



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Bioactive lipids as key regulators in atherosclerosis

Bot, M.

Citation

Bot, M. (2009, January 15). *Bioactive lipids as key regulators in atherosclerosis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13407>

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/1887/13407>

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

Nederlandse Samenvatting

De meest voorkomende doodsoorzaak in de westerse samenleving is hart- en vaatziekten met de klinische manifestatie van een hartinfarct of beroerte. Dit ziektebeeld wordt voornamelijk veroorzaakt door dichtslibbing van de grote slagaderen ten gevolge van atherosclerose. De directe aanleiding voor het hart- of herseninfarct vormt het scheuren van deze vaatwandverdikking (oftewel "plaque"), waardoor materiaal vanuit de plaque in direct contact komt met de bloedsomloop. Door lokale activatie van de bloedstolling kan dan een bloedvatafsluiting ontstaan.

Verscheidene risicofactoren dragen bij aan de vorming van een plaque, waarvan de meest belangrijke zijn: verhoogde cholesterolwaarden in het bloed, roken, hoge bloeddruk, overgewicht en weinig lichaamsbeweging. De huidige behandelmethoden zijn voornamelijk gericht op het voorkomen van deze risicofactoren. Voorbeelden hiervan zijn de medicinale behandeling van een te hoog cholesterolgehalte met statines of van een te hoge bloeddruk met bloeddrukverlagers. Verder wordt het advies gegeven om te stoppen met roken en minimaal 30 minuten per dag te bewegen. Ondanks deze maatregelen is de incidentie van hart- en vaatziekten nog steeds aanzienlijk in Nederland en in andere Westerse landen.

Het ontstaan van atherosclerose wordt gekenmerkt door veranderingen in de endotheellaag van een slagader, waardoor deze permeabel wordt voor vetdeeltjes (cholesterol) uit de bloedsomloop. Door ophoping van deze vetdeeltjes in de vaatwand worden ontstekingscellen aangetrokken. Deze ontstekingscellen, en macrofagen in het bijzonder, zijn uitermate geschikt om ongewenste deeltjes zoals het cholesterol en lipiden op te nemen. Echter een verder verblijf in de vaatwand kan het begin zijn van atherosclerotische plaque vorming. Naast macrofagen worden ook T cellen aangetrokken, die de plaqueontwikkeling zowel kunnen stimuleren als remmen. Er bestaan namelijk verschillende populaties van T cellen, die elk een karakteristiek profiel van ontstekings-eiwitten (cytokinen) kunnen uitscheiden. Afhankelijk van de soort T-cel populatie zullen deze het ontstekingsproces in het bloedvat voor- dan wel nadelig beïnvloeden.

Gedurende de verdere ontwikkeling van de plaque accumuleren er steeds meer vetdeeltjes (lipiden), ontstekingscellen en celafval in de vaatwand en vormt zich rond deze kern langzamerhand een kapsel bestaande uit spiercellen en bindweefsel. Als de balans tussen de mate van vetopstapeling en de stevigheid van het kapsel verstoord raakt, kan het beschermende kapsel scheuren. Dit gebeurt meestal in de minder robuuste "schouder" van de plaque, die aan de sterkste 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 leidt vervolgens tot de vorming van een bloedstolsel, een zogenaamde trombus, wat bij totale bloedvatafsluiting de oorzaak is van de levensbedreigende gevolgen van atherosclerose.

Lipiden spelen een zeer grote rol in alle stadia van het ziekteproces. Zoals hierboven beschreven, accumuleren initieel lipoproteïnen en daarin opgeslagen lipiden tijdens de ontwikkeling van atherosclerose in de vaatwand. De lipidesamenstelling van deze lipoproteïnen vertoont een aanzienlijke variatie, waarbij het lage-dichtheids-lipoproteïne (LDL) deeltje rijk is aan cholesterol en bekend staat als het "slechte" cholesterol en het hoge-dichtheids-lipoproteïne (HDL) deeltje als het "goede" cholesterol.

Nederlandse Samenvatting

In het laatste decennium is gebleken dat lipiden niet alleen bijdragen aan het ziekteproces door ophoping in de plaque, maar dat bepaalde lipiden, zowel aanwezig in de bloedsomloop als in de plaque, op eigen kracht processen kunnen beïnvloeden die belangrijk zijn voor de progressie van atherosclerose.

In dit proefschrift worden verschillende studies beschreven, waarin de bijdrage van twee bio-actieve lipiden, lysofosfatidaat (LPA) en sfingosine 1-fosfaat (S1P), aan de ontwikkeling van atherosclerose wordt onderzocht. Deze structureel verschillende lipiden werken beiden via interactie met een familie van gerelateerde receptoren, die tot expressie komen op het celoppervlak van celtypen die betrokken zijn bij (het ontstaan van) atherosclerose. LPA blijkt voor een belangrijk deel verantwoordelijk te zijn voor de stollingsbevorderende werking van LDL, terwijl S1P vooral gedacht wordt bij te dragen aan de anti-atherogene effecten van HDL. In de inleiding (hoofdstuk 1) wordt een beschrijving van de ontwikkeling van atherosclerose en de diverse componenten die bijdragen aan het ziekteproces verstrekt. In hoofdstuk 2 wordt vervolgens dieper ingegaan op de mogelijke rol van LPA en S1P in atherosclerose. In de mens blijkt LPA tijdens het ziekteproces te accumuleren in de plaque. Van de lipiden die vrijkomen bij scheuring van een plaque is vooral LPA verantwoordelijk voor het in gang zetten van de bloedstolling. Om dit proces van ophoping van LPA beter te onderzoeken werd gebruik gemaakt van een genetisch gemodificeerd muizenmodel waarin door plaatsing van licht knellende plastic manchetjes rond de halsslagaders versneld atherosclerose optreedt in dit bloedvat. In hoofdstuk 3 hebben we onderzocht of LPA ook in de muis gedurende de plaqueontwikkeling opstapelt in de vaatwand. Inderdaad blijkt dat in LDL receptor deficiënte muizen de hoeveelheid LPA tijdens de atherogenese vergelijkbaar ophoopt als in humane plaques (van 0.9 naar 37.6 pmol LPA/mg weefsel). Het betreft vooral specifieke varianten van LPA met een hoge stollingsbevorderende werking. Tevens verandert de regulatie van de homeostase van LPA naarmate plaqueontwikkeling vordert. De expressie van verschillende sleutelenzymen in de aanmaak van LPA, zoals cPLA₂IVA en iPLA₂VIA, blijkt in late stadia namelijk verhoogd, terwijl die van één van de LPA degraderende enzymen, LPAAT α , sterk verlaagd is. Het is aannemelijk dat deze verschoven enzymatische balans leidt tot een netto accumulatie van LPA in vergevorderde plaques en hiermee zou de verhoging van het LPA gehalte in de plaque kunnen worden verklaard. Daarnaast blijken de expressieniveaus van verschillende LPA receptoren gedurende de atherogenese veranderd, wat wijst op een verandering in signaaloverdracht. Gesuggereerd kan worden dat een correctie van de betreffende LPA enzymen en receptoren de stabiliteit en het trombogene karakter van een atherosclerotische plaque gunstig kan beïnvloeden.

In hoofdstuk 4, is nader onderzoek verricht naar de lokalisatie van LPA in vergevorderde muizenplaques. Atherosclerotische plaques zijn opgebouwd uit relatief celrijke compartimenten, die vooral gladde spiercellen en leukocyten bevatten en celarme regionen die vermoedelijk vooral bestaan uit lipiden. Visualisatie van de plaque gecombineerd met spatiale molecuulanalyse toonde aan dat LPA en S1P vooral aangetroffen worden in de celarme gebieden van de atherosclerotische plaque, die rijk zijn aan cholesterol. De celrijke compartimenten worden gekarakteriseerd door de aanwezigheid van fosfaten en fosfocholine, die onderdeel zijn van celmembranen. Omdat LPA, naast zijn trombogene werking, ook nog andere celtypen kan beïnvloe-

den die betrokken zijn bij atherosclerose, werden studies uitgevoerd naar de effecten van toediening van LPA op atherosclerose in het muizenmodel. In hoofdstuk 5 wordt het effect beschreven van een verhoogd LPA gehalte in de plaque. Hiertoe werd het LPA via een gel lokaal toegediend ter plekke van de plaque. Deze ingreep blijkt te leiden tot een verhoogde vaatwandlekkage en -bloedingen en tot verminderde plaquestabiliteit. Deels is dit terug te voeren op een verhoogde LPA-geïnduceerde activatie van mestcellen in het vaatweefsel, aangezien de effecten niet optreden in muizen die behandeld waren met een remmer van de mestcelactivatie, cromolyn. Verder resulteert lokale toediening van LPA in een verhoogde aanwezigheid van macrofagen in de plaque. Ook dit effect werd niet waargenomen in met cromolyn behandelde muizen, hetgeen suggereert dat LPA-geïnduceerde mestcelactivatie een belangrijke rol speelt in de rekrutering van macrofagen hoewel ook een direct effect van LPA op macrofagen niet kan worden uitgesloten.

In hoofdstuk 6 is het effect van verhoogde LPA spiegels in de bloedsomloop op de plaqueontwikkeling onderzocht. Het LPA werd daarbij toegediend via injectie in de buikholte. Deze strategie sorteerde geen effect op de ontwikkeling maar wel op de samenstelling van de plaque. Systemische LPA behandeling verhoogt het percentage gladde spiercellen in de plaque met maar liefst 70%. *In vitro* experimenten lieten zien dat LPA de celdeling van gladde spiercellen bevordert hetgeen zou verklaren waarom LPA de hoeveelheid van dit celtype in de plaque verhoogd. Het collageen gehalte, welke ook een maat is voor de plaquestabiliteit, werd daarentegen vermindert door LPA behandeling. Deze schijnbaar tegenstrijdige effecten maken het netto effect van LPA op de plaquestabiliteit dus lastig te interpreteren. Concluderend hebben de studies in hoofdstuk 5 en 6 aangetoond dat een verhoogde aanwezigheid van LPA een grotendeels destabiliserend effect heeft op de plaque, door verhoging van de vaatwandlekkage, het bevorderen van intraplaque bloedingen en verlaging van het collageengehalte van de plaque. Desalniettemin kan niet uitgesloten worden dat sommige effecten van LPA, zoals de proliferatieve respons van gladde spiercellen, ook gunstig zijn voor de plaquestabiliteit. Verder onderzoek naar de effecten van LPA op verschillende celtypen zou kunnen bijdragen aan de kennis van de mechanismen waardoor LPA de plaquestabiliteit beïnvloedt.

In hoofdstuk 7 en 8 worden twee studies beschreven naar de effecten van S1P op de atherosclerose. In de studie uitgevoerd in hoofdstuk 7 bleek toediening van FTY720, welke na fosforylering een synthetische analoog van S1P is, in het transgene muizenmodel voor atherosclerose de plaqueontwikkeling aanzienlijk af te remmen door selectieve onderdrukking van het immuunsysteem. FTY720 is een ontstekingsremmend geneesmiddel, dat momenteel getest wordt in de kliniek ter voorkoming van afstotingsreacties na orgaantransplantatie. In onze studie leidde zowel een hoge als lage dosering van FTY720 tot vermindering in plaqueontwikkeling, waarbij alleen de hoge dosering het aantal circulerende T cellen verlaagde. Aangezien de lage dosering ook leidde tot een vermindering in de plaquegrootte, kunnen we concluderen dat niet alleen de verlaging in het aantal T cellen in de bloedsomloop verantwoordelijk is voor het therapeutische effect van FTY720. Inderdaad blijkt zowel na lage als hoge dosering van FTY720 ook de functie van T cellen verminderd, waarbij een verlaging te zien was in zowel de proliferatieve respons van miltcellen als in de secretie van ontstekingsbevorderende cytokinen, zoals interferon- γ , interleukine

Nederlandse Samenvatting

(IL)-12 en RANTES (“gereguleerd-na-activatie-van-normale-T-cellen-tot-expressie-gebracht-en-gesecreteerd”). Daarbij leidde FTY720 ook tot een anti-atherogeen macrofaagprofiel waarbij deze cellen een verminderde uitscheiding van ontstekingsbevorderende cytokinen zoals tumor necrose factor (TNF)- α , TNF-receptor en IL-6 en een verhoogde uitscheiding van het ontstekingsremmende cytokine IL-1 receptor antagonist (IL-1RA) lieten zien.

De studie beschreven in hoofdstuk 8 toont aan dat ook verhoging van de S1P concentratie door afwezigheid van een afbraakenzym voor S1P (SPL) in ontstekingscellen (beenmergafgeleide cellen) de plaqueontwikkeling aanzienlijk af kan remmen. Deze vermindering in plaqueontwikkeling wordt veroorzaakt door selectieve onderdrukking van het immuunsysteem gecombineerd met een verlaging in de cholesterolconcentratie in het bloed. Zoals eerder aangetoond, is S1P door activatie van de S1P₁ receptor grotendeels verantwoordelijk voor de migratie en distributie van T cellen en daarmee dus voor een correcte T-cel functie. Verstoring van de S1P gradient in de muis door afwezigheid van SPL in ontstekingscellen leidde dan ook, net als FTY720 behandeling, tot een verlaging van het aantal circulerende T cellen en tot verminderde T-cel functie. Daarbij lieten deze muizen een sterk afgezwakte hyperlipidemische respons zien op vetrijk dieet, met als gevolg een aanzienlijk minder atherogeen lipoproteïnenprofiel. Hoogstwaarschijnlijk wordt deze verandering veroorzaakt door een verlaagde vetopname door de dunne darm zoals blijkt uit veranderde darmmorfologie. Verhoging van het endogene S1P blijkt ook te leiden tot een onverwachte verstoring van de macrofaagmigratie, mogelijk te wijten aan een verminderde plasmaconcentratie van het chemokine monocyte chemoattractant protein-1. Daarentegen blijkt de verhoging van endogeen S1P, in tegenstelling tot FTY720 behandeling, niet te leiden tot een anti-atherogeen, maar juist tot een pro-atherogeen macrofaagprofiel dat zich manifesteert in verhoogde secretie of expressie van ontstekingsbevorderende IL-6, IL-12, TNF- α en IL-1 α en verlaagde expressie van ontstekingsremmende IL-10, IL-1RA, iNOS en arginase 1. Deze effecten waren klaarblijkelijk niet voldoende om de bovengenoemde tegen atherosclerose beschermende effecten van T cellen en lipiden profiel teniet te doen.

Hieruit kunnen we concluderen dat stimulering van de signaaloverdracht via S1P invloed kan uitoefenen niet alleen op de mobiliteit en activiteit van lymfocyten en macrofagen maar ook op de vetstofwisseling. Hoewel niet alle effecten gunstig zijn voor de plaqueontwikkeling, resulteert SPL remming netto in een vermindering van atherosclerose. Deze effecten komen overeen met het idee dat S1P bijdraagt aan de anti-atherogene eigenschappen van HDL.

Samenvattend, dit proefschrift bevestigt dat LPA, en met name de hoog-trombogene varianten, tijdens atherosclerose, ook in de muis, in toenemende mate accumuleert in de celarme, lipiderijke delen van de plaque. Aangetoond is dat het metabolisme en de signaaltransductie van LPA toenemend verstoord raken tijdens het ziekteproces, en dat deze effecten kunnen leiden tot een verhoogde intracellulaire LPA aanmaak. Verder leidt LPA toediening ter plekke van de atherosclerotisch vaatwand tot destabilisatie van de plaque, terwijl ook verhoogde bloedspiegel van LPA de stabiliteit van plaqueontwikkeling beïnvloedde, waarbij de vorming van het fibreuze kapsel werd gestimuleerd, maar tegelijk de afzetting van collageenmateriaal in de plaque werd verlaagd. S1P daarentegen blijkt overwegend anti-atherogeen als gevolg van

Nederlandse Samenvatting

effecten op zowel leukocytmigratie en -functie, als effecten op de vetstofwisseling. Concluderend kunnen wij stellen dat LPA kan worden beschouwd als een overwegend pro-atherogeen, en S1P als een voornamelijk anti-atherogeen lipide. Verlaging van LPA en verhoging van S1P kan dus leiden tot een effectieve therapeutische benadering ter vermindering van instabiele atherosclerotische plaque vorming.