



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Targeting intraplaque angiogenesis : imaging and therapeutic interventions

Baganha Carreiras, F.

Citation

Baganha Carreiras, F. (2020, May 28). *Targeting intraplaque angiogenesis : imaging and therapeutic interventions*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/92293>

Version: 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/1887/92293>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/92293> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Baganha Carreiras, F.

Title: Targeting intraplaque angiogenesis : imaging and therapeutic interventions

Issue Date: 2020-05-28



Appendix

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Hart- en vaatziekten, en dan met name atherosclerose, ook wel aderverkalking genoemd, met de bijbehorende complicaties zoals het scheuren van een atherosclerotische plaque, zijn nog steeds een van de belangrijkste doodsoorzaken. Een instabiel fenotype, dat makkelijk kan scheuren en tot een infarct kan leiden wordt gekenmerkt door factoren en processen zoals een necrotische kern, de aanwezigheid van ontstekingsfactoren en de ingroei van nieuwe microvaatjes in de plaque (intraplaque angiogenese). Er is groeiende hoeveelheid wetenschappelijk bewijs voor een duidelijke relatie tussen intraplaque angiogenese en de progressie naar een instabiele plaque. Daarom bespreken we in **Hoofdstuk 2** de pathologische processen die betrokken zijn bij angiogenese en atherosclerose. We geven een uitgebreid overzicht van de mechanismes die betrokken zijn bij vasa vasorum angiogenese, zoals hypoxie en endotheelcel metabolisme. Voorts beschrijven we de huidige inzichten over de interactie tussen ontstekingsprocessen, de vorming van nieuwe vaatjes en maturatie status van deze nieuwe vaatjes met de progressie van de atherosclerotische plaque en de daaraan gerelateerde effecten op intraplaque bloedingen en (in)stabiliteit. Dit beschrijven we voor zowel experimentele diermodellen als voor de situatie bij de mens. Hierbij belichten we ook nieuwe mogelijkheden voor therapeutische interventies alsmede de verschillende beeldvormende technieken die gebruikt worden om intraplaque angiogenese zichtbaar te maken.

Echter, de meeste klinisch beschikbaar beeldvormende technieken, zoals PositronEmissieTomografie (PET), ComputerTomografie (CT) of Magnetische

Resonantie Imaging(MRI), hebben onvoldoende resolutie om het gedetailleerde netwerk van angiogene microvaatjes in de plaques in kleine proefdieren aan te tonen. Two-Photon IntraVitaal Microscopie (2P-IVM) is een nieuwe techniek waarmee, met hoge resolutie en in real time, intraplaque microvaatjes en de doorbloeding daarvan aangetoond kan worden. In **hoofdstuk 3** beschrijven we hoe met behulp van 2P-IVM de angiogene vaatjes in de plaques van muizen zichtbaar gemaakt kan worden en hoe de architectuur van deze microvaatjes nauwkeurig bestudeerd kan worden. Met name de verschillen in architectuur tussen de microvaatjes in de adventitia en intima laag van de veneuze grafts in het ApoE3*Leiden muis model kan heel inzichtelijk in beeld gebracht worden, inclusief unieke details over de mate van lekkage van deze vaatjes.

Door de lekkage van verschillende dextraan deeltjes van microvaatjes met een verschillende architectuur (mature capillairen, gefenestreerde mature capillairen en pathologische lekkende angiogene capillaire vaatjes in de plaques) in kaart te brengen kunnen we meer informatie verzamelen over het patroon van vaatlekkage in de atherosclerotische plaque. We kunnen aantonen dat de microvaatjes in veneuze graft laesies in ApoE3*Leiden muizen pathologisch meer lek zijn vergeleken met gezonde, al dan niet gefenestreerde microvaatjes. Daarmee tonen we aan dat deze nieuwe 2P-IVM methode een veelbelovende aanpak kan zijn bij de validatie van nieuwe therapeutische anti-angiogene interventies bij vergevorderde atherosclerose in kleine proefdiermodellen.

Statines zijn de belangrijkste geneesmiddelen bij de primaire en secundaire preventie van hart- en vaatziekten als gevolg van hun potente lipide verlagende eigenschappen. Daarnaast kunnen zij ook op pleiotropie wijze additionele gunstige effecten hebben op hart en bloedvaten, onder ander op intraplaque angiogenese.

Maar hoe deze gunstige effecten op intraplaque angiogenese en intraplaque bloedingen, twee belangrijke processen die bijdrage aan de plaque instabiliteit, gereguleerd zijn, is nog onduidelijk. In **hoofdstuk 4** bestuderen we het effect van atorvastatine op intraplaque angiogenese en bloedingen in veneuze graft laesies in ApoE3*Leiden muizen, waarbij we met name de effecten die direct afhankelijk zijn van de lipiden verlagende werking van statines vergelijken met de effecten van de niet-lipiden verlagende werking. Door de specifieke genetische eigenschappen is de ApoE3*Leiden muis kan deze muis reageren op een statine behandeling en is daarmee het uitgelezen model voor deze studies. We kunnen de lipiden verlaging afhankelijke en onafhankelijke effecten van statines op plaque angiogenese bestuderen door in deze muizen de plasma cholesterolspiegel te verlagen door statines of door een dieet interventie, en vervolgens de effecten op intraplaque angiogenese, maturatie van de microvaatjes en de intraplaque bloedingen te vergelijken. Atorvastatine remt de remodelering van de veneuze grafts met name op basis van lipiden verlagende werking, maar opvallend genoeg heeft atorvastatine een remmende werking op intraplaque angiogenese op een wijze die niet afhankelijk is van de lipiden verlagende werking, op pleiotrope wijze dus. Hierbij versterkt atorvastatine ook de stabiliteit van de microvaatjes in de plaque, met gunstige remming van de intraplaque bloedingen. Gebruikmakende van een combinatie van *ex vivo* en *in vivo* technieken hebben we vervolgens onze bevindingen kunnen bevestigen en de pathofysiologische moleculaire mechanismes van statine gemedieerde toename in microvaatjes stabiliteit in beeld kunnen brengen. Atorvastatine verbetert de maturatie van de microvaatjes in de laesies door 1) de afgifte van angiopoietine 2 door endotheelcellen te remmen, 2) de Tie-2 receptor activatie te herstellen en daardoor 3) VE-Cadherin internalisatie en pericyte recruitering te remmen. In dit hoofdstuk werpen we licht

op de onderliggende mechanismes hoe atorvastatine effect heeft op de atherosclerose ontwikkeling in veneuze grafts in ApoE3*Leiden muizen op zowel lipiden verlagende afhankelijke en onafhankelijke wijze, en dan met name ook hoe de pleiotrope effecten op de nieuwe en nog nauwelijks beschreven fenomenen als plaque angiogenese en intraplaque bloedingen gereguleerd zijn.

Veneuze bypasschirurgie is één van de standaard revascularisatie strategieën bij patiënten met coronair of perifere occluderende arterieel vaatlijden. Hoewel veneuze bypasschirurgie bij de meeste patiënten de overlevingskansen vergroot en de symptomen verlicht, zijn er ook nadelen aan verbonden. Zo kunnen de veneuze grafts weer occluderen. 10 jaar na het plaatsen van de bypass is een nog maar de helft van deze vaten open, en helaas zijn er de afgelopen decennia maar weinig nieuwe ontwikkelingen geweest om dit terug te dringen. In **hoofdstuk 5** gaan we uitgebreid in op de pathofysiologische mechanismes die onderliggend zijn aan het falen van de veneuze bypass grafts, met een nadruk op de rol van het immuunsysteem en de ontstekingsfactoren die betrokken zijn bij remodelering en het falen van de veneuze bypass grafts. Voorts bespreken we aan de hand van de beschikbare data uit het preklinisch en klinisch onderzoek de mogelijke therapeutische opties

Epitopen van phosphorylcholine (PC) kunnen de inflammatoire responses modeleren. Preventieve therapieën met anti-PC antilichamen zijn ontwikkeld om het falen van de veneuze bypass grafts tegen te gaan. Passieve immunisatie met anti-PC antilichamen leidde tot preventie van atherosclerose in veneuze grafts in een hypercholesterolemisch muis model door de inflammatoire response te remmen en de opname van oxLDL te remmen. Ondanks dat de rol van intraplaque angiogenese en bloedingen bij de progressie van de laesie-vorming en de toevoer

van lipiden en ontstekingsfactoren bekend is, is de mogelijke rol van anti-PC therapie ter preventie van intraplaque angiogenese en bloedingen nog niet bestudeerd. In **hoofdstuk 6** bestuderen we het effect van een humaan IgG anti-lichaam tegen PC (PCmAb) op atherosclerose in vergevorderde laesies in veneuze grafts in het hypercholesterolemische ApoE3*Leiden muis model. We zien dat PCmAb de intraplaque angiogenese stabiliseert door de proliferatie en migratie van endotheelcellen te remmen en door de integriteit van de vaatwand van de microvaatjes in de plaques te bevorderen. PCmAb behandeling lijkt de intraplaque bloedingen op meerdere manieren te verlagen, enerzijds door de influx van erythrocyten af te remmen en anderzijds door een bepaald subtype macrofagen, de M(Hemoglobine) macrofagen, te remmen. Als we het effect van PCmAb op gekweekte humane M(Hb) macrofagen testen, dan zien we een duidelijke afname van de expressie van CD163 en afgifte van VEGF-A, wat suggereert dat epitopen op PC betrokken zijn bij de scavenger activiteiten van CD163. Daarnaast konden we aantonen dat PCmAb de intimale verdikking in de grafts remt en veel belangrijker nog, zorgt voor een toename van het vasculaire lumen, de parameter die direct gekoppeld is aan een verbetering van de doorbloeding van de grafts. De waargenomen toename in collageen in de vaatwand samen met een afname van het aantal macrofagen wijzen op een meer stabiel fenotype van de laesies in de grafts. Al met al tonen deze bevindingen aan dat behandelen met PCmAb leidt tot een toename in laesie stabiliteit, een afname van de ontstekingsreacties in de laesie en stabilisatie van de microvaatjes in de laesies. Daarom zijn we van mening dat PCmAb een veelbelovende factor is om in te grijpen in de vicieuze cirkel die er is tussen intraplaque angiogenese, intraplaque bloedingen en ontstekingsreacties in atherosclerotische laesies.

Tot slot nog enkele overwegingen met betrekking tot de klinische setting. Het is bekend dat de voorspellende waarde van gegevens verkregen in proefdiermodellen niet altijd even groot is voor uiteindelijke werkzaamheid van nieuwe behandelingen en middelen in de mens. Ondanks het feit dat het overgrote deel van de betrokken genen en eiwitten die betrokken zijn bij de ziekteprocessen in de verschillende soorten gelijk zijn, kunnen er verschillen zijn in de beschikbaarheid en biologische werkzaamheid tussen bijvoorbeeld knaagdieren en mensen. Daarom is het van belang om zo veel mogelijk gebruik te maken van gehumaniseerde diermodellen zoals de ApoE3*Leiden transgene muis, waarin de situatie in de mens zo goed mogelijk nagebootst wordt. Verder is het van belang goed stil te staan bij het tijdsplan en het verloop van de ziekteprocessen die bestudeerd worden. Interessant genoeg geldt voor veneuze bypasschirurgie dit punt niet zo zeer, het startpunt van het ziekteproces is zeer duidelijk zowel in de mens als in de muis: direct na het uitvoeren de operatie. Ook de te gebruiken concentraties van stoffen die getest gaan worden kunnen nogal verschillen tussen mens en dier. Verder dienen de effecten van eventuele comorbiditeiten niet onderschat te worden.

TOEKOMSPERSPECTIEVEN

Intraplaque angiogenese is geassocieerd met de progressie van atherosclerotische laesies en de stabiliteit van atherosclerotisch plaques. Hypoxie, een van de sturende factoren in plaque angiogenese, is ook een cruciale factor in tumor angiogenese. Sommige van de anti-angiogene therapieën die tumor angiogenese remmen, zijn ook getest in het atherosclerose veld. Echter dient gezegd te worden dat in klinische anti-angiogenese trials bij kankerpatiënten de toepassing van anti-angiogene stoffen vaak gepaard gaat met een toename in cardiovasculaire

complicaties bij deze patiënten. Vaak kan dit worden toegeschreven aan compensatoire reacties op het te sterk remmen van fysiologisch belangrijke functies van de geremde factoren zoals bijvoorbeeld VEGF. Een wenselijk alternatief zou zijn juist de aandacht te richten op die processen die door deze factoren gemoduleerd worden, zoals de regulatie van maturatie van nieuwe bloedvaatjes en de integriteit van de vaatwand. En inderdaad, voor de succesvolle tumor anti-angiogene therapieën kan gezegd worden dat de normalisatie van de tumorvasculatuur naar een normaal, stabiel en niet-lekkende vaatwand fenotype het beste resultaat geeft. De afname van de angiogene vaatjes moet gepaard gaan met een toename in de bedekking van deze vaatjes met pericyten. Interessant genoeg kunnen we zien dat dit leidt tot een toename van de oxygenatie van een tumor, die gepaard gaat met een afname in de groei van de tumoren. In lijn hiermee kunnen we stellen dat de verbetering van de integriteit van de plaque microvaatjes leidt tot een afname van de intraplaque bloedingen en toename van de plaque stabiliteit, zoals besproken in onder andere hoofdstuk 4 van dit proefschrift.

Omdat angiogenese in atherosclerose een dynamische proces is dat gereguleerd wordt, naast hypoxie, door een groot aantal factoren, zou het een logische stap zijn om bij de ontwikkeling van nieuwe therapeutische opties de aandacht te richten op inflammatoire factoren die de angiogenese in de plaque stimuleren. In dat licht verdient PCmAb, beschreven in hoofdstuk 6, onze aandacht omdat het de intraplaque angiogenese remt en de vaatwand integriteit van de microvaatjes bevordert, maar ook de CD163 macrofaag remt en daarmee de VEGF-productie van dit celtype.

We zijn van mening dat toekomstige interventies gericht dienen te zijn op anti-angiogene strategieën die de integriteit van de vaatwand van microvaatjes in de plaque handhaven of herstellen, en daarmee de intraplaque bloedingen en destabilisatie van de atherosclerotische plaque tegen gaan. Bovendien denken wij dat juist de combinatie van anti-angiogene en anti-inflammatoire aanpak in toekomstige klinische studies onderzocht dient worden voor de behandeling van atherosclerose en de preventie van plaque ruptuur, die direct aanleiding geeft tot een infarct.

Daarnaast dient gezegd te worden dat real time imaging van de dynamische processen tijdens intraplaque angiogenese, een zeer boeiende optie is om het tijdverloop van cruciale processen, zoals de vorming en maturatie van plaque microvaatjes te volgen. Two photon intravitaal microscopie zoals beschreven in hoofdstuk 3, maakt het mogelijk om de microvaatjes in de adventitia en intima laag van de vaatwand direct in beeld te brengen, en nog interessanter, het maakt de kwantificatie van de permeabiliteit van deze vaatjes in een meer realistische testomgeving dan post-mortem weefsel ook mogelijk.

Tot slot kunnen we concluderen dat de studies zoals deze beschreven zijn in dit proefschrift bijdragen aan een beter begrip van de pathofysiologische processen die ten grondslag liggen aan intraplaque angiogenese en intraplaque bloedingen in ernstige atherosclerotische laesies. Ook laat dit proefschrift zien hoe verschillende nieuwe therapeutische strategieën ingezet kunnen worden om de stabiliteit van een atherosclerotische plaque te vergroten om ruptuur en infarcten te voorkomen. Verder laat het duidelijk zien hoe nieuwe beeldvormende technieken, zoals two-photon intravitaal microscopie, ingezet kunnen worden om nieuwe therapieën te valideren. En daarmee draagt dit proefschrift bij aan een

betere begripsvorming rondom de processen van intraplaque angiogenese, intraplaque bloedingen en ontstekingsprocessen.