol van CTLA-4 co-inhibitie in dit

proces werd uiteindelijk bevestigd door de behandeling van ApoE3*Leiden muizen met blokkerende anti-CLTA-4 antilichamen, afkomstig uit hybridoma's, die daardoor significant grotere laesies ontwikkelden. Immuun-gemedieerde interventies gericht op het therapeutisch controleren van de inflammatoire T cel reactie, zoals met abatacept, worden in een breed scala toegepast in andere immuunafwijkingen, waaronder reumatische ziekten. Deze interventies kunnen nu ook toegepast worden in de acute fase na vasculaire interventies om hierop volgende vaatwandveranderingen te voorkomen. Abatacept is een geregistreerd medicijn met een bewezen effectiviteit en veiligheid in patiënten. Toepassing hiervan kan de benodigde tijd voor de translatie van bench-to bedside sterk reduceren. Ondanks dat initiële positieve effecten geobserveerd zijn, moeten deze gereproduceerd worden op lange termijn na langdurige toepassing voordat abatacept klinisch toegepast zou kunnen worden. Daarnaast dienen de effecten op andere celtypen die CD28 tot expressie brengen, zoals B lymfocyten. Ondanks deze eisen heeft de huidige studie laten zien dat CD4 T cellen en de CD28-CD80/86 co-stimulatie een belangrijke rol spelen bij de inflammatoire reactie die optreedt als onderdeel van het verworven immuunsysteem na vasculaire interventies in vivo.

In **hoofdstuk 9** laten drie grote individuele prospectieve studies zien dat een significante associatie bestaat tussen het -2481C allel in de promotor regio van het P300/CBP-geassocieerde factor (PCAF) gen en een toegenomen overleving na PCI vanwege minder restenose. Dit suggereert dat de effecten van dit allel op deze klinisch eindpunten het resultaat kunnen zijn van de betrokkenheid van PCAF bij het optreden van inflammatoire en proliferatieve processen. De resultaten bieden geen inzicht in de mogelijke causale rol van dit polymorfisme bij de ontwikkeling van restenose, maar ondersteunen wel het concept dat epigenetische processen onder genetische controle staan. Tevens suggereren deze studies dat, anders dan de effecten van het milieu, genetische variatie in genen (die coderen voor K lysine acetyltransferasen (KATs)) mede het risico bepalen op het optreden van cardiovasculaire ziekten en sterfte. Het blijft tot op dit moment onduidelijk of de gevonden SNP functionele invloed heeft op de transcriptie en regulatie van PCAF. Op voorwaarde dat deze SNP een effect heeft op PCAF transcriptie of resulterende eiwit niveau, zou dit een sterk effect kunnen betekenen op de cellulaire expressie van genen, welke geaccumuleerd over vele jaren een verschil kan opleveren in uitkomst op cardiovasculair gebied. Tot het moment waarop dit bevestigd kan worden, kan deze SNP dienen als risicomarker voor mortaliteit en restenoserisico in patiënten die PCI ondergaan. Daarnaast biedt de SNP inzicht in de betrokkenheid tussen PCAF en vasculaire veranderingen, waarvan de exacte rol verder onderzocht werd in de volgende hoofdstukken.

Hoofdstuk 10 beschrijft het onderzoek dat uitgevoerd is naar de causale rol van PCAF bij de regulatie van de inflammatoire reactie, die leidt tot post-interventionele atherosclerotische vasculaire veranderingen. In het onderzoek komt naar voren dat PCAF de expressie van MHC klasse II, maar niet I, door macrofagen reguleert via klasse II-transactivator (CIITA) en in toegenomen mate tot expressie komt in de vaatwand in de vroege periode na vasculaire beschadigingen op zowel mRNA als eiwit niveau. Voorts werd aangetoond dat post-interventionele vasculaire veranderingen sterk verminderd waren in PCAF^{-/-} muizen, evenals de vorming van versnelde atherosclerose in hypercholesterolemische muizen die behandeld werden met de na-

tuurlijke PCAF-remmer garcinol. Daarnaast kwam naar voren dat een verminderde inflammatoire reactie, ten gevolge van kortdurende garcinol therapie, ten grondslag lag aan deze afgenomen intimale verdikking. Dit kwam mogelijk doordat garcinol de expressie van MCP-1 en TNF α , geproduceerd door inflammatoir gestimuleerde SMCs en macrofagen, sterk deed verminderen. Ondanks dat de rol van PCAF in de regulatie van inflammatie duidelijk is en dat PCAF betrokken is bij macrofagen aantrekking, activering en cytokine expressie, dient de specificiteit van garcinol voor PCAF in dit proces verder verduidelijkt te worden. Garcinol is uiterst potent en kan de activiteit van PCAF binnen 3 minuten inactiveren *in vitro*, maar beïnvloedt ook de expressie van andere genen en kan in hoge concentraties apoptose veroorzaken. Dit volgde ook uit andere (ongepubliceerde) experimenten in het arteria femoralis drug-eluting cuff model, waarbij de anti-inflammatoire effecten van kortdurige garcinol toepassing om PCAF te remmen verloren ging bij langdurige blootstelling van de vaatwand aan garcinol. Dit benadrukt de noodzaak van verder onderzoek naar nieuwe en potente PCAF remmers die niet zoveel, of niet in een dergelijke ernstige mate, bijwerkingen geven als garcinol. Pas dan kan PCAF inhibitie effectief worden toegepast in de kliniek. Desalniettemin tonen deze resultaten een regulatie aan van de inflammatoire reactie door een epigenetische factor in de acute fase volgend na interventie en belichten PCAF als een causale factor in dit proces.

De rol van PCAF in inflammatie en vasculaire verandering is verder onderzocht in **hoofdstuk 11**, waar PCAF^{-/-} muizen een verminderde mate van arteriogenese lieten zien na acute arteriële occlusie. Dit proces, een vorm van collaterale arteriegroei uit pre-existente arteriolen van een geoccludeerde arterie, wordt geïnduceerd door een toename in flow en shear-stress en is erg afhankelijk van de activering van circulerende inflammatoire cellen. Met behulp van een achterpoot ischemie muismodel, gebaseerd op een chirurgisch geïnduceerde acute arteria femoralis occlusie, werd de vitale betrokkenheid van PCAF in dit proces aangetoond. PCAF^{-/-} muizen lieten een verminderde inflammatoire reactie zien met afname van geactiveerde dendritische cellen, T cellen en cytokine expressie *in vivo*. Dit was ook het geval na een gift lipopolysaccharide *ex vivo*. Ondanks dat verder onderzocht dient te worden welke inflammatoire genen en in welke mate deze door PCAF gereguleerd worden, is aangetoond dat PCAF causaal betrokken is bij post-interventionele vaatwand veranderingen. PCAF regulatie van inflammatoire gen transcriptie vindt plaats in meerdere cel types van zowel het aangeboren als verworven immuunsysteem, inclusief antigeen presenterende cellen, lymfocyten en gladde spiercellen. Door een regulerende functie uit te oefenen in de acute inflammatoire reactie beïnvloedt PCAF met name pro-inflammatoire genen. PCAF functioneert hierbij als centrale factor met intrinsieke histon acetyltransferase activiteit. Dit kan klinici een interessante controleerbare epigenetische factor bieden als doel voor anti-inflammatoire preventieve therapie. Behandeling gericht op expressie van een dergelijke epigenetische factor zoals PCAF zou daarom wellicht effectiever zijn in het voorkomen van vasculaire veranderingen dan therapie gericht op een enkel gen of eiwit.

Hoe gaan we verder met deze nieuwe veelbelovende therapieën?

Het doel van dit promotieonderzoek was om de rol van het immuunsysteem in het pathofysiologische proces, wat leidt tot de ontwikkeling van post-interventionele atherosclerotische vaatwand veranderingen, te onderzoeken. Dit onderzoek heeft

meerdere nieuwe therapeutische toepassingen opgeleverd die vertaald kunnen worden naar de kliniek binnen niet afzienbare tijd. Ondanks dat dergelijke tijdsindicaties per definitie speculatief zijn, is het onjuist om zich niet aan dergelijke voorspellingen te wagen. Daarnaast is het contraproductief om veelbelovende vindingen niet verder uit te zoeken, enkel omdat de translatie naar de kliniek mogelijk erg lang kan duren. Abatacept is een reeds geregistreerde medicamenteuze therapie voor de behandeling van reumatoïde artritis en kan in een relatieve korte tijd (<1 jaar) getest worden tijdens revascularisatie technieken, op voorwaarde dat de therapeutische effectiviteit bevestigd wordt in langdurige dierstudies. Annexine A5, recombinante monoclonale X19-A05 anti-PC IgG antilichamen en onze nieuwe TLR7/9 antagonist zijn getest en effectief bevonden in onze diermodellen, maar voordat gestart kan worden met klinische toepassing behoeven zij extra onderzoek naar de effectiviteit en veiligheidsprofielen. Dit zou voltooid kunnen worden binnen de nabije toekomst (<2 jaar). De PCAF resultaten hebben een nieuwe factor geïdentificeerd die betrokken is bij post-interventionele vasculaire veranderingen en heeft nog extra onderzoek voordat patiënten die PCI of CABG-chirurgie ondergaan een 'anti-PCAF pil' kunnen ontvangen. Om inzicht te geven in mogelijke bijwerkingen dienen in het bijzonder de genen onderzocht te worden die naast CIITA en NFκB door PCAF modulering beïnvloed worden. Wanneer dit voltooid is kunnen nieuwe PCAF modulatoren worden ontwikkeld (bijvoorbeeld via phage display selectie) met de optimale en gewenste medicamenteuze eigenschappen (<3-4 jaar). Het promotieonderzoek heeft in grote mate voldaan aan de doelstellingen die gesteld werden in hoofdstuk 1. Dit is te danken aan een goede samenwerking tussen vele afdelingen binnen het LUMC en farmaceutische partners. Dergelijke samenwerkingsprojecten dienen dan ook optimaal en continu nagestreefd te worden om patiëntresultaten te verbeteren en de morbiditeit en mortaliteit in klinieken wereldwijd te reduceren.