



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Modulation of Atherothrombotic Factors: Novel Strategies for Plaque Stabilization

Bot, I.

Citation

Bot, I. (2005, September 22). *Modulation of Atherothrombotic Factors: Novel Strategies for Plaque Stabilization*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3296>

Version: Corrected Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3296>

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

Nederlandse Samenvatting

Hart- en vaatziekten zijn nog steeds de meest voorkomende doodsoorzaken in de westerse wereld en manifesteren zich onder andere door een hartinfarct of beroerte. De oorzaak van deze klinische manifestaties is het scheuren, ook wel ruptuur, van een vaatvernauwing (de zogenaamde atherosclerotische plaque), die zich gedurende de levensloop heeft ontwikkeld in de kransslagaderen van het menselijk lichaam.

Atherosclerose ontstaat na verandering in de endotheellaag van een slagader, waardoor ontstekingscellen aan de vaatwand kunnen hechten en zich in de vaatwand kunnen ophopen. Deze ontstekingscellen kunnen cholesterol en lipiden opnemen, waardoor een beginnende atherosclerotische plaque ontstaat. Gedurende de ontwikkeling van de plaque accumuleren er steeds meer lipiden in de kern en vormt zich over deze kern een kapsel dat bestaat uit spiercellen en fibrotisch materiaal. Als de balans tussen de lipidenkern en de stevigheid van het fibrotisch kapsel verstoord raakt, kan het kapsel scheuren. Dit gebeurt meestal in de wat zwakkere "schouder" van de plaque, die aan de hoogste mechanische krachten wordt blootgesteld. Als een plaqueruptuur plaatsvindt, wordt de zeer trombogene inhoud van de lipidenkern blootgesteld aan de bloedcirculatie, waardoor de bloedstolling geactiveerd wordt. Activatie van de bloedstolling kan leiden tot de vorming van een bloedstolsel, een zogenaamde trombus, wat de uiteindelijke oorzaak is van de levensbedreigende gevolgen van atherosclerose.

Verminderde stabiliteit van de plaque is cruciaal voor het ontstaan van plaqueruptuur en de klinische gevolgen daarvan. In dit proefschrift hebben we ten eerste geprobeerd om de weerstand van een atherosclerotische plaque tegen ruptuur te bevorderen en ten tweede, om nieuwe factoren te identificeren die de atherosclerotische plaque destabiliseren en zo het risico op de vorming van een trombus vergroten.

Dit proefschrift is opgebouwd uit twee gedeeltes. In het eerste deel wordt vooral de bijdrage van extracellulaire matrix en cellulaire homeostase aan plaque stabiliteit bestudeerd, terwijl in het tweede gedeelte het accent ligt op het effect van ontstekingsprocessen op de stabiliteit van atherosclerotische lesies. Zo hebben we in hoofdstuk 2 het effect bepaald van toediening van

de virale serine protease remmer Serp-1 op de ontwikkeling van een atherosclerotische plaque. In deze studies hebben we gebruik gemaakt van een model voor versnelde plaquevorming door plaatsing van een siliconen manchet rond de halsslagaders van een atherosclerose-gevoelige muis, de ApoE deficiënte muis. De protease remmer Serp-1 grijpt aan op het stollingsstelsel en de fibrinolyse door remming van bepaalde plasminogeen activatoren en hun receptoren. Deze factoren zijn aanwezig in de atherosclerotische plaque en kunnen mede verantwoordelijk zijn voor het instabieler worden van deze plaque. In deze studie laten we nu zien dat continue toediening van Serp-1 gedurende 4 weken de ontwikkeling van een atherosclerotische plaque inderdaad remt. Tevens werd aangetoond dat Serp-1 toediening gepaard gaat met een verlaging van de hoeveelheid ontstekingscellen in de behandelde plaques en met een verhoging van het collageengehalte, hetgeen erop wijst dat het de stabiliteit van de plaque gunstig heeft beïnvloed. Ook in vergevorderde plaques leidde toediening van Serp-1 tot een verhoogde stabiliteit. De progressie van de plaque werd geremd door Serp-1, waarbij het tevens de hoeveelheid gladde spiercellen en het gehalte collageen verhoogde.

Apoptose, geprogrammeerde celdood, heeft in de atherosclerotische plaque een belangrijke invloed op de stabiliteit. Zo kan apoptose van gladde spiercellen in het fibrotische kapsel de plaque ontvankelijker maken voor ruptuur, terwijl apoptose van endotheelcellen kan leiden tot plaque erosie, een proces waarbij uiteindelijk ook een bloedstolling kan ontstaan. Apoptose van een belangrijke ontstekingscel, de macrofaag, kan verschillende effecten hebben op plaque ontwikkeling. Aan de ene kant produceren macrofagen pro-inflammatoire mediators (cytokines) en enzymen, die plaque stabiliserende matrix componenten, zoals collageen, kunnen afbreken. Remming van de productie van deze factoren zou dus een plaque stabiliserende uitwerking kunnen hebben. Aan de andere kant resulteert apoptose van macrofagen in een verhoogde vorming van zogenaamde "apoptotische blaasjes" in de plaque, die een grote hoeveelheid geactiveerd Tissue Factor (TF) bevatten, wat op zijn beurt de bloedstolling activeert. Ook zorgt apoptose van macrofagen voor extra depositie van lipidenmateriaal in de kern, waarbij deze in omvang toeneemt. In hoofdstuk 3 hebben we de rol van twee "cross-class" protease remmers, CrmA en Serp-2, op de atherosclerotische plaqueontwikkeling in verschillende diermodellen onderzocht. Deze eiwitten remmen Interleukin-1 β Convertering Enzyme (ICE), ook wel bekend als caspase-1, en Granzyme B, die beiden betrokken zijn bij de inductie van apoptose en ontstekingsprocessen. Tot onze verrassing bleek dat Serp-2, maar niet CrmA en twee inactieve varianten van Serp-2, de ontwikkeling van atherosclerose in muizen en ratten kon remmen. *In vitro* studies toonden aan dat Serp-2 niet alleen een potente remmer is van ICE en Granzyme B, maar ook van perforin, een porie-vormend eiwit uit lymfocyten, dat in combinatie met Granzyme B apoptose induceert.

Naast apoptose en matrix-materiaal degradatie is ook de grootte van de kern van de plaque een zeer belangrijke factor die stabiliteit en trombogeniciteit van de lesie beïnvloedt. De omvang van de lipidenkern bepaalt, tesamen met de dikte van het fibrotische kapsel, de gevoeligheid van de plaque voor ruptuur en tevens de klinische uitkomst daarvan. Een van de componenten, die aanwezig is in de kern van humane plaques, is het zeer trombogene lipide lysofosfatidaat (LPA). In hoofdstuk 4 hebben we onderzocht of LPA ook in de muis gedurende de plaqueontwikkeling accumuleert in de vaatwand. Inderdaad bleek de hoeveelheid LPA, die in de kern van de plaques ophoopte gedurende de atherogenese in LDL receptor deficiënte muizen, vergelijkbaar te zijn met die in humane plaques. In dit hoofdstuk laten we ook zien dat de homeostase van LPA verandert naarmate plaqueontwikkeling vordert: de expressie van verschillende sleutelenzymen in de aanmaak van LPA, zoals cPLA2IVa en PLD₃, bleek verhoogd, terwijl die van een van de LPA degraderende enzymen, LPAAT α , sterk verlaagd was gedurende de ontwikkeling van de plaque. Deze verschoven enzymatische balans leidt tot een netto accumulatie van LPA in vergevorderde plaques en verklaart daarmee voor een deel de verhoging van het LPA gehalte in de plaques. Daarnaast bleken de expressieniveaus van verschillende LPA receptoren gedurende de atherogenese veranderd, wat kan wijzen op een gewijzigde signaal transductie. Samenvattend: we hebben verschillende genen geïdentificeerd die de stabiliteit en het trombogene karakter van een atherosclerotische plaque kunnen beïnvloeden.

In het tweede deel van dit proefschrift hebben we de invloed van ontstekingsprocessen op atherosclerotische plaqueontwikkeling onderzocht. Atherosclerose wordt algemeen beschouwd als een chronische ontstekingsproces in de vaatwand en het onderdrukken van bepaalde processen van het immuunsysteem zou dus kunnen leiden tot verminderde plaqueontwikkeling. In hoofdstuk 5 is de invloed van een algemeen immuunsuppressief geneesmiddel FK506, dat normaliter voorgeschreven wordt na transplantatie, op atherosclerotische plaquevorming onderzocht. Een veelvoorkomende bijwerking van dergelijke geneesmiddelen is nierschade. Teneinde deze nierschade te voorkomen, is het effect bestudeerd van een lage dosis FK506 (0.05 mg/kg/dag) op de versnelde plaqueontwikkeling in de halsslagaders van ApoE deficiënte muizen. Behandeling met een lage dosis FK506 leidde, zowel tijdens plaque ontwikkeling en nadat de plaques zich reeds hadden gevormd, tot een verminderde plaque progressie en tot een verhoging van de stabiliteit van de plaques. Dit laatste manifesteerde zich vooral door een verhoging van het collageengehalte van de plaque en een verkleining van de necrotische kern. Ook bleek een lage dosis FK506 de vorming van spontane atherosclerose in de aortaboog van deze muizen te remmen. De lage FK506 concentratie in het bloed van deze muizen bleek in de vaatwand voldoende voor effectieve remming van de activatie van NFAT, een transcriptiefactor die de expressie van pro-inflammatoire cytokines zoals IFN γ en IL-2 reguleert.

Niet alleen de vaatvernauwende plaque, maar ook het omringende weefsel, de zogenaamde adventitia, draagt bij aan de ontwikkeling van atherosclerose. Een verhoogde ontsteking van deze adventitia leidt dan ook tot progressie van atherosclerose. Het aantal mestcellen, een specifieke ontstekingscel betrokken bij allergische reacties, in de adventitia blijkt bijvoorbeeld te correleren met het stadium van de atherogenese en ernstig verhoogd te zijn in geruptureerde plaques. In hoofdstuk 6 is het effect beschreven van geactiveerde mestcellen in de adventitia op de morfologie van vergevorderde atherosclerotische plaques van ApoE deficiënte muizen. Activatie van de adventitiale mestcellen resulteerde in een sterke toename van het aantal bloedingen in de plaques. De verhoogde kans op bloedingen ging samen met een stimulatie van macrofaag apoptose, wat *in vitro* geremd kon worden door specifieke mestcel protease remmers alsmede door een histamine H₁-receptor antagonist. Daarbij leidde degranulatie van mestcellen tot vasculaire lekkage, waardoor ontstekingscellen eenvoudiger kunnen infiltreren in de plaque en er meer plaquebloedingen kunnen optreden, gekarakteriseerd door de aanwezigheid van erythrocyten in de plaque. Deze erythrocyten dragen bij aan de destabilisatie van de plaque door depositie van membraangeassocieerd cholesterol, dat, na opname door macrofagen, apoptose kan stimuleren en daarmee de kern van de plaque kan vergroten. Toediening van een geneesmiddel dat mestcellen stabiliseert (cromolyn) tijdens de activatie van de adventitiale mestcellen voorkwam het optreden van plaquebloedingen, wat aangeeft dat mestcel stabilisatie een waardevolle therapeutische benadering zou kunnen zijn ter stabilisatie van atherosclerotische plaques en ter voorkoming van de acute klinische manifestaties.

In hoofdstuk 7 hebben we een nieuwe methodologie beschreven, waarmee de snelheid en efficiëntie van genfunctie onderzoek in ontstekingscellen sterk verbeterd kan worden. Beenmergtransplantatie is een veelgebruikte techniek om de functies van een gen in ontstekingscellen te onderzoeken, maar de voortgang van dit type onderzoek wordt vaak vertraagd door de tijdrovende ontwikkeling van transgene of knockout muizen. Als de uitschakeling van een bepaald gen leidt tot embryonale lethaliteit, is het zelfs onmogelijk om een knockout muis te genereren. In deze studie hebben we de mogelijkheid onderzocht om door middel van transplantatie van met lentivirus getransduceerd beenmerg de genexpressie in de ontvangermuis te moduleren. Hierbij wordt gebruik gemaakt van zogenaamde "short hairpin RNA (shRNA)" sequenties, die de expressie van het gen van interesse kunnen verlagen. In onze studies werd dit concept uitgewerkt voor CC-Chemokine Receptor 2 (CCR2), waarvan al is aangetoond dat het essentieel is voor de migratie van ontstekingscellen naar de ontstekingshaard. We hebben een shRNA sequentie ontworpen die aangrijpt op CCR2 en die zeer efficiënt blijkt in het verlagen van expressie van CCR2 mRNA en eiwit. Na infectie van beenmergcellen met een lentivirus dat een controle of een shCCR2 sequentie bevatte, hebben we deze cellen getransplanteerd naar bestraalde ontvangermuizen. Zeven weken na de transplantatie bleken deze

muizen de shCCR2 sequentie nog steeds in ontstekingscellen tot expressie te brengen, wat leidde tot een aanzienlijk verlaagde CCR2 expressie in macrofagen geïsoleerd uit een ontstoken buikholte. De migratie van ontstekingscellen is in deze muizen dan ook ernstig verlaagd in vergelijking met die in de controle muizen en zelfs verlaagd tot het niveau van muizen, die getransplanteerd waren met CCR2 deficiënt beenmerg. De snelheid en efficiëntie maken deze techniek zeer waardevol voor het bepalen van de rol van verschillende genen van ontstekingscellen in ziekteprocessen zoals atherosclerose.

Samenvattend, dit proefschrift beschrijft het stabiliserende effect van verschillende protease remmers en van het immuunsuppressieve geneesmiddel FK506 op atherosclerotische plaques. Aangetoond is dat het trombogene lipide LPA ook in muizen accumuleert in de plaque gedurende de plaqueontwikkeling en dat het metabolisme en de signaaltransductie van LPA ernstig verstoord zijn. Daarnaast hebben we ook de bijdrage van geactiveerde adventitiële mestcellen aan de destabilisatie van atherosclerotische plaques beschreven. Deze studies geven ons niet alleen nieuwe inzichten in de onderliggende mechanismen van plaquedestabilisatie en het ontstaan van plaquebloedingen, maar voorzien ons ook van nieuwe therapeutische ingangen voor plaque stabilisatie, waardoor plaquebloedingen en ruptuur en daarmee acute cardiovasculaire syndromen kunnen worden voorkomen. Teneinde sneller en efficiënter knockdown muizen te genereren, is een nieuwe geavanceerde technologie ontwikkeld met short hairpin RNA sequenties, waardoor de rol van een bepaald sleutelgen bij ontstekingen geanalyseerd kan worden.