



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Targeting the unstable atherosclerotic plaque : diagnostic and therapeutic implications

Segers, F.M.E.

Citation

Segers, F. M. E. (2010, May 6). *Targeting the unstable atherosclerotic plaque : diagnostic and therapeutic implications*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/15348>

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/1887/15348>

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

Nederlandse Samenvatting

Introductie tot atherosclerose

Cardiovasculaire aandoeningen zijn nog steeds de meest voorkomende doodsoorzaak in de Westerse wereld, op de voet gevolgd door kanker. Het Amerikaans Nationaal Centrum voor gezondheidsstatistiek heeft berekend dat als alle vormen van cardiovasculaire aandoeningen konden worden verholpen of genezen, de gemiddelde levensverwachting zal toenemen met 7 jaar. De bekendste vorm van cardiovasculaire aandoeningen zijn adervernauwingen ten gevolge van aderverkalking, een proces dat binnen de wetenschap atherosclerose wordt genoemd.

Atherosclerose is een chronisch ontstekingsproces waarbij de adervernauwingen tijdens de adolescentie ontwikkelen als cholesterolafzettingen in de vaatwand van grote en middelgrote arteriën, de zgn. 'fatty streak'. In dit stadium zijn er echter nog geen klinische symptomen zichtbaar. Tijdens het verdere levensverloop kunnen deze 'fatty streaks' zich ontwikkelen tot geavanceerde adervernauwingen, ook wel 'atherosclerotische plaques' genoemd. De ontwikkeling van deze atherosclerotische plaques wordt beïnvloed door bekende risicofactoren die onderverdeeld kunnen worden in enerzijds risicofactoren als gevolg van erfelijkheidsfactoren (zoals hypertensie (hoge bloeddruk), hyperlipidemia en diabetes) en anderzijds risicofactoren als gevolg van een ongezonde levensstijl (o.a. vetrijk en ongevarieerd dieet, roken, sedentair bestaan). Expansie van de geavanceerde plaques, leidt uiteindelijk tot gereduceerde of zelfs verhinderde bloeddorstrooming naar perifere weefsels wat resulteert in klinische symptomen als angina pectoris (drukkende pijn in de borststreek) en infarct (hartaanval of beroerte).

Huidige behandelingen voor atherosclerose richten zich voornamelijk op het bestrijden en het verminderen van de risicofactoren. Frequent gebruikte medicatie omvat onder andere statines die niet alleen in staat zijn om cholesterol bloedwaarden te verlagen maar ook een ontstekingsremmende werking uitoefenen. Ook bloeddruk verlagende middelen worden veel toegepast. Naast medicatie kunnen in een vergevorderd stadium van de ziekte ook chirurgische technieken toegepast worden zoals een bypass operatie of het plaatsen van stents om de bloeddorstrooming te herstellen, echter het lange termijn succes van deze technieken wordt vaak tegengegaan door restenose. Ondanks de effectiviteit van beide therapieën, blijft een groot deel patiënten over die onvoldoende of niet reageren op bestaande therapeutische middelen. Dit maakt inspanningen om het huidige repertoire aan therapeutische en diagnostische middelen verder uit te breiden noodzakelijk.

Ontwikkelingsproces van atherosclerose

De vaatwand van gezonde grote en middelgrote arteriële bloedvaten is hoofdzakelijk opgebouwd uit een laag gladde spiercellen omgeven door elastische vezels en aan de buitenkant omgeven door een adventitia. De binnenkant van een bloedvat is bedekt door een dunne laag hecht, aan elkaar gesloten vaatwandcellen (endotheelcellen). Op plaatsen waar een vlotte bloeddorstrooming verstoord wordt, treden meestal de initiële tekenen van een ontstekingsreactie op waardoor de endotheelcellen geactiveerd worden. Als gevolg van de activatie wordt de hechte barrière van endotheelcellen doordringbaar en worden er aanhechtingsmoleculen op het oppervlak van de endotheelcellen tot expressie gebracht. Door de verhoogde doorlaatbaarheid kunnen cholesterolvervoerende componenten (lipoproteïnen) de vaatwand penetreren en vervolgens modificaties ondergaan waardoor deze lipoproteïnen niet meer herkend worden als lichaamseigen stoffen en immunogeen worden. Dit leidt tot het aantrekken van macrofagen (immuuncellen) die door middel van de aanhechtingsmoleculen de vaatwand kunnen binnendringen met als doel de verwijdering van de gemodificeerde lipoproteïnen door middel van scavenger receptoren. Na opname van een substantiële hoeveelheid cholesterol veranderen de macrofagen in zogenoemde 'schuimcellen' die, ten opzichte van macrofagen, in omvang zijn toegenomen waardoor ze niet meer instaat zijn om te emigreren uit de vaatwand. Door accumulatie van deze cellen in de vaatwand ontstaat de zgn. 'fatty streak'. Tijdens dit proces produceren de macrofagen communicatie-eiwitten (cytokines) die zorgen voor het aantrekken en activeren van andere immuuncellen. Macrofagen die de gemodificeerde lipoproteïnen hebben verwijderd gaan vervolgens niet-lichaamseigen deeltjes op het eigen celoppervlak 'presenteren' waardoor een verdere immunologische reactie wordt geïnitieerd.

Een belangrijk type immuuncel dat door deze cytokines aangetrokken wordt, is de T-cel. T-cellen herkennen de lichaamsvreemde deeltjes op het oppervlak van de macrofagen, worden hierdoor geactiveerd waardoor ze cytokines produceren teneinde het immunologisch proces in het lichaam te regelen. Na activatie kunnen deze T-cellen zich verder ontwikkelen in verschillende subtypes van T-cellen die het immuunsysteem verder kunnen activeren of die de immunologische respons kunnen afremmen. Wanneer de balans van beide soorten T-cellen, die elkaar in normale toestand in evenwicht houden, verstoord wordt en de ontstekingsstimulerende T-cellen gaan overheersen, wordt er een negatieve spiraal geactiveerd waarbij een buitenproportionele ontstekingsreactie ontstaat. Dit resulteert in een aanhoudende instroom van ontstekingscellen (zowel macrofagen als T-cellen) waardoor de atherosclerotische plaque zich evolueert tot een geavanceerde plaque die uiteindelijk kan scheuren. Bij ruptuur van een geavanceerde plaque komt de inhoud vrij in de bloedstroom wat kan resulteren in de vorming van een bloedstolsel (bloedprop) die ter plekke of verderop in

het lichaam kan komen vast te zitten en daardoor de bloeddorstrooming afsluit. Hierdoor ontstaat een tekort aan zuurstof en voedingstoffen hetgeen resulteert in afsterven en functieverlies van het achterliggende weefsel, een infarct.

Ondanks de enorme vooruitgang van de laatste decennia in het wetenschappelijk onderzoek naar hart- en vaatziekten, blijft het in kaart brengen van de aanwezigheid van aderverkalking grotendeels gebrekkig en zijn klinische symptomen meestal de eerste diagnose van een problematische vorm van deze chronische aandoening. De diagnostische beeldvormingstechnieken, zoals een angiografie, zijn enkel in staat atherosclerotische plaques op te sporen die uitsteken in het lumen van de arterie en een verstoring van de bloeddorstrooming met zich meebrengen.

Recent is echter aangetoond dat de uitgebreidheid van de adervernauwing niet altijd recht evenredig is met de kwetsbaarheid van de atherosclerotische plaques, maar dat ook de mate van de ontstekingsreactie gekoppeld aan het aantal en type ontstekingscellen een belangrijke rol speelt. Een groot deel van deze risicovolle plaques zullen dus niet opgespoord kunnen worden door middel van de conventionele beeldvormingstechnieken. Dit inzicht leidt momenteel tot veel onderzoek naar moleculaire en cellulaire beeldvorming waarbij getracht wordt celspecifieke contrastvloeistoffen te ontwikkelen teneinde een gedetailleerde diagnose te kunnen stellen ten aanzien van de kwetsbaarheid van de atherosclerotische plaque.

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift kan worden opgedeeld in twee delen. In deel I wordt onderzoek verricht naar belangrijke receptoren op de verschillende celtypen die niet alleen een prominente rol spelen bij de ontwikkeling van aderverkalking, maar ook kunnen dienen als aangrijpingspunt voor diagnostische en therapeutische middelen. Hierbij worden kleine synthetische eiwitten getest op hun specificiteit en affiniteit voor interessante doelwitreceptoren die specifiek zijn voor een bepaald celtype in de plaque of specifiek voor bepaalde ontstekingsreacties.

In deel II wordt een veelbelovend synthetisch eiwit dat specifiek reageert met de scavenger receptor op het celoppervlak van macrofagen (beschreven in hoofdstuk 2 van deel 1) gekoppeld aan contrast verhogende nanopartikels voor toepassing bij MRI-analyse. Hierbij wordt onderzocht of het receptorspecifieke contrastmiddel verhoogde opname vertoont in vergelijking met de conventionele contrastmiddelen en of er specifiek risicovolle atherosclerotische plaques opgespoord kunnen worden.

DEEL I: DE INFLAMMATOIRE ATHEROSCLEROTISCHE PLAQUE ALS DOELWIT

Ontstekingsreacties spelen een rol bij alle ontwikkelingsstadia van hart- en vaatziekten, en dat de mate van ontsteking houdt nauw verband met de ruptuurgevoeligheid van de plaque. Hiermee worden ontstekingscellen primaire doelwitten voor het diagnosticeren van onstabiele, ruptuurgevoelige plaques. Een eerste belangrijk celtype, zoals reeds aangegeven bij het onderdeel: *ontwikkelingsproces van atherosclerose*, zijn de macrofagen waarvan aangetoond

is dat accumulatie van macrofagen een belangrijke marker is voor de activiteit en stabiliteit van de plaque. Een receptor die hierbij een heel belangrijke rol speelt is de klasse A macrofaag scavenger receptor. Deze receptor vertoont verhoogde expressie in de plaque en is betrokken bij het verwijderen van gemodificeerde lipoproteïnen, resulterend in de vorming van schuimcellen en cholesterolophoping in de vaatwand.

In **hoofdstuk 2** wordt beschreven hoe we met de hulp van de faag display techniek een klein eiwit van 15 aminozuren (PP1) hebben geïdentificeerd dat in staat is met hoge affiniteit en specificiteit te binden aan de macrofaag scavenger receptor klasse A. Verder hebben we ook vastgesteld dat door conjugatie van meerdere PP1 eiwitten op een streptavidine molecule de affiniteit voor de receptor verhoogd wordt. Bij *in vivo* studies waarbij het PP1-streptavidine complex gelabeld werd met een radioactief isotoop en vervolgens geïnjecteerd in muizen, hebben we vastgesteld dat het PP1-complex accumuleert in macrofaagrijke organen zoals lever en milt. Met behulp van visualisatietechnieken kon aangetoond worden dat in beide organen het PP1 eiwit colocalisatie vertoonde met F4/80 positieve macrofagen. Bij injectie van het PP1 complex in een muismodel met aderverkalking werd vastgesteld dat PP1 in vergelijking met een aspecifiek complex tot 2x verhoogd opgenomen wordt in geavanceerde atherosclerotische plaques. Geconcludeerd kan worden dat dit specifieke, synthetisch eiwitligand met hoge affiniteit voor de belangrijke scavenger receptor mogelijk kan worden toegepast voor de diagnose van instabiele atherosclerotische plaques.

Een tweede belangrijk celtype in de ontstekingsreactie van de atherosclerotische plaque zijn de T-cellen. T cellen spelen een belangrijke rol in het menselijk afweersysteem tegen binnendringende ziekteverwekkers. Aangetoond is dat ze ook functioneel aanwezig zijn in atherosclerotische plaques wat de hypothese versterkt dat atherosclerose gezien kan worden als een chronische adaptieve immuunrespons. Een receptor die een belangrijke rol speelt in adaptieve immuunresponses is de costimulatoire CD40 receptor met CD40L als zijn natuurlijke ligand. De cruciale rol van de CD40/CD40L interactie als tweede noodzakelijke stimulus om een immuunrespons op te wekken, maakt dit systeem een interessante target voor diagnose en therapeutische interventie. In **hoofdstuk 3** hebben we met behulp van eiwit competitie studies de essentiële bindingssequentie voor de CD40 receptor bepaald en op basis daarvan een specifiek CD40 bindingseiwit gesynthetiseerd, nl. het NP31 peptide. Vergelijkbaar met de resultaten met het PP1-eiwit en enigszins verwacht gezien de trimeer conformatie van de CD40 receptor, leidde streptavidin tetramerisatie tot een verhoogde de affiniteit van het NP31 peptide voor de CD40 receptor. Het NP31 peptide resulteerde in een gedeeltelijke verstoring van de CD40/CD40L interactie waardoor de activatie wordt geremd. Het orgaanverdelingsprofiel van het NP31 peptide was in overeenstemming met het profiel dat verkregen werd door injectie van een specifiek CD40 antilichaam. In een muismodel van atherosclerose vertoonde het NP31-streptavidine complex verhoogde CD40-gerelateerde opstapeling in geavanceerde atherosclerotische plaques zowel

ter hoogte van de aortakleppen als door de volledige aorta. Deze data worden bevestigd door immunohistochemische visualisatie van zowel NP31 als CD40 antilichamen in plaques. Niet alleen in een atherosclerotisch muismodel maar ook in een muismodel voor rheumatoïde artritis, een chronische ziekte gekenmerkt door ontstekingsreacties ter hoogte van gewrichten, werd aangetoond dat NP31 in verhoogde concentratie terug te vinden was in ontstoken gewrichten, in vergelijking met gezonde gewrichten. CD40 peptide blijkt dus een veelbelovend eiwit in de opsporing van ontstekingsprocessen in het lichaam en tevens kan NP31 potentieel de specifieke aflevering van diagnostische en therapeutische middelen naar de atherosclerotische plaque mediëren.

In **hoofdstuk 4** is een derde belangrijke component voor de ontwikkeling van hart- en vaatziekten onderzocht, de cytokines. Cytokines zijn relatief kleine eiwitten die hoofdzakelijk functioneren als communicatie-eiwitten tussen de verschillende soort celtypes. Een belangrijk subtype van cytokines zijn de kleine induceerbare chemotactische cytokines, de zgn. chemokines. In dit hoofdstuk hebben we met behulp van micro-array analyse gen-expressie niveaus bepaald van een groep chemokine en chemokine receptoren tijdens de ontwikkeling van atherosclerose. Vervolgens werd met behulp van injectie van gelabelde recombinante chemokines, de expressie van chemokine receptoren in verschillende organen en in geavanceerde atherosclerotische plaques onderzocht. Hieruit kan geconcludeerd worden dat de CCR5 receptor tijdens het hele ontwikkelingsproces van atherosclerotische plaques verhoogd tot expressie gebracht wordt en daardoor gezien kan worden als een beloftevol doelwit voor nieuwe diagnostische en therapeutische benaderingen.

DEEL II: MOLECULAIRE EN CELLULAIRE BEELDVORMINGSTECHNIKEN

Na identificatie en validatie van enkele beloftevolle synthetische doelwit-eiwitten en kandidaatreceptoren voor gerichte visualisatie van atherosclerotische plaques in deel I, werd in deel II van het proefschrift onderzoek verricht naar de diagnostische capaciteiten van een van voorvernoemde doelwiteiwitten PP1.

In **hoofdstuk 5** werd in samenwerking met de farmaceutische industrie (Guerbet) het PP1 gekoppeld aan contrast-verhogende nanopartikels (T-USPIO) die gebruik worden voor MRI (Magnetic Resonance Imaging) analyse. Beoogd werd de nanopartikels die zorgen voor contrast bij de MRI medische beeldvorming, specifiek af te leveren aan macrofagen die de scavenger receptor klasse A tot expressie brengen. Net als in hoofdstuk 2 werd opname van T-USPIO partikel bestudeerd in zowel cellen als in atherosclerotische muismodellen en werd een verhoogde opnamen van het PP1-gekoppelde contrastdeeltje waargenomen in vergelijking met conventionele contrastdeeltjes. Met behulp van specifieke muismodellen waarbij de ene groep van muizen de scavenger receptor klasse A niet tot expressie brachten en de andere groep van muizen, naast de gewone scavenger receptor, ook nog de humane variant van de scavenger receptor bezitten kon aangetoond worden dat de verhoogde opname van T-USPIO bepaald wordt door de scavenger receptor klasse A.

Tenslotte besteden we in **hoofdstuk 6** aandacht aan de mogelijke gevaren en bijwerkingen van de conventionele contrastmiddelen voor medische beeldvorming, en dan met name voor MRI. Conventionele contrastmiddelen worden door macrofagen verspreid over het gehele lichaam opgenomen en gezien het feit dat een groot deel van de macrofagen aanwezig is in organen zoals lever en milt, is accumulatie in de vaatwand vaak te laag om voldoende signaal te verkrijgen. Om het contrast bij beeldvormingsanalyse te verhogen worden vaak hoge dosissen contrastdeeltjes gebruikt. Toxicologisch onderzoek heeft aangetoond dat de contrastdeeltjes tot 7 dagen na injectie kunnen opgeslagen worden in het lichaam en dat dit weinig tot geen toxisch effect heeft op de doelwitcellen, nl. de macrofagen. Echter, in hoofdstuk 6 hebben wij onderzocht wat het effect van deze contrastdeeltjes is op de macrofagen die in de atherosclerotische plaque aanwezig zijn. Deze macrofagen zijn namelijk geen gewone macrofagen maar met cholesterol gevulde schuimcellen die blootgesteld zijn aan een oxidatieve, inflammatoire omgeving in de vaatwand. Onze resultaten tonen aan dat blootstelling van dit soort macrofagen aan de contrastdeeltjes kan leiden tot verhoogde macrofaag gerelateerde celdood, zowel bij enkelvoudige als meervoudige blootstellingen. Verhoogde celdood draagt op zijn beurt dan weer bij aan destabilisatie van de atherosclerotische plaque met eventuele plaqueruptuur en klinische manifestaties tot gevolg. Verder werd in dit onderzoek ook aangetoond dat deze effecten tegengegaan konden worden door het gelijktijdig toedienen van antioxidantia.

In conclusie: Het onderzoek beschreven in dit proefschrift geeft nieuwe inzichten in de mogelijke toepassingen van synthetisch eiwitten die specifiek binden aan receptoren die belangrijk zijn tijdens de ontwikkeling van hart- en vaatziekten. De verschillende synthetische liganden kunnen gezien worden als potentiële kandidaateiwitten voor diagnostische en therapeutische doeleinden in de opsporing en behandeling van atherosclerose.