



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **The interplay between cholesterol and inflammation in the evolution of atherosclerosis**

Verschuren, L.

### **Citation**

Verschuren, L. (2009, January 22). *The interplay between cholesterol and inflammation in the evolution of atherosclerosis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13415>

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/1887/13415>

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

## **Nederlandse samenvatting**

Atherosclerose (aderverkalking) is een gecompliceerde en langzaam voortschrijdende ziekte van de vaatwand. Atherosclerose begint wanneer bepaalde witte bloedcellen (monocyten) vanuit de bloedbaan de wand van slagaders binnendringen en daar veranderen in cellen (macrofagen) die vetachtig materiaal opslaan. Deze met vet (voornamelijk cholesterol) gevulde macrofagen hopen zich op tot verdikte plekken in de binnenwand van de slagader. Deze verdikte plekken (atherosclerotische plaques of lesies genoemd) bevatten naast macrofagen ook gladde spiercellen en zijn bedekt met een kap bestaande uit spiercellen en bindweefsel. Plaques kunnen overal vóórkomen, maar ontstaan vooral op plaatsen waar de slagader zich vertakt, waarschijnlijk omdat door de plaatselijke werveling van het bloed de slagaderwand beschadigd raakt, waardoor hier eerder lesies ontstaan.

Het is mogelijk dat een plaque zo sterk aangroeit dat dit kan leiden tot afsluiting van een bloedvat. Echter, de belangrijkste klinische complicaties ontstaan door scheuren van de plaque waardoor de inhoud ervan vrij kan komen en zo aanleiding kan geven tot het ontstaan van een bloedstolsel. Zo'n stolsel kan de slagader verder vernauwen of zelfs afsluiten. Ook kan het stolsel ergens anders een slagader afsluiten. Het afsluiten van een slagader kan leiden tot een hartinfarct of herseninfarct (beroerte). Ondanks de grote vooruitgang in de medische wetenschap is atherosclerose nog steeds de voornaamste ziekte- en doodsoorzaak in de Westerse wereld.

De kans op het ontstaan van atherosclerose is groter bij een hoog cholesterolgehalte in het bloed, roken, hoge bloeddruk, overgewicht, diabetes, weinig lichaamsbeweging en bij ouderen. Om atherosclerose te voorkómen moeten deze risicofactoren worden verminderd, bij voorkeur door dieet of levensstijl, en anders m.b.v. medicijnen.

Een bekende klasse van geneesmiddelen, de zogenaamde statines, is gericht op het verlagen van cholesterol – vooral het slechte LDL (lage dichtheid lipoproteïne) cholesterol – niveaus in de bloedstroom. Echter, ondanks dat ze plasma LDL cholesterol met succes verlagen, kunnen statines de cardiovasculaire complicaties maar bij ongeveer een derde deel van de patiënten voorkomen.<sup>1</sup> Dit wijst erop dat er andere risicofactoren moeten bestaan die verantwoordelijk zijn voor de ontwikkeling van atherosclerose. Recent onderzoek suggereert dat naast de bovengenoemde klassieke risicofactoren, ook ontsteking mogelijk een belangrijke drijvende kracht is bij het atherogene ziekteproces. Echter, op welke manier en in welke mate de ontsteking bijdraagt aan het ziekteproces is niet precies bekend. De studies in dit proefschrift zijn erop gericht daar meer inzicht in te

verkrijgen. Daarbij is vooral gebruik gemaakt van een muismodel voor atherosclerose, de ApoE\*3Leiden (E3L) muis. Dit model vertoont in een aantal opzichten overkomsten met atherosclerose ontwikkeling bij de mens. Een voordeel boven andere muismodellen voor atherosclerose is ook dat de plasma cholesterol concentraties in E3L muizen gemakkelijk zijn te variëren d.m.v. de hoeveelheid cholesterol in het dieet.

Eerst is onderzocht óf en hoe ontsteking een rol speelt in de vroege fase van atherosclerose ontwikkeling in E3L onder invloed van toenemende concentraties cholesterol in het dieet. Vervolgens is op verschillende manieren de afzonderlijke bijdrage van de ontstekingscomponent en de lipiden component op atherosclerose ontwikkeling onderzocht. Er is met name gekeken hoe het aandeel van ontsteking aan het atherogene proces zich verhoudt tot de bijdrage van cholesterol. Ook is onderzocht of remming van de ontsteking daadwerkelijk tot verminderde atherosclerose leidt. Daartoe is een gen uitgeschakeld dat codeert voor een specifieke ontstekingsfactor, MIF (Macrophage migration Inhibitory Factor”), en het effect daarvan op atherosclerose ontwikkeling onderzocht.

In **Hoofdstuk 2** is onderzocht wat het effect is van toenemende concentraties cholesterol in het dieet op de plasmaspiegels van cholesterol en ontstekingsfactoren en de ontwikkeling van atherosclerose in E3L muizen. Er is gevonden dat een relatief lage cholesterol concentratie in het dieet (0.25% w/w) tot een tweevoudige verhoging van cholesterol in plasma leidt, maar niet tot een noemenswaardige stijging van een specifieke marker voor ontsteking, SAA (serum amyloid-A). Als gevolg van dit dieet ontwikkelden E3L muizen na 10 weken een milde vorm van atherosclerose. Verhoging van de hoeveelheid cholesterol in het dieet tot 1.0% (w/w), ging gepaard met een drievoudige verhoging in plasma cholesterol, een drievoudige toename in SAA, en een aanzienlijke versnelling in de ontwikkeling van atherosclerose. Met behulp van speciale analysemethoden waarbij genproducten en metabolieten werden gemeten, gecombineerd met hoogwaardige dataverwerking (bioinformatica) kon inzichtelijk worden gemaakt hoe zo'n hoge cholesterolconcentratie in het dieet tot ontstekingsprocessen in de lever kan leiden. De verkregen resultaten tonen aan dat dietair cholesterol niet alleen gezien moet worden als een risicofactor die tot verhoogde plasma cholesterol spiegels kan leiden maar ook als een ontstekingstimulerende factor moet worden beschouwd en op die manier een dubbele atherogene werking kan uitoefenen.

Vervolgens stond de vraag centraal of de ontwikkeling van atherosclerose geremd kan worden door de ontsteking systemisch (“in het hele lichaam”) of plaatselijk te onderdrukken. Daartoe werden verschillende onderzoeks-benaderingen gekozen. Als eerste werd gebruik gemaakt van verbindingen waarvan bekend is dat ze op bepaalde facetten van het lipiden metabolisme ingrijpen en mogelijk ontstekingsremmende werking bezitten, zoals atorvastatine, fenofibraat, en een LXR-agonist, T0901317. Atorvastatine wordt gebruikt als cholesterol-verlagend geneesmiddel, fenofibraat wordt voorgeschreven aan patiënten voor een daling van bloedlipiden en van de LXR agonist T0901317 is bekend dat het een belangrijke rol speelt in de cellulaire vethomeostase. Om te testen of deze verbindingen naast hun lipiden-modulerende activiteiten ook ontstekingsremmende capaciteit bezitten, is in **Hoofdstuk 3**, gebruik gemaakt van een speciaal ontstekingsmodel, de huCRP transgene muis. In deze muis is een menselijk gen ingebracht dat codeert voor het humane eiwit C-reactive protein (CRP). CRP is een ontstekingsmarker bij de mens, maar komt normaal niet tot expressie in muizen. We lieten zien dat atorvastatine, fenofibraat, en T0901317 zowel de basale als de interleukine-1 (IL-1; een ontstekingsmediator)-geïnduceerde CRP expressie kunnen onderdrukken. De ontstekingsremmende werking van de testverbindingen verliep opvallend genoeg onafhankelijk van de lipiden-modulerende werking van de verbindingen. *In vitro* experimenten werden gebruikt om op te helderen via welk mechanisme deze verbindingen werkzaam zijn.

De vinding dat ontsteking, onafhankelijk van cholesterol, onderdrukt kan worden, werd toegepast in een volgend onderzoek om onderscheid te kunnen maken tussen de bijdrage van enerzijds de lipidencomponent en anderzijds de ontstekingscomponent aan atherosclerose. Voor dit atherosclerose onderzoek maakten we weer gebruik van de E3L muis waarvan bekend is dat cholesterol spiegels in het bloed gemakkelijk reguleerbaar zijn door de concentratie van cholesterol in het dieet aan te passen. Deze eigenschap stelde ons in staat om de cholesterol spiegels van muizen die behandeld worden met een testverbinding te vergelijken met een groep waarin de cholesterol spiegels zijn verlaagd door middel van dieet cholesterol. Door de resultaten van deze twee groepen te vergelijken is het mogelijk om onderscheid te kunnen maken tussen cholesterol-afhankelijke en -onafhankelijke anti-atherogene effecten.

In **Hoofdstuk 4** werd onderzocht wat in het geval van fenofibraat de bijdrage is van remming van de ontstekingscomponent op atherosclerose ontwikkeling. In deze studie werd een dosering van fenofibraat toegepast waarvan in de CRP muis was aangetoond

dat de dosis een sterke ontstekingsremmende activiteit heeft. De bevindingen van deze studie lieten zien dat fenofibraat naast zijn lipidenverlagende effecten ook sterke ontstekingsremmende activiteiten in de E3L muis heeft. Een deel van de anti-atherogene werking van fenofibraat kon worden toegeschreven aan zijn lipidenverlagende werking. Daarnaast liet deze studie zien dat fenofibraat de atherosclerose ook kan onderdrukken door middel van zijn cholesterol-onafhankelijke eigenschappen, zoals de sterke remming van ontsteking.

In **Hoofdstuk 5** werd een atherosclerose experiment in E3L muizen uitgevoerd waarbij een dosis van atorvastatin werd gebruikt waarvan in hoofdstuk 3 was vastgesteld dat deze wel cholesterolverlagend maar niet ontstekingsremmend is. De bevindingen van deze studie tonen aan dat een dergelijke lage dosering van atorvastatin in geval van (ver)gevorderde atherosclerose in de oorsprong van de aorta van E3L muizen voornamelijk remt door middel van zijn cholesterolverlagende activiteit. Echter, in gebieden waar de atherosclerose minder ver gevorderd is (in de aortaboog) heeft de lage dosering atorvastatine wél cholesterol-onafhankelijke anti-atherogene effecten. Een belangrijk ontstekingsgedreven proces in het beginstadium van atherosclerose is de hechting van monocytten aan de vaatwand.<sup>2, 3</sup> Deze studie laat zien dat factoren die bij de hechting betrokken zijn, zoals vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), geremd worden door atorvastatine op een cholesterol-onafhankelijke manier.

Een relatief nieuwe klasse verbindingen met potentieel anti-atherogene werking zijn de liganden van de Liver-X-Receptor (LXR). In hoofdstuk 3 is aangetoond dat de LXR-agonist, T0901317, ondanks zijn hyperlipidemische werking, een sterk ontstekingsremmende werking heeft in de CRP muis.

De bevindingen in **Hoofdstuk 6** laten zien dat ondanks een sterke toename in plasma lipiden, T0901317 de progressie van atherosclerose in E3L muizen kan remmen. De atherosclerose-onderdrukkende werking van T0901317 is voor een groot deel toe te schrijven aan zijn ontstekingsremmende werking in de vaatwand.

T0901317 is ook in staat bestaande atherosclerotische lesies te verminderen ("lesie-regressie"). Onder regressie condities stimuleert T0901317 de verdwijning van macrofagen uit de vaatwand, met als gevolg dat de lesies kleiner worden. De data laten zien dat één van de manieren van T0901317 om regressie te induceren mogelijk via de inductie van een chemokine receptor, CCR7, verloopt. Van CCR7 is in andere experimenten aangetoond dat de aanwezigheid van deze factor essentieel is voor regressie van de lesies.

De resultaten uit de voorgaande hoofdstukken laten zien dat plasma cholesterol en ontstekingsfactoren beide bijdragen aan de ontwikkeling van atherosclerotische plaques. Het bewijs hiervoor werd voornamelijk verkregen door gebruik te maken van verbindingen met een tweeledig karakter, enerzijds lipiden-modulerend van aard en anderzijds ontstekingsremmend.

In **Hoofdstuk 7** werd voor een andere benadering gekozen om de rol van ontsteking in atherosclerose te evalueren. Daartoe werd onderzocht of het uitschakelen van een ontstekings eiwit, Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF), een effect heeft op de ontwikkeling van atherosclerose. Hiervoor hebben we gebruik gemaakt van een ander muismodel voor atherosclerose, de LDLreceptor-deficiënte (Ldlr-/-) muis. Deze muis heeft een pro-atherogeen lipoproteïne profiel vanaf de geboorte en ontwikkelt na verloop van tijd atherosclerose, onafhankelijk van dieet cholesterol. Daarnaast vertoont dit model een fenotype met een obees karakter en kan het insuline resistentie ontwikkelen.<sup>4</sup> Dit muismodel heeft dus een aantal risicofactoren die kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van atherosclerose. Het ontbreken van MIF in Ldlr-/- muizen bleek geen effect te hebben op klassieke risicofactoren zoals cholesterol of triglyceriden niveaus in plasma. Het uitschakelen van deze factor had daarentegen wél effect op de basale én IL-1-geïnduceerde ontsteking. Ondanks gelijk gebleven lipiden niveaus is uit deze studie duidelijk geworden dat de ziekteontwikkeling afneemt wanneer de ontstekingsfactor ontbreekt. In vergelijking met de vorige hoofdstukken, laten de resultaten in dit hoofdstuk zien dat het uitschakelen van slechts één ontstekingsfactor voldoende kan zijn om de ontwikkeling van ontstekingsziekten zoals atherosclerose en insuline resistentie in een muismodel te remmen.

Om te onderzoeken of MIF ook een rol speelt in atherogene processen bij de mens, is in **Hoofdstuk 8** onderzoek verricht naar de betrokkenheid van MIF in atherosclerose en een proces dat hieraan gerelateerd is, namelijk de ontwikkeling van een aneurysma in de aorta. Een aneurysma is een plaatselijke verwijding van de (buik)slagader en kan ontstaan als gevolg van atherosclerose. Vergelijkbaar met de ontwikkeling van atherosclerose, spelen chronische ontstekingsprocessen ook een belangrijke rol in de ontwikkeling van aneurysmata.<sup>5</sup> Analyse van menselijk vaatwand materiaal liet zien dat ten opzichte van normale vaatwand de eiwit- en genexpressie van het ontstekings eiwit MIF verhoogd is in atherosclerotische lesies en aneurysma weefsel. De toename in MIF mRNA expressie in geruptureerde aneurysmata gaat gelijk op met de toename in mRNA expressie van een

aantal specifieke metalloproteinasen (MMPs). MMPs zijn specifieke eiwitten die een belangrijke rol spelen in de afbraak van bindweefsel. Onze data ondersteunen het idee dat MIF uit de macrofaag een belangrijke rol speelt in de afbraak van bindweefsel, een proces dat gedreven is door MMPs en waardoor een vaatwand gevoeliger wordt om te gaan scheuren. MIF is dus niet alleen een belangrijke atherogene factor in muizen, maar de data ondersteunen ook een rol van MIF in de humane vasculaire pathologie.

## Conclusie

De studies in dit proefschrift laten zien dat naast plasma cholesterolspiegels, ook ontsteking een substantiële bijdrage kan leveren aan de progressie van atherosclerose in E3L muizen. De verkregen resultaten tonen tevens aan dat cholesterol uit het dieet op twee manieren kan bijdragen aan atherogenese: in de eerste plaats leidt dit cholesterol tot verhoogde plasma spiegels van atherogene cholesterol deeltjes en in de tweede plaats kan cholesterol ontstekings-componenten induceren.

De studies in dit proefschrift hebben op verschillende manieren aangetoond dat ingrijpen in ontsteking gevolgen heeft voor de ontwikkeling van atherosclerose en dat de effecten onafhankelijk zijn van cholesterol. Interventie strategieën gericht op het verlagen van het “slechte” plasma cholesterol én ontsteking zullen daarom mogelijk effectiever zijn dan therapieën die gericht zijn op lipiden verlaging alleen. Direct bewijs voor deze stelling komt voornamelijk uit dierexperimenteel onderzoek zoals in dit proefschrift beschreven. In hoeverre deze resultaten ook vertaald kunnen worden naar de situatie bij de mens behoeft verder onderzoek.

Een belangrijk aandachtspunt hierbij is ook op welke ontstekingscomponent of ontstekingsproces een dergelijke therapie gericht zal moeten zijn.

## Reference List

- (1) Libby P, Aikawa M. Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets. *Nat Med* 2002 November;8(11):1257-62.
- (2) Lutgens E, Daemen M, Kockx M, Doevendans P, Hofker M, Havekes L, Wellens H, de Muinck ED. Atherosclerosis in APOE\*3-Leiden transgenic mice: from proliferative to atheromatous stage. *Circulation* 1999 January 19;99(2):276-83.
- (3) Fan J, Watanabe T. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2003;10(2):63-71.
- (4) Schreyer SA, Vick C, Lystig TC, Mystkowski P, Leboeuf RC. LDL receptor but not apolipoprotein E deficiency increases diet-induced obesity and diabetes in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002 January;282(1):E207-E214.



- (5) Zerneck A, Bernhagen J, Weber C. Macrophage migration inhibitory factor in cardiovascular disease. *Circulation* 2008 March 25;117(12):1594-602.
- (6) Mora S, Ridker PM. Justification for the Use of Statins in Primary Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin (JUPITER)--can C-reactive protein be used to target statin therapy in primary prevention?. *Am J Cardiol* 2006 January 16;97(2A):33A-41A.
- (7) Hyrich KL, Silman AJ, Watson KD, Symmons DP. Anti-tumour necrosis factor alpha therapy in rheumatoid arthritis: an update on safety. *Ann Rheum Dis* 2004 December;63(12):1538-43.
- (8) Slifman NR, Gershon SK, Lee JH, Edwards ET, Braun MM. *Listeria monocytogenes* infection as a complication of treatment with tumor necrosis factor alpha-neutralizing agents. *Arthritis Rheum* 2003 February;48(2):319-24.
- (9) Funk CD, FitzGerald GA. COX-2 inhibitors and cardiovascular risk. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007 November;50(5):470-9.
- (10) Dixon WG, Symmons DP. What effects might anti-TNFalpha treatment be expected to have on cardiovascular morbidity and mortality in rheumatoid arthritis? A review of the role of TNFalpha in cardiovascular pathophysiology. *Ann Rheum Dis* 2007 September;66(9):1132-6.
- (11) Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwieterman WD, Siegel JN, Braun MM. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med* 2001 October 11;345(15):1098-104.
- (12) Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol* 2008 May;8(5):349-61.
- (13) Athyros VG, Mikhailidis DP, Papageorgiou AA, Bouloukos VI, Pehlivanidis AN, Symeonidis AN, Kakafika AI, Daskalopoulou SS, Elisaf M. Effect of statins and aspirin alone and in combination on clinical outcome in dyslipidaemic patients with coronary heart disease. A subgroup analysis of the GREACE study. *Platelets* 2005 March;16(2):65-71.
- (14) Wald NJ, Law MR. A strategy to reduce cardiovascular disease by more than 80%. *BMJ* 2003 June 28;326(7404):1419.