



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Pharmaceutical stabilization of abdominal aortic aneurysms : changing its natural history

Kokje, V.B.C.

Citation

Kokje, V. B. C. (2017, June 28). *Pharmaceutical stabilization of abdominal aortic aneurysms : changing its natural history*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/50085>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/50085>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/50085> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Kokje, Vivianne

Title: Pharmaceutical stabilization of abdominal aortic aneurysms : changing its natural history

Issue Date: 2017-06-28



Chapter

NEDERLANDSE SAMENVATTING

11

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Het aneurysma van de abdominale aorta (AAA) is een veel voorkomend en potentieel levensbedreigend fenomeen door de kans op ruptuur van de vaatwand. Ruptuur van het AAA komt voornamelijk voor in AAAs groter dan 55mm en de acute behandeling heeft een hoge mortaliteit (>30%). Ondanks dat de resultaten van een electieve behandeling significant verbeterd zijn over de jaren en de mortaliteit laag is (<3%), is het morbiditeitsrisico nog steeds hoog. AAAs komen het meest voor bij oudere patiënten en de diametergroei van de aorta is over het algemeen langzaam. Daarom zou een therapie gebaseerd op het verminderen van de groei van het aneurysma de operatieve electieve behandeling kunnen uitstellen en bij oudere patiënten zelfs onnodig kunnen maken. In de afgelopen jaren is er steeds meer duidelijk geworden over de pathofysiologie van het AAA waardoor meer onderzoek zich is gaan richten op het vinden van een farmacologische strategie om de groei van het aneurysma te verminderen of zelfs helemaal te stoppen.

Het doel van dit proefschrift is het identificeren van nieuwe aangrijppunten voor farmacologische behandeling van het AAA en om de nieuwe inzichten om te zetten naar nieuwe therapieën en deze te testen in een preklinische setting. Daarnaast kunnen de nieuwe inzichten die verkregen zijn in dit proefschrift bijdragen aan het ontwikkelen van nieuwe secundaire preventieve maatregelen die gericht zijn op het vertragen van de AAA groei. Op dit moment wordt gedacht dat het AAA zich ontwikkelt door een serie van complexe interacties tussen de structurele eigenschappen van de AAA vaatwand en verschillende risicofactoren. Een aantal van deze risicofactoren zijn beschreven in epidemiologische studies. Een hoog plasma cholesterol, hypertensie en roken zijn onder andere geassocieerd met AAAs. Deze verbanden hebben geleid tot verschillende klinische studies die hebben gekeken naar potentiële farmacologische strategieën, zoals anti-hypertensiva en statines, om de groei van het aneurysma te remmen. Een systematisch overzicht van al deze klinische studies wordt gegeven in **Hoofdstuk 2**. Dit hoofdstuk belicht het gebrek aan kwaliteitsstudies naar het effect van potentiële farmacologische stabilisatie van AAA groei. De meerderheid van de studies was van weinig wetenschappelijke waarde door een verkeerde studieopzet en te weinig deelnemers. Daarnaast wordt de interpretatie van de studies bemoeilijkt door gebrek aan gestandaardiseerde metingen en verkeerde statistische analyses. Momenteel kan er geen farmacologische therapie voor de stabilisatie van de groei van het AAA worden aanbevolen. Hoofdstuk 2 beschrijft ook het effect van farmacologisch cardiovasculair risicomanagement op AAA groei. Lange tijd is gedacht dat AAA sterk gerelateerd is aan arteriosclerose. Beiden worden gevonden in arteriën, ze hebben gelijke predisponerende risicofactoren en in beide ziekten komen gelijke immuuncellen tot expressie in het aangedane weefsel. Desalniettemin, na het tevergeefs testen van cardiovasculair risico management voor AAAs, lijkt de gelijkenis tussen beide ziekten minder groot dan in eerste instantie werd gedacht. Naast het voor de hand liggende verschil van stenose en dilatatie van de aandoeningen zijn er meer verschillen. Slechts 10% van de abdominale aneurysma's laat daadwerkelijk een arteriosclerotische plaque aan de kant van het aneurysma zien. Daarnaast komen de aneurysma's niet tot nauwelijks voor in de arteriën die het meeste vatbaar zijn voor arteriosclerose. Men denkt dat de risicofactoren van beide ziekten zowel arteriosclerose en AAA kunnen bevorderen, echter deze risicofactoren kunnen niet als oorzakelijk worden gezien. Roken heeft bijvoorbeeld een veel sterkere relatie met AAA dan met arteriosclerose. In een

groot bevolkingsonderzoek verklaart roken ongeveer 70% van alle aneurysma's. Deze sterke relatie tussen roken en AAA is al voor het eerst beschreven in 1958 en wordt onderstreept door Lederle in 2011 die een specifiek verband beschrijft tussen vermindering in AAA mortaliteit en een afname in jaarlijkse sigaretten consumptie. Daarom moet worden opgemerkt dat stoppen met roken altijd moet worden nagestreefd, naast andere behandelingen.

Een andere potentiële risicofactor voor AAA is een medische voorgeschiedenis met longemfyseem. Verschillende parallellen zijn opgemerkt tussen AAA en chronische obstructief longlijden (COPD). Verminderde longfunctie komt vaak voor in AAA patiënten en is geassocieerd met een verhoogd risico op AAA ruptuur. Bij beide ziekten is een sterke associatie gevonden met roken en dit zou het verband tussen longfunctie en AAA groei kunnen verklaren. Echter, **Hoofdstuk 3** laat zien dat de verhoogde prevalentie van COPD in aneurysma patiënten onafhankelijk is van roken. Dit suggereert dat deze relatie een gemeenschappelijke gevoeligheid laat zien. Dit wordt ondersteund door verhoogde ontstekingsmarkers in beide ziekten met gelijke activeringsroutes zoals de matrix-metallo protease 9 (MMP9) en neutrophil elastase ontstekingsroute. In AAA veroorzaakt verhoogde expressie van pro-inflammatoire cytokines, zoals MMP9, de afbraak van de extracellulaire matrix en vergroot zo de vasculaire dilatatie. Verhoogde niveaus van circulerende pro-inflammatoire cytokines, die zorgen voor proteolyse, zijn gevonden in AAA patiënten en niet in aorta's zonder aneurysma. Daarnaast laten pathologische studies van eind stadium humane aneurysma bipten en de diermodel studies het belang van ontsteking, proteolyse en het verlies van gladde spiercellen in de vaatwand zien. Hierdoor is inzicht in de immunologische reacties in AAA van groot belang voor het ontdekken en toepassen van nieuwe therapieën. Verschillende studies hebben de vitamine D receptor (VDR) geïdentificeerd als een potentiële factor in de immunoregulatie. De verslaglegging over vitamine D receptor antagonisten is divers. In de literatuur wordt een aantal mechanismen beschreven zoals het beïnvloeden van NFκB, MAPK en macrofaag activering. **Hoofdstuk 4** laat zien dat in AAA het effect van VDR activering door een vitamine D analoog beperkt blijft tot het aantal T helper cel (CD4+) en de expressie van cysteine proteasen K en L. Het is onduidelijk of deze T helper cellen een effect hebben op AAA. Deze rol blijft onduidelijk omdat resultaten van dierstudies niet doorslaggevend zijn en ook omdat klinische rapporten zijn gepubliceerd waarin versnelde AAA groei werd waargenomen in patiënten behandeld met immuunsysteem onderdrukkende medicatie. Daarnaast is het effect van het remmen van cysteine proteasen in AAA niet bekend. Collageen is het primaire bestanddeel van de matrix van de media en adventitia van de aorta vaatwand en een belangrijk doelwit van cysteine proteasen. Daarom zou het effect van het beïnvloeden van de cysteine proteases op de AAA vaatwand gunstig kunnen zijn in het remmen van de AAA groei. In **Hoofdstuk 5** wordt het belang van cysteine proteasen in AAAs onderstreept door kwalitatieve collageen degradatie experimenten die het effect van cysteine proteasen en matrix metallo proteasen op collageen laten zien. Ondanks dat de cysteine proteasen: cathepsine K, L en S allemaal onafhankelijk al gekoppeld zijn aan AAA progressie, heeft het selectief remmen deze factoren met statines in klinische studies niet geleid tot het remmen van de AAA groei. Daarom is in hoofdstuk 5 het effect van een breed spectrum cysteine protease remmer (E64) op AAA groei getest. Het remmen van cysteine proteasen met E64 heeft in twee verschillende muismodellen voor AAA geleid tot het blokkeren van AAA formatie en het behoud van collageen in de vaatwand. Neutrofielen spelen een cruciale rol in

de vasculaire ontsteking in AAA. Zij lijken onder andere verantwoordelijk te zijn voor verminderd cystatine C, wat de primaire endogene remmer is van cysteine proteasen. Daarnaast produceren de neutrofielen verschillende serine proteasen, MMP8 en MMP9. Factoren die allemaal bekend staan om het bevorderen van de extracellulaire matrix afbraak in de vaatwand. Een van de belangrijkste activatoren van neutrofielen is interleukine 8 (CXCL8). Een overvloed aan CXCL8 expressie is een kenmerk van AAA. CXCL8 is verantwoordelijk voor de voortdurende ontsteking in de aorta vaatwand. Door binding met de CXCR1/2 receptoren zorgt CXCL8 voor activering van de neutrofielen. Daarnaast zorgt CXCL8 ook voor CXCR-gestuurde angiogenese wat ook een kenmerk is van AAAs. **Hoofdstuk 6** beschrijft de CXCL8/neutrofiel-as in humane AAAs en het effect van het blokkeren van de neutrofiel receptoren op aneurysma formatie in het elastase muismodel. Het beïnvloeden van de as resulteerde in volledige blokkade van aneurysma formatie in het muismodel. Op dit moment zijn er fase 2 studies naar het klinische effect van de neutrofiel receptor remmers gestart. De eerste, een fase 2 studie naar het effect van neutrofiel receptor remmers in COPD die veelbelovend is, laat een significante verbetering in longfunctie en verminderde ontsteking zien. Daarnaast is er in de eerste studies geen negatief effect beschreven van de neutrofiel receptor remmer op beenmerg functies en ook werd er geen toename gezien in het voorkomen van algemene infecties. Bij elkaar genomen, suggereert dit, dat het blokkeren van neutrofiel chemotaxis en neutrofiel activering zeer veel belovend is in het klinisch remmen van AAA groei. De huidige manier om neutrofiel chemotaxis te remmen is door colchicine. Dit is een geneesmiddel dat reeds jaren wordt gebruikt in de behandeling van jicht. **Hoofdstuk 7** beschrijft het effect van colchicine op aneurysma ontwikkeling in het elastase muismodel. Daarnaast beschrijft het ook twee verschillende mechanismen waarop colchicine een effect heeft op neutrofielen in de aneurysma vaatwand. Het eerste is het direct remmen van neutrofiel chemotaxis door het beïnvloeden van TNF α en door het verminderen van de adhesie van de neutrofielen aan de endotheel cellen. Daarnaast heeft colchicine een indirect effect, gestuurd door het NALP3 inflammasome. Dit inflammasome activeert verschillende interleukines via caspase-1 en zo ook de productie van onder andere CXCL8. In hoofdstuk 7 wordt verhoogde activering van het NALP3 inflammasome en zijn activeringsroute in humaan AAA weefsel beschreven. Verschillende mechanismen voor activering van het NALP3 inflammasome zijn in de literatuur beschreven. Een van de meest aannemelijke verklaringen voor de activering van dit inflammasome in AAA is de activering door mitochondriale reactieve zuurstof deeltjes (ROS), geïnduceerd door roken; een zeer belangrijke risicofactor voor AAA. Er zijn belangrijke bezwaren over de therapeutische marge tussen colchicine en de bijwerkingen van het medicijn. Recente studies naar het effect van colchicine op de preventie van het post-pericardiotomie syndroom in patiënten na hartoperaties en een studie naar de preventie van pericarditis lieten geen verschil zien in bijwerkingen tussen placebo en colchicine. Desalniettemin moet het effect van colchicine in AAA patiënten nog worden onderzocht. Een ander kenmerk van de ontsteking gezien in AAA, naast CXCL8, is een toename in de expressie van interleukine 6 (IL6) in de aneurysma vaatwand. Daarnaast is een polymorfisme van het IL6 gen beschreven als sterke en onafhankelijke risicofactor voor AAA. Jarenlang is IL6 beschreven als pro-inflammatoir cytokine. Echter, recente studies beschrijven IL6 als een anti-inflammatoir cytokine met verschillende functies in weefsel protectie en regeneratie. Het wordt gedacht dat de verschillende functies van IL6 worden gestuurd door twee verschillende signaleringsroutes:

de klassieke route via de IL6 receptor die verantwoordelijk wordt gehouden voor de anti-inflammatoire en weefsel regeneratieve activiteiten en de niet-klassieke, trans-signaling route die verantwoordelijk wordt gehouden voor de pro-inflammatoire activiteiten. Een rol voor IL6 in AAA wordt onderzocht in **Hoofdstuk 8**. De IL6 receptor CD126 was matig aanwezig in arteriosclerotische vaatwand en in aneurysma vaatwand. Dit in tegenstelling tot de oplosbare receptor, die in beide type vaatwand overvloedig aanwezig is. De fosforylatie van STAT3 in humaan AAA weefsel laat de activiteit van de IL6/STAT3 as in AAA zien. Echter, dit differentieert niet tussen de verschillende activeringsroutes. Daarom werd het effect van anti-IL6 in het elastase muismodel onderzocht. Geheel onverwacht werd gevonden dat het remmen van IL6 met een anti-IL6 antilichaam resulteert in aneurysma ruptuur in bijna 50% van de behandelde dieren. Vertraagde behandeling met anti-IL6 resulteerde niet in een vermindering van AAA formatie. Dit suggereert een beschermende rol voor IL6 in de fase van acute schade. Echter, met milde expressie van de klassieke signaleringsroute, wijzen deze bevindingen op een marginale rol voor IL6 in AAA.

Er is een sterke klinische en moleculaire relatie tussen AAA en aneurysmata van de arteria poplitea (PAA). Echter, de groei van het AAA resulteert uiteindelijk in ruptuur, terwijl ruptuur in PAAs zeldzaam is. Een her-evaluatie van de humane AAA en PAA vaatwand, in **Hoofdstuk 9**, laat zien dat er vervetting van de vaatwand plaats vindt in de AAA vaatwand in tegenstelling tot in de PAA vaatwand. Daarnaast wijst een toename van de vetcel gerelateerde genen en hun pathways in geruptureerde AAAs in vergelijking met niet geruptureerde AAAs op een link tussen de vervetting van de AAA vaatwand en het voorkomen van ruptuur.

CONCLUSIES EN TOEKOMST PERSPECTIEVEN

Dit proefschrift onderstreept het belang van chronische ontsteking en proteolytische activiteit in aneurysma formatie. Het onderzoeken van humaan aneurysma weefsel en het gebruik van het elastase muismodel heeft geleid tot verschillende potentiële aanknopingspunten voor farmacologische stabilisatie van het AAA. Muismodellen van menselijke ziekten zijn een deel geworden van biomedisch onderzoek. Dit komt omdat de laboratorium muis het meest toegankelijke experimentele zoogdiermodel is dat onder andere orgaansystemen en systemische fysiologie met de mens deelt. Op dit moment is de vertaling van muismodellen naar klinische trials moeizaam. Dit kan leiden tot het in twijfel trekken van de validiteit van de beschikbare muismodellen. Verschillen in fysiologie en variaties in de homologie van de moleculaire doelwitten tussen mens en muis kunnen leiden problemen. Daarom is de klinische impact van de onderzochte farmacologische doelwitten in dit proefschrift onduidelijk. Een ironische tekortkoming van het gebruiken van muismodellen is het gebrek aan kennis over de biochemische en cellulaire karakteristieken van de uitlokkende factoren in AAAs. Desalniettemin, de pathofysiologische studies van eindstadium humane weefsel biopten heeft een groot aantal overeenkomsten tussen de cellulaire en biochemische karakteristieken laten zien tussen de muismodellen en menselijke ziekte. Daarnaast reproduceren de muismodellen, zoals beschreven in Hoofdstuk 1, de belangrijkste kenmerken van AAAs. Hierdoor kunnen de modellen een deel van de pathofysiologie imiteren en worden zo gebruikt om een beter inzicht te krijgen in de humane situatie. In het bijzonder heeft het elastase muismodel er op een gereguleerde manier voor gezorgd dat er veel meer gedetailleerde kennis beschikbaar is over de cellulaire en moleculaire mechanismen van AAA. Ondanks dat muismodellen een unieke

bron van informatie, worden alternatieven gezocht om het gat tussen experimenteel onderzoek en de klinische situatie te verkleinen. In de afgelopen jaren is een grote reeks aan alternatieven voor dier experimenteel onderzoek opgekomen zoals epidemiologische studies, autopsie studies, computer modelstudies en fase 0 studies. Deze nieuwe methoden voor het onderzoek naar de klinische ziekten zijn veel belovend en hebben wellicht grote invloed op het veld van humaan AAA onderzoek. Het is algemeen geaccepteerd dat het natuurlijk beloop van AAA wordt gekenmerkt door progressieve vaatwand degradatie, leidend tot verlies van de integriteit van de vaatwand en aorta ruptuur. De segmentale verzwakking van de arterie en de duidelijke matrix veranderingen, met toegenomen intra-moleculaire collageen crosslinking in de AAA vaatwand zijn karakteristiek voor AAA. In een eerdere studie is een compleet verlies van de normale collageen architectuur in AAA gevonden. Daarnaast werd gezien dat de connecties die zorgen dat het weefsel zich gedraagt als een coherent netwerk niet aanwezig zijn in AAA. Deze veranderingen in de aortawand laten niet direct de primaire oorzaak van het aneurysma zien. Waarschijnlijker is het dat de veranderingen een verkeerde collageen afzetting laten zien in een situatie die wordt gekenmerkt door chronische ontsteking en activering van meerdere proteolytische routes.

Dit proefschrift haalt het belang naar boven van de chronische ontsteking van de vaatwand in AAA en belicht verschillende ontstekingsroutes als mogelijke doelwitten voor farmacologische stabilisatie van de vaatwand. In het bijzonder de neutrofiel receptor activeringsroute blijkt een belangrijke doelwit. De verrassende complete blokkade van de aneurysma formatie in het elastase muis model met de neutrofiel receptor remmer DF2156A, samen met de hoge expressie van de CXCL8-as in humaan AAA weefsel wijst op een belangrijke rol voor deze route. Aangezien het ontstekingsproces gezien in het aneurysma in de meeste gevallen verspreid is over de jaren, zou het doorbreken van de cirkel van activering in deze route zeer veelbelovend kunnen zijn in de klinische stabilisatie van het AAA. DF2156A wordt op dit moment onderzocht in fase 2 studies voor COPD. Daarom zal de vertaalslag naar een klinische trial in AAA patiënten reeds mogelijk kunnen zijn in de aankomende jaren. De resultaten van deze studie wordt met spanning afgewacht. Naast DF2156A heeft het onderzoek in dit proefschrift ook andere potentiële medicijnen aangewezen voor de farmacologische behandeling van het AAA (zoals colchicine en E64). Aangezien colchicine al een geregistreerd medicijn is zou de vertaling naar een klinische trial met dit middel ook relatief snel en gemakkelijk moeten gaan. E64, de breedspectrum cathepsine remmer behoeft echter nog additioneel onderzoek naar het effect en veiligheid voor dat een klinische trial gestart kan worden. Zoals beschreven in Hoofdstuk 2, is het aantal huidige gerandomiseerde klinische studies laag en de wetenschappelijke waarde en kwaliteit van de beschikbare literatuur is beperkt. Medicatie gebruik en therapietrouw is moeilijk te meten in deze studies en daarom een grote uitdaging. Een andere uitdaging voor gerandomiseerde klinische studies is de lage groeisnelheid van het AAA. De gemiddelde diameter van de aorta groeit tussen de 1 en 2.5 mm per jaar en deze verschillen in de diameter zitten in de range van de onderzoeksvariatie die is beschreven voor echografiemetingen. Daarom moet een goed studie design, het standaardiseren van de meting en de kwaliteitscontrole van klinische trials worden gewaarborgd. Tenslotte wordt het meer en meer duidelijk dat AAA een zeer multifactoriële aandoening is met verschillende risicofactoren, genetische predispositie en grote mechanische verschillen in de verschillende AAAs. Daarom is een groot aantal, goed opgezette, grote klinische trials nodig om te corrigeren

voor alle mogelijke bias. Dit proefschrift onderstreept het belang van chronische ontsteking in de AAA vaatwand en biedt een aantal potentiële doelwitten aan voor farmacologische behandeling van de groei van het AAA. Hopelijk draagt dit proefschrift bij aan het inspireren van toekomstig onderzoek en de vertaling naar klinische trials. Dit alles met als doel uiteindelijk dichterbij het farmacologisch stabiliseren van het AAA te komen.

