



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Lipids, inflammation and atherosclerosis

Stitzinger, M.

Citation

Stitzinger, M. (2007, February 1). *Lipids, inflammation and atherosclerosis*.
Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/9729>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License:

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/9729>

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

Chapter 9

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Ondanks de behandeling met cholesterol en bloeddruk verlagende geneesmiddelen, blijven hart- en vaatziekten één van de belangrijkste doodsoorzaken in de wereld. Naast een verhoogde bloeddruk en een hoge cholesterol concentratie, zijn er andere risicofactoren bekend voor het ontwikkelen van hart- en vaatziekten, zoals weinig lichaamsbeweging, roken en suikerziekte. Hart- en vaatziekten worden in de meeste gevallen voorafgegaan door atherosclerose, een proces dat in de volksmond ook wel aderverkalking wordt genoemd. Het ontstaan van atherosclerose is een proces dat tientallen jaren in beslag neemt en hoewel de klinische symptomen van atherosclerose zich meestal op latere leeftijd openbaren, wordt het proces al in de tienerjaren in gang gezet. Een atherosclerotische plaque is een verdikking van de vaatwand van een slagader. Deze verdikking kan leiden tot een vernauwing van de slagader waardoor de bloedtoevoer naar het achterliggende weefsel gehinderd wordt. Als er een infarct plaatsvindt en het ontstane tekort aan zuurstof en voedingsstoffen te lang duurt, ondervindt het weefsel ernstige schade. Een belangrijk kenmerk van de atherosclerotische plaque is de ophoping van cholesterol in de vaatwand. Daarnaast speelt het afweersysteem een zeer belangrijke rol in het ontstaan en verdere ontwikkeling van de atherosclerotische plaque. De gezonde vaatwand wordt bedekt door een laag cellen die endotheelcellen worden genoemd. Als deze endotheellaag geactiveerd raakt door bijvoorbeeld hoge cholesterol concentraties in het bloed, worden er ontstekingscellen zoals monocytën en T-cellen vanuit het bloed aangetrokken. De monocytën in de vaatwand differentiëren in macrofagen die op hun beurt het teveel aan cholesterol opnemen, waardoor zogenaamde schuimcellen ontstaan. In samenwerking met de T-cellen ontstaat er een lokale ontsteking, waarbij cytokines een belangrijke rol spelen. Naarmate de ophoping van vetten en het ontstekingsproces voortschrijden, migreren gladde spiercellen door de atherosclerotische plaque om een natuurlijke barrière te vormen tussen de plaque en het bloed. Na verloop van tijd ontstaat er een necrotische kern die voornamelijk uit dode cellen en extracellulaire cholesterolkristallen bestaat. De necrotische kern is tevens rijk aan stollingsfactoren die als ze door scheuring van de atherosclerotische plaque in aanraking met het bloed komen, bloedstolling stimuleren. Het bloedstolsel kan de achterliggende slagader van de bloedtoevoer afsluiten met het afsterven van hartspierweefsel of hersenweefsel als mogelijk gevolg.

De hoeveelheid ontstekingsstimulerende cytokines kan beslissend zijn voor de ontwikkeling van atherosclerose. Het verlagen van de hoeveelheid van deze cytokines wordt, in combinatie met cholesterol verlagende middelen, als een mogelijke therapie voor de behandeling van atherosclerose beschouwd. Andere cytokines werken juist ontstekingsremmend en kunnen

de uitscheiding van ontstekingsstimulerende cytokines verlagen. IL-9 en IL-10 zijn voorbeelden van ontstekingsremmende cytokines. Hoewel het bekend is dat ontstekingsreacties een belangrijke rol spelen in atherosclerose en dat IL-9 ontstekingsremmende eigenschappen heeft, is de rol van IL-9 in het ontstaan van atherosclerose nog niet eerder onderzocht. In **Hoofdstuk 2** hebben we getoond dat toediening van IL-9 het atherosclerotische proces remt in LDLr deficiënte muizen die gevoed worden met een vetrijk dieet. Tevens hebben we in hetzelfde muismodel aangetoond dat een blokkade van het lichaamseigen IL-9 resulteert in een snellere ontwikkeling van atherosclerotische plaques. IL-9 remt bovendien niet alleen de productie van ontstekingsstimulerende cytokines, maar ook de β -VLDL geïnduceerde schuimcelvorming en de hechting van monocytan aan endotheelcellen. Deze eigenschappen maken IL-9 zeer interessant voor de ontwikkeling van ontstekingsremmende geneesmiddelen tegen atherosclerose.

De remmende werking van IL-9 op de β -VLDL geïnduceerde schuimcelvorming werd in **Hoofdstuk 3** nader onderzocht. Schuimcellen spelen een zeer belangrijke rol in het ontstaan van atherosclerotische plaques en worden gevormd door een overdadige opname van cholesterol. *In vitro* studies hebben aangetoond dat het cholesterol dat via receptoren door schuimcellen opgenomen wordt, voornamelijk afkomstig is van lipoproteïnen zoals β -VLDL en geoxideerd LDL. Omdat bij schuimcelvorming de cholesterol homeostase verstoord is, speelt ook de uitscheiding van cholesterol een belangrijke rol. Verschillende studies laten zien dat ontstekingsreacties de vorming van schuimcellen beïnvloeden. Over het algemeen werken ontstekingsstimulerende cytokines ook stimulerend op de vorming van schuimcellen en hetzelfde principe lijkt te gelden voor ontstekingsremmende cytokines. Ook in RAW 264.7 cellen, een macrofaag cellijn afkomstig uit muizen, remde IL-9 de β -VLDL geïnduceerde schuimcelvorming. De behandeling met IL-9 had geen invloed op de uitscheiding van cholesterol, maar de genexpressie van de LDLr, LRP-1 en SR-BI, allen beschreven als receptor voor β -VLDL, werd wel verlaagd. Een mogelijke verklaring voor dit effect van IL-9 kan worden gevonden in het feit dat IL-9 de genexpressie van de nucleaire receptor PPAR α verhoogt en de genexpressie van de transcriptiefactoren SREBP-1 en SREBP-2 verlaagt. De verkregen resultaten vormen het eerste bewijs voor een direct effect van IL-9 op de expressie van genen die een sleutelrol spelen bij het ontstaan van schuimcellen. Dit kan bijdragen aan de beschermende werking van IL-9 in atherosclerose.

Verscheidene studies laten zien dat er een relatie bestaat tussen IL-9 niveaus en ziektes zoals astma en leukemie. Voorzichtigheid is dus geboden bij het toedienen van een hoge dosis IL-9 in patiënten lijdend aan atherosclerose. Om meer inzicht te krijgen in het werkingsmechanisme van IL-9 en om de resultaten in diermodellen te kunnen vertalen naar de humane situatie, is meer onderzoek nodig.

De expressie van vele genen die betrokken zijn bij de vorming van schuimcellen kan gereguleerd worden door ontstekingsmediatoren. LPS kan een hevige ontstekingsreactie ontlokken en is bovendien in staat om de expressie te beïnvloeden van genen die een rol spelen bij de opname en/of uitscheiding van cholesterol. De vetstapeling in macrofagen heeft op zijn

beurt ook weer invloed op de reactie van deze cellen op ontstekingsmediatoren. In **Hoofdstuk 4** hebben we onderzocht wat het effect is van de transformatie van macrofagen naar schuimcellen op de reactie van deze cellen op LPS. We hebben hierbij specifiek gekeken naar de expressie van genen die betrokken zijn bij de lipidenhuishouding. Er werd wederom gebruik gemaakt van RAW 264.7 cellen die tot schuimcellen werden getransformeerd door ze te incuberen met β -VLDL. Zowel in macrofagen als in schuimcellen werden de volgende genen op eenzelfde manier door LPS beïnvloed: LRP-1, ABCG1, PPAR γ , LXR β , SREBP-1 and SREBP-2. De genexpressie van LDLr, ABCA1, apoA-I en PPAR α en de eiwitexpressie van SR-BI werden in schuimcellen door LPS beïnvloedt op een wijze die verschilde van de regulatie in gewone macrofagen. Zo werd de genexpressie van apoE en ABCA1 door LPS geremd in macrofagen, terwijl de genexpressie van ABCA1 en apoA-I in schuimcellen door LPS werd gestimuleerd. Dit suggereert dat in macrofagen LPS de cholesterol uitscheiding remt, terwijl in schuimcellen juist een stimulatie optreedt. Karakterisatie van de ontstekingsreacties in macrofagen zal meer inzicht geven in het mechanisme van atherosclerose.

LPS is een component van de buitenste membraan van Gram-negatieve bacteriën waardoor monocyten en macrofagen worden gestimuleerd, zodat ze ontstekingsstimulerende cytokines gaan produceren. Een te hoge concentratie hiervan kan leiden tot cytotoxiciteit, uitval van essentiële functies van organen en uiteindelijk de dood. De signaaltransductie van LPS begint met binding van LPS aan TLR4 en CD14 waarna NF- κ B de ontstekingstimulerende genen tot expressie aanzet. LPS kan ook via scavenger receptoren opgenomen en geklaard worden, wat tot de neutralisatie van LPS leidt. De rol van een van de scavenger receptoren, SR-BI, in de reactie op LPS werd in **Hoofdstuk 5** onderzocht. Hiervoor is gebruik gemaakt van SR-BI deficiënte en wildtype muizen die werden blootgesteld aan een subletale LPS dosis. Expressie van SR-BI bleek een beschermende rol te spelen in de door LPS geïnduceerde productie van TNF- α . De opname van LPS door de lever werd niet beïnvloed door de expressie van SR-BI, maar LPS concentraties in het serum waren tijdens de eerste minuten hoger in SR-BI deficiënte muizen. Tegelijkertijd waren de serum cholesterol niveaus, met name die van HDL, hoger in SR-BI deficiënte muizen, wat de verlengde aanwezigheid van LPS in het serum kan verklaren. SR-BI deficiënte muizen vertonen een verhoging van oxidatieve stress. Behandeling met probucol, een HDL verlagende antioxidant, zorgde er wel voor dat niveaus van oxidatieve stress tot hetzelfde niveau werden gereduceerd, maar SR-BI deficiënte muizen bleven meer TNF- α produceren als reactie op LPS. Hoewel de hoeveelheid macrofagen in de lever gelijk was, leken SR-BI deficiënte muizen actievere macrofagen in de lever te hebben gezien de hogere expressie van MARCO. Bovendien waren de in de circulatie aanwezige monocyten van SR-BI deficiënte muizen ook actiever in de LPS geïnduceerde productie van TNF- α dan de monocyten van wildtype dieren. De verkregen resultaten laten zien dat SR-BI een invloed heeft op de door LPS gestimuleerde TNF- α productie en dat SR-BI een verdedigingslinie vormt tegen ontstekingsreacties.

Hoofdstuk 4 en **Hoofdstuk 5** geven meer informatie over de nauwe verbanden tussen ontstekingsreacties en lipiden. Zo produceren macrofagen normaalgesproken geen apoA-I, maar als het schuimcellen geworden zijn, dan wordt de genexpressie van apoA-I wel door LPS verhoogd. Ook de expressie van andere genen die betrokken zijn bij de uitscheiding van cholesterol, werden in schuimcellen door LPS verhoogd. Hoewel ontstekingsreacties de vorming van schuimcellen stimuleert, lijkt de verdere ontwikkeling van deze cellen door ontstekingsreacties geremd te worden. Dat het werkingsmechanisme van SR-BI zeer complex is, wordt geïllustreerd door een studie die aantoont dat SR-BI het ontstaan van atherosclerose stimuleert, terwijl het de ontwikkeling van atherosclerotische plaques in een gevorderd stadium remt. We hebben aangetoond dat SR-BI niet alleen een belangrijke rol in de vethuishouding speelt, maar dat SR-BI ook tegen door LPS geïnduceerde ontstekingsreacties beschermt.

Het in atherosclerotische plaques aanwezige cholesterol is voornamelijk afkomstig van (gemodificeerde) lipoproteïnen die vanuit het bloed in de vaatwand terecht zijn gekomen. Het consumeren van een westers dieet leidt tot hoge cholesterol niveaus in het bloed en is een belangrijke risicofactor voor het ontwikkelen van atherosclerose. De cholesterol niveaus in het bloed worden sterk beïnvloed door de aanmaak en uitscheiding van VLDL en HDL en door verwijdering van cholesterol uit het lichaam via gal. Deze processen vinden in de lever plaats en worden door parenchymcellen uitgevoerd. Parenchymcellen spelen dan ook een cruciale rol in de lipidenhuishouding van het bloed. In **Hoofdstuk 6** en **Hoofdstuk 7** hebben we microarray analyse toegepast op lever parenchymcellen om de rol van respectievelijk een westers dieet en IL-10 op deze cellen te onderzoeken. Er werd gebruik gemaakt van muizen die deficiënt waren in LDLr. De muizen werden in **Hoofdstuk 6** op een westers dieet gezet en na 0, 2, 4 en 6 weken werden genexpressieprofielen gemaakt van lever parenchymcellen. De consumptie van een westers dieet resulteerde in verhoogde VLDL en LDL niveaus in het bloed wat atherosclerosestimulerend werkt. Uit tijdsafhankelijke profilering van de genen die na het dieet veranderd waren kwamen FABP5 en vier aan FABP5 verwante genen naar voren die een belangrijke rol spelen bij de initiële reactie van parenchymcellen op een westers dieet. In de latere reactie zijn juist genen in de afbraak van glucose en in de aanmaak van lipiden betrokken.

Eerdere studies hebben aangetoond dat toediening van IL-10 het ontstaan van atherosclerose remt, hetgeen duidt op een beschermende rol voor het lichaamseigen IL-10. Deze hypothese wordt versterkt door studies die laten zien dat IL-10 deficiënte muizen een sterk verhoogde ontwikkeling van atherosclerose hebben. IL-10 werkt niet alleen ontstekingsremmend, maar in sommige studies blijkt IL-10 ook in staat te zijn om serum cholesterol niveaus te verlagen. Het werkingsmechanisme hiervan was echter tot op heden nog niet opgehelderd. In **Hoofdstuk 7** werden LDLr deficiënte muizen twee weken lang een westers dieet gevoerd om hoge cholesterol niveaus in het bloed te induceren. Hierna werden de muizen behandeld met adenoviraal IL-10 en werden ze nog twee weken lang met het westerse dieet gevoerd. De behandeling met het adenovirus resulteerde in hoge IL-10 niveaus en verlaagde cholesterol niveaus (voornamelijk LDL) in het bloed. De analyse van de microarray liet zien dat adenovirale behandeling

met IL-10 leidde tot een meer dan tweevoudige verandering in de expressie van meer dan 900 genen in parenchymcellen. Niet alleen genen waarvan bekend is dat ze door IL-10 gereguleerd worden, zoals IL-6 en TNF- α , waren veranderd, maar ook veel genen die betrokken zijn bij de lipidenhuishouding. Interessant genoeg leidde IL-10 behandeling tot een verhoogde expressie van ABCG5 en ABCG8. Beide genen zijn betrokken bij de uitscheiding van cholesterol uit het lichaam en hun door IL-10 veroorzaakte verhoogde expressie is een mogelijke verklaring voor het verlagende effect van IL-10 behandeling op cholesterol niveaus in het bloed.

Met behulp van de microarray techniek is in **Hoofdstuk 6** en **Hoofdstuk 7** aangetoond dat de expressie van vele genen in parenchymcellen beïnvloed wordt door respectievelijk een westers dieet en IL-10 behandeling. Tegelijkertijd traden er veranderingen in serum cholesterol niveaus op, wat suggereert dat lever parenchymcellen een interessant aangrijpingspunt voor de behandeling van atherosclerose kunnen zijn. De effecten van IL-10 op lever parenchymcellen laat zien dat IL-10 zijn beschermende werking op atherosclerose uitoefent door zowel ontstekingsprocessen als lipiden te beïnvloeden. Tevens zijn er uit de analyse van de microarray nieuwe genen naar voren gekomen die door IL-10 gereguleerd worden. Verder onderzoek is nodig om de rol van deze genen in de lipidenhuishouding en in atherosclerose te ontrafelen.
