



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Calcification and C-reactive protein in atherosclerosis : effects of calcium blocking and cholesterol lowering therapy

Trion, A.

Citation

Trion, A. (2006, October 5). *Calcification and C-reactive protein in atherosclerosis : effects of calcium blocking and cholesterol lowering therapy*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4584>

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/1887/4584>

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

Chapter 9

Samenvatting

Hart- en vaatziekten zijn de meest voorkomende doodsoorzaak in de Westerse wereld. Atherosclerose, ook wel aderverkalking genoemd, is de belangrijkste onderliggende oorzaak van hart- en vaatziekten. Het ontstaan van atherosclerose wordt gekarakteriseerd door een ophoping van macrofagen in de vaatwand, die zich door opname van cholesterol en vetten later ontwikkelen tot schuimcellen. Deze schuimcellen veroorzaken een ontstekingsreactie in de vaatwand, die gevolgd wordt door migratie en proliferatie van gladde spiercellen en vorming van een fibreuze cap bovenop de schuimcellen. In meer vergevorderde stadia van atherosclerose zijn er in de atherosclerotische lesie, ook wel plaque genoemd, ook dode cellen, extracellulair vet, cholesterol kristallen en verkalking aanwezig. Deze plaque kan ruptureren (= scheuren) en de vorming van een bloedstolsel veroorzaken met als gevolg blokkade van het bloedvat. Dit veroorzaakt ziektebeelden zoals een hartinfarct of een beroerte. De belangrijkste risicofactoren voor het ontwikkelen van atherosclerose zijn verhoogde cholesterol- en triglyceride concentraties in het bloed, overgewicht, hoge bloeddruk, suikerziekte, roken en erfelijke factoren.

Het verkalken van de vaatwand is een vaak voorkomend kenmerk van atherosclerose. De mechanismen die aan dit proces ten grondslag liggen zijn nog niet opgehelderd. Tot nu toe dacht men dat kalkafzettingen in de vaatwand het gevolg waren van een passief proces en een natuurlijk gevolg van het ouder worden waren. Recentelijk is echter duidelijk geworden dat het proces van verkalken van de vaatwand alles behalve passief is.

De eerste helft van dit proefschrift richt zich op het proces van verkalking bij atherosclerose. In **hoofdstuk 2** is een samenvatting gemaakt van de literatuur met betrekking tot het ontstaan van kalkafzettingen in de vaatwand en de betrokkenheid van gladde spiercellen in dit proces. Momenteel worden gladde spiercellen beschouwd als de cellen die de verkalking van de vaatwand veroorzaken. Apoptose (geprogrammeerde celdood) van deze cellen lijkt een sleutelrol te spelen in dit proces. Andere factoren zoals cel-cel interacties (macrofagen en gladde spiercellen), lipiden en fosfaat in het plasma moduleren het proces van verkalking. Om het proces van gladde spiercel verkalking te kunnen bestuderen hebben we een *in vitro* model ontwikkeld waarin we gebruik maken van gladde spiercellen afkomstig uit de aorta van de neonatale rat (**hoofdstuk 3**). β -Glycerofosfaat en hoge calcium concentraties zijn naar voren gekomen als belangrijke determinanten van *in vitro* verkalking van neonatale rat gladde spiercellen.

In het verleden is atherosclerose ook wel omschreven als een ophoping van lipiden in de vaatwand. Een verhoogde concentratie van plasma cholesterol, in het bijzonder low-density lipoproteïne (LDL) cholesterol, is een van de belangrijkste risicofactoren voor het ontwikkelen

van atherosclerose. De preventie en behandeling van hart- en vaatziekten heeft zich dan ook lange tijd gericht op het verlagen van plasma cholesterol concentraties. Tegenwoordig wordt atherosclerose beschouwd als een complex en multifactoriële proces, met als gevolg dat lipiden-verlaging niet langer de enige focus is van anti-atherosclerotisch onderzoek. Andere processen zijn ook doelwit van onderzoek geworden en men probeert nu atherosclerose tegen te gaan m.b.v. geneesmiddelen die directe effecten hebben op de vaatwand. Uit verschillende *in vitro* en *in vivo* studies is gebleken dat calcium antagonisten (CAs), die oorspronkelijk ontwikkeld en toegepast zijn als bloeddrukverlagende middelen, ook anti-atherosclerotische eigenschappen zouden kunnen hebben, maar tot dusver hebben klinische studies en studies in proefdieren niet onomstotelijk kunnen aantonen dat CAs anti-atherosclerotische eigenschappen hebben.

Om te onderzoeken of farmacotherapie effect heeft op het proces van gladde spiercel verkalking hebben we onderzocht of een calcium antagonist (amlodipine) en een statine (atorvastatine), individueel en gezamenlijk invloed hebben op gladde spiercel verkalking (**hoofdstuk 4**). Incuberen van de gladde spiercellen met verschillende concentraties amlodipine had geen effect op het proces van verkalking. Incubatie van gladde spiercellen met atorvastatine resulteerde echter in een dosis-afhankelijke toename van calcium depositie. Bij een concentratie van 10 $\mu\text{mol/L}$ atorvastatine was de verkalking 2x hoger dan in afwezigheid van atorvastatine. Als amlodipine en atorvastatine behandelingen gecombineerd werden, was er wederom een toename in calciumafzetting te zien die overeenkwam met de mate van calcium afzetting bij dezelfde dosis atorvastatine alleen. Aangezien de hoogste atorvastatine concentratie die we gebruikt hebben (50 $\mu\text{mol/L}$) een sterk pro-apoptotisch effect had, is ons vermoeden dat het stimulerende effect van atorvastatine op verkalking van gladde spiercellen gerelateerd is aan de vorming van o.a. "apoptotic bodies" die fungeren als "kernen" waaromheen de kalkafzetting plaats kan vinden.

De resultaten van **hoofdstuk 3 en 4** in aanmerking genomen, concluderen we dat gladde spiercellen afkomstig van ratten-aorta in staat zijn om kalk af te zetten vooropgesteld dat de juiste kweekomstandigheden gehandhaafd worden. Dit *in vitro* model van gladde spiercel verkalking kan gebruikt worden om het proces van atherosclerotische verkalking te bestuderen, en ook de factoren (inclusief farmaca) die er invloed op uitoefenen. Tevens kunnen we vaststellen dat amlodipine geen effect heeft op gladde spiercel verkalking, en dat atorvastatine het proces van gladde spiercel verkalking bevordert.

De ontdekking dat ontstekingsprocessen een belangrijke rol spelen in de ontwikkeling van atherosclerose heeft ons begrip van de pathofysiologie van atherosclerose in de afgelopen

10 jaar drastisch veranderd. Verhoogde concentraties van het acute fase eiwit C-reactief proteïne (CRP) in het plasma worden geassocieerd met een verhoogde kans op hart- en vaatziekten in prospectieve en cross-sectionele klinische en epidemiologische studies. De plasma concentraties van CRP reflecteren de inflammatoire conditie van de patiënt en waarschijnlijk ook van de vaatwand. Er zijn ook een aantal indicaties dat CRP een actieve rol speelt in de ontwikkeling van hart- en vaatziekten.

Het mechanisme dat inflammatoire markers zoals CRP aan hart- en vaatziekten koppelt is complex en nog niet helemaal opgehelderd. In **hoofdstuk 5** hebben we de literatuur samengevat betreffende de betrokkenheid van CRP bij hart- en vaatziekten, en in het bijzonder het effect van CRP op de ontwikkeling van atherosclerose. *In vitro* studies hebben bewezen dat CRP effecten heeft op verschillende celtypes die betrokken zijn bij atherosclerose zoals endotheelcellen, gladde spiercellen, en monocytën, en meestal zijn dit proinflammatoire en proatherosclerotische effecten. De CRP concentraties die in deze *in vitro* studies gebruikt zijn, zijn echter hoger dan de concentraties die doorgaans in het plasma van de mens gevonden worden, en de klinische relevantie van deze bevindingen is nog niet duidelijk. Om te onderzoeken of CRP een causale rol speelt in de ontwikkeling van atherosclerose hebben wij een onderzoek in ApoE*3-Leiden(E3L)/hCRP transgene muizen uitgevoerd (**hoofdstuk 6**). Het genoom van deze muizen is voorzien van een humaan gen (ApoE*3-Leiden). In mensen die met dit gen geboren worden komt een mutant apolipoproteïne E tot expressie en dit gaat gepaard met hyperlipidemie en vroegtijdige ontwikkeling van atherosclerose. Tevens bevat het genoom van deze muizen het humane CRP gen, leidend tot plasma concentraties van CRP die vergelijkbaar zijn met die van mensen die lijden aan een inflammatoire ziekte. Dus, deze muizen zijn hyperlipidemisch en ontwikkelen daardoor atherosclerose dat snel de aorta ascendens aantast. Tevens hebben deze muizen een verhoogde CRP expressie, hetgeen de humane situatie beter benadert. Het is gebleken dat licht verhoogde concentraties van CRP in het plasma niet bijdragen aan de ontwikkeling van atherosclerose in E3L muizen. CRP transgene muizen hadden evenveel atherosclerose als niet-CRP transgene muizen. Ook de ernst van de atherosclerotische lesies verschilde niet tussen de twee groepen.

Omdat klinische studies en studies in proefdieren niet onomstotelijk hebben kunnen aantonen dat CAs anti-atherosclerotische eigenschappen hebben, hebben wij in **hoofdstuk 7** onderzocht of de CA amlodipine anti-atherosclerotische eigenschappen heeft. Daarvoor hebben wij opnieuw gebruik gemaakt van de ApoE*3-Leiden (E3L)/hCRP transgene muis. Tevens hebben we onderzocht of het combineren van amlodipine behandeling met atorvastatine, een cholesterolverlagend middel, een synergistisch remmend effect heeft op

de ontwikkeling van atherosclerose. Tot slot is ook onderzocht of atorvastatine effecten op atherosclerose heeft die losstaan van de lipiden-verlagende effecten van dit geneesmiddel.

Behandeling met amlodipine ging niet gepaard met significante bloeddrukverlaging of cholesterolverlaging, maar toch nam de grootte van de lesies af met 43%. Het combineren van amlodipine en atorvastatine behandeling reduceerde de lesiegrootte meer dan elke behandeling afzonderlijk, met een uiteindelijke reductie van lesiegrootte van 93%. We hebben geen effecten waargenomen van atorvastatine die losstaan van het lipiden-verlagende effect. Hoewel de muizen die behandeld werden met atorvastatine plasma cholesterol concentraties hadden die vergelijkbaar waren met die uit de laag-cholesterol groep, werd in de muizen die behandeld werden met atorvastatine een niet significante reductie (31%) van atherosclerose ontwikkeling waargenomen.

Met het oog op de resultaten van **hoofdstukken 6 en 7**, kunnen we concluderen dat CRP geen direct effect heeft op atherosclerose ontwikkeling in ApoE*3-Leiden/hCRP transgene muizen. Het blijft echter een feit dat CRP geassocieerd is met hart- en vaatziekten, en mogelijk verhoogt CRP het risico via effecten op trombose, complement activatie en revascularizatie na ischemie.

Amlodipine heeft anti-atherosclerotische effecten die losstaan van het bloeddrukverlagende effect van dit geneesmiddel. Onze resultaten laten tevens zien dat er een duidelijk additief effect is van gelijktijdige behandeling met amlodipine en atorvastatine op het ontstaan van atherosclerose. We hebben in dit onderzoek niet kunnen aantonen dat atorvastatine effecten heeft die losstaan van het lipiden-verlagende effect in E3L/CRP transgene muizen.

De studies beschreven in dit proefschrift bevestigen dat gladde spiercellen een belangrijke rol hebben in atherosclerose ontwikkeling. Gladde spiercellen dragen niet alleen bij aan atherosclerose door proliferatie en migratie, maar ook door het produceren van de kalkafzettingen die vaak in atherosclerotische lesies gezien worden. Atorvastatine, maar niet amlodipine, blijkt een stimulerend effect te hebben op het proces van gladde spiercel verkalking. Het is al eerder gebleken dat statines atherosclerotische lesies stabilizeren. Behandeling met statines vermindert de hoeveelheid lipiden in de lesie, en zou dus ook de kalkafzetting kunnen stimuleren. Gezamenlijk zouden deze processen het mechanisme kunnen zijn waardoor statines de lesies stabilizeren.

In de hierboven beschreven studies is gebruik gemaakt van gekweekte cellen. Dit heeft als voordeel dat studiemateriaal relatief gemakkelijk en in grote hoeveelheden te verkrijgen is. Bovendien kunnen proeven herhaald worden (reproduceerbaar). Natuurlijk is het zo dat het gebruik van gekweekte cellen de complexe set van factoren die bijdragen aan atherosclerose ontwikkeling *in vivo* niet kan nabootsen, het is een versimpeling van de

processen zoals die plaatsvinden in het dier of de mens. Daarom zou het effect van statines op kalkafzetting tijdens atherosclerose in de toekomst ook nog onderzocht moeten worden in proefdieren, en uiteindelijk ook geëvalueerd moeten worden in de mens.

Uit de proefdierstudies beschreven in dit proefschrift is gebleken dat CRP geen direct effect heeft op atherosclerose. Bovendien is gebleken dat zowel amlodipine als atorvastatine anti-atherosclerotische effecten hebben, en dat het combineren van de behandeling met deze farmaca dit effect versterkt. Het is echter wel zo dat er in dit diermodel is begonnen met medicamenteuze behandeling voordat de atherosclerose zich had ontwikkeld. Om co-medicatie effectief te laten zijn in de mens, zou men dus met medicamenteuze behandeling van patienten die risico lopen op hart- en vaatziekten moeten beginnen voordat ze symptomen gaan vertonen. Of dit haalbaar en nuttig is zal in toekomstige studies nader onderzocht moeten worden.