



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Modulation of the inflammatory response following myocardial infarction

Pluijmert, N.J.

Citation

Pluijmert, N. J. (2021, June 3). *Modulation of the inflammatory response following myocardial infarction*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3182529>

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/1887/3182529>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <https://hdl.handle.net/1887/3182529> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Pluijmert, N.J.

Title: Modulation of the inflammatory response following myocardial infarction

Issue Date: 2021-06-03

8

Summary, conclusions, discussion, and future perspectives

SUMMARY AND DISCUSSION

Cardiovascular diseases are the leading cause of death worldwide of which the major part can be attributed to coronary artery disease (CAD). Last decades, great progress has been made regarding primary prevention and subsequent optimization of percutaneous coronary interventions (PCI) resulting in drastically reduced morbidity and mortality. Insight in etiology and disease pathology revealed atherosclerosis to be the main contributor, which seemed to be a complex lipid-driven chronic inflammatory disease on its own. In addition, acute thrombosis as a result of plaque rupture provokes acute myocardial infarction (MI) resulting in ischemic damage accompanied by an extensive post-ischemic inflammatory response ultimately leading to adverse ventricular remodeling. Timely reperfusion by primary PCI is the main goal to limit myocardial damage and infarct size (IS) resulting in a better clinical outcome. Although, restoration of myocardial blood flow itself initiates myocardial reperfusion injury. Over many years, immunomodulation of this post-ischemic inflammatory response has attracted attention of the translational research field.

The etiology and pathogenesis of both atherosclerosis and myocardial infarction are described in **chapter 1 and 2**. Both atherosclerosis and myocardial infarction are complex inflammatory processes, which also influence each other as we discussed in these chapters. Following acute myocardial ischemia, innate immunity triggers a complex inflammatory process through expression of pro-inflammatory chemokines, cytokines and inflammatory cells. Subsequently, the acute inflammatory phase turns into a reparative phase, which is followed by a final maturation phase determining the LV remodeling process. To modulate these complex inflammatory responses, the role of translational animal research is indispensable for the time being. Careful selection of experimental models, which resemble the contemporary clinical outcome more accurately might better predict the chances of successful clinical translation.

In **chapter 3**, the effects of diet-induced hypercholesterolemia on MI-R injury were evaluated regarding cardiac function, IS, and post-ischemic inflammation. Either hypercholesterolemic or normocholesterolemic APOE*3-Leiden mice were exposed to MI-R injury. It was demonstrated that diet-induced hypercholesterolemia caused a pre-ischemic peripheral monocytosis, in particular of the Ly-6C^{hi} pro-inflammatory subtype. Following MI-R injury, an impaired intrinsic LV function was found after eight weeks. Paradoxically, this was accompanied by a decreased IS and suppressed accumulation of infiltrated inflammatory cells in the ischemic-reperfused myocardium. It was suggested that both the hypercholesterolemia-associated pre-ischemic monocytosis and a possible pre-ischemic increased tolerance against myocardial ischemia contributed to the reduced IS and suppressed inflammatory response. Nevertheless, the murine hypercholesterolemic MI-R injury model seems to be a validated and suitable animal model in pre-clinical translational research.

Chapter 4 describes a role for post-ischemic human recombinant annexin A5 (AnxA5) therapy. Besides earlier reported antithrombotic effects, diagnostic properties in visualizing cell

death, and a possible therapeutic role in reversing the apoptotic process, AnxA5 was demonstrated to be a modulator in the cellular processes of the ischemic-reperfused injured myocardium. AnxA5 injection following MI-R injury caused a reduced IS, which is likely to be mediated by the attenuation of the post-ischemic inflammatory response since decreased local macrophage infiltration was observed upon AnxA5 therapy. This finally resulted in limited LV dilatation and improved cardiac function after three weeks. These effects were presumably exerted by binding externalized phosphatidylserine as a result of early apoptosis and inflammatory cell activation, which is possibly driven by IL-6 regulated pathways.

In **chapter 5**, the therapeutic role of post-ischemic administration of human phosphorylcholine (PC) monoclonal IgG₁ was tested. Promising beneficial effects regarding IgM anti-PC therapy, which showed natural IgM anti-PC to prevent uptake of apoptotic cells, immunization with anti-PC to ameliorate atherosclerosis development, and low levels of IgM anti-PC to correlate with increased risk for cardiovascular events, already suggested a therapeutic effect. In this chapter, post-ischemic injection of a new human monoclonal IgG₁ antibody directed against phosphorylcholine (PC-mAb), applicable for clinical use, was shown to reduce IS and improve cardiac function three weeks following MI-R injury. It was demonstrated that attenuation of the post-ischemic inflammatory response in an early phase by affecting circulating monocytes contributed to these ultimate beneficial effects. Decreased levels of CCL2 and circulating Ly-6C^{hi} monocytes resulted in restricted myocardial leukocyte infiltration with preservation of LV wall thickness after three weeks.

Additionally, **chapter 6** evaluated the use of PC-mAb following unreperfused MI. Since unreperfused MI as well as MI-R injury both elicit their distinctive post-ischemic inflammatory responses, PC-mAb administration and its therapeutic mechanism following unreperfused MI was investigated as well. PC-mAb injection following unreperfused MI resulted in suppression of the levels of CCL2 and circulating monocytes, which affected post-ischemic inflammation with resultant decreased local leukocyte infiltration. Upon unreperfused MI, IS and LV remodeling were limited, however, therapeutic effect regarding cardiac function was lacking as compared to administration subsequent to MI-R injury. This suggests different therapeutic mechanisms or limited therapeutic effectiveness as a result of extended myocardial injury following unreperfused MI passing 'a point of no return' being less amenable for immunomodulatory therapies.

Finally, **chapter 7** questioned the value of animal models currently used in translational research. A comparison between MI-R injury and unreperfused MI in hypercholesterolemic APOE*3-Leiden mice demonstrated a reduced IS, restricted LV dilatation and LV wall thinning, but no preservation of cardiac function three weeks following MI-R injury. In addition, a different distributed inflammatory response regarding local leukocyte infiltration revealed the importance of selecting an appropriate animal model to ensure optimal translation of novel cardioprotective therapies from bench to bedside. By taking into account a hypercholesterolemic phenotype as well as MI-R injury, the hypercholesterolemic APOE*3-Leiden MI-R injury model potentially provides better predictive value of experimental therapies in successive clinical trials.

FUTURE PERSPECTIVES

Post-ischemic myocardial inflammation plays an important and indispensable role in myocardial wound healing. However, if untreated, it ultimately results in scar tissue formation associated with adverse LV remodeling. Fortunately, counteracting maladaptive inflammatory pathways proves to be beneficial and preserves post-ischemic cardiac function, mainly in a pre-clinical setting. Although, one should keep in mind that affecting maladaptive inflammation not interferes benign wound healing.

Pre-clinical studies regarding recombinant AnxA5 and PC-mAb therapy proved to beneficially affect post-ischemic wound healing and LV remodeling with preservation of cardiac function. The ultimate goal to successfully translate these therapies and achieve clinical application, requires a process of efficacy and safety studies with determination of optimal therapeutic dose and time point of administration. Since, these immunomodulatory therapies are only able to limit ischemic damage, additional treatment strategies are required to obtain regeneration of damaged cardiac tissue. Besides their immunomodulatory effects, cell therapy for instance might additionally contribute to new strategies in cardiac regenerative medicine. Furthermore, to improve and increase the percentage of pre-clinical research successfully translated towards new clinical therapies, hypothesized beneficial effects must be determined more accurately in this pre-clinical setting. Improving and optimizing translational experimental animal models, like the MI-R injury model in hypercholesterolemic APOE*3-Leiden mice, or possible development of new research models, could contribute in increasing this success rate.

NEDERLANDSE SAMENVATTING EN DISCUSSIE

Hart- en vaatziekten zijn wereldwijd de belangrijkste doodsoorzaak waarvan het grootste deel kan worden toegeschreven aan coronairlijden. De laatste decennia is er grote vooruitgang geboekt op het gebied van primaire preventie en aanvullende optimalisatie van percutane coronaire interventies (PCI), resulterend in een sterk verminderde morbiditeit en mortaliteit. Inzichten in de etiologie en pathologie toonden aan dat de belangrijkste veroorzaker atherosclerose is, wat een op zichzelf staande complexe lipide-gedreven chronische inflammatoire ontstekingsziekte blijkt te zijn. Bovendien veroorzaakt acute thrombose als gevolg van een plaqueruptuur een acuut myocardinfarct (MI), resulterend in ischemische schade die gepaard gaat met een uitgebreide post-ischemische ontstekingsreactie leidend tot ongunstige ventriculaire remodelering. Tijdige reperfusie door primaire PCI is het belangrijkste doel om myocardiale schade en infarctgrootte te beperken, wat resulteert in een betere klinische uitkomst. Echter, het herstel van de coronaire perfusie zelf induceert myocardiale reperfusieschade. Gedurende vele jaren heeft immunomodulatie van deze post-ischemische inflammatoire respons de aandacht getrokken van het translationele onderzoeksveld.

De etiologie en pathogenese van zowel atherosclerose als een myocardinfarct worden beschreven in **hoofdstuk 1 en 2**. Zowel atherosclerose als een myocardinfarct zijn complexe ontstekingsprocessen die elkaar ook beïnvloeden. Na acute myocardiale ischemie veroorzaakt het aangeboren afweersysteem een complex ontstekingsproces door expressie van pro-inflammatoire chemokinen, cytokinen en ontstekingscellen. Hierop volgend verandert de acute ontstekingsfase in een reparatiefase die wordt gevolgd door een laatste maturatiefase welke het LV remodeleringsproces bepaalt. Om deze complexe ontstekingsreacties te moduleren, is de rol van translationeel dierexperimenteel onderzoek vooralsnog onmisbaar. Een zorgvuldige selectie van experimentele modellen die nauwkeuriger lijken op de huidige klinische uitkomst, zou de kansen op succesvolle klinische vertaling beter kunnen voorstellen.

In **hoofdstuk 3** worden de effecten van dieet-geïnduceerde hypercholesterolemie op myocardiale ischemie-reperfusie (MI-R) schade geëvalueerd met betrekking tot hartfunctie, infarctgrootte en post-ischemie inflammatie. Zowel hypercholesterolemische als normocholesterolemische APOE*3-Leiden muizen werden blootgesteld aan MI-R schade. Er werd aangetoond dat dieet-geïnduceerde hypercholesterolemie een pre-ischemische perifere monocytose veroorzaakte, in het bijzonder van het Ly-6C^{hi} pro-inflammatoire subtype. Na MI-R schade werd na acht weken een verminderde LV-functie vastgesteld. Paradoxaal genoeg ging dit gepaard met een kleinere infarctgrootte en onderdrukte accumulatie van geïnfiltreerde ontstekingscellen in het ischemisch-gereperfundeerde myocard. Er werd gesuggereerd dat zowel de hypercholesterolemie-geassocieerde pre-ischemische monocytose alsook een mogelijk pre-ischemische verhoogde tolerantie betreffende myocardiale ischemie bijdroegen aan de kleinere infarctgrootte en onderdrukte inflammatoire respons. Desalniettemin lijkt het experimentele MI-R model in

hypercholesterolemische APOE*3-Leiden muizen een gevalideerd en geschikt model in preklinisch translationeel onderzoek.

Hoofdstuk 4 beschrijft een rol voor post-ischemische humane recombinant annexine A5 (AnxA5) behandeling. Naast eerder gerapporteerde anti-thrombotische effecten, diagnostische eigenschappen bij het visualiseren van celdood en een mogelijke therapeutische rol bij het omkeren van het apoptotische proces, werd aangetoond dat AnxA5 een modulator is van de cellulaire processen van het ischemisch-gereperfundeerde myocard. AnxA5-injectie na MI-R schade veroorzaakte een kleinere infarctgrootte die waarschijnlijk wordt veroorzaakt door de geremde post-ischemische inflammatoire respons, aangezien verminderde lokale infiltratie van macrofagen werd waargenomen na behandeling met AnxA5. Dit resulteerde uiteindelijk in beperkte LV dilatatie en een verbeterde hartfunctie na drie weken. Deze effecten werden vermoedelijk bereikt door binding van extern geproduceerd fosfatidylserine als gevolg van vroege apoptose en inflammatoire celactivering welke mogelijk wordt aangestuurd door IL-6-gereguleerde processen.

In **hoofdstuk 5** werd de therapeutische rol van post-ischemische toediening van humaan fosforylcholine (PC) monoklonaal IgG₁ getest. Veelbelovende gunstige effecten met betrekking tot IgM anti-PC therapie, die eerder aantoonde dat natuurlijk IgM anti-PC de opname van apoptotische cellen verhinderde, immunisatie met anti-PC wat de ontwikkeling van atherosclerose gunstig beïnvloedde, alsook lage IgM anti-PC waarden die correleerden met een verhoogd risico op cardiovasculaire events, suggereerden al een therapeutisch effect. In dit hoofdstuk wordt aangetoond dat post-ischemische injectie van een nieuw humaan monoklonaal IgG₁ antilichaam gericht tegen fosforylcholine (PC-mAb), toepasbaar voor klinisch gebruik, de infarctgrootte vermindert en de hartfunctie verbetert drie weken na MI-R schade. Aangetoond werd dat verzwakking van de post-ischemische inflammatoire respons in een vroege fase door beïnvloeding van circulerende monocytten bijdroeg aan deze uiteindelijk gunstige effecten. Verlaagde waarden van CCL2 en circulerende Ly-6C^{hi} monocytten resulteerden in beperkte myocardiale infiltratie van leukocyten, resulterend in behoud van LV-wanddikte na drie weken.

Aansluitend hierop werd in **hoofdstuk 6** het gebruik van PC-mAb geëvalueerd na permanente myocardiale schade zonder reperfusie. Omdat permanente myocardiale schade en MI-R schade beide hun kenmerkende post-ischemische inflammatoire respons induceren, werd de toediening van PC-mAb en het therapeutisch mechanisme na permanente myocardiale schade ook onderzocht. PC-mAb injectie na permanente myocardiale schade resulteerde in onderdrukking van de waarden van CCL2 en circulerende monocytten die de post-ischemische inflammatoire respons beïnvloeden met als gevolg een verminderde lokale infiltratie van leukocyten. Bij permanente myocardiale schade waren zowel de infarctgrootte als LV remodellering beperkt, maar het therapeutisch effect met betrekking tot hartfunctie bleef uit vergeleken met toediening na MI-R schade. Dit suggereert verschillende therapeutische mechanismen of een beperkte therapeutische effectiviteit als gevolg van langdurige myocardiale schade na permanente myocardiale ischemie waarbij 'a point of no return' wordt gepasseerd leidend tot een verminderde vatbaarheid voor immunomodulerende therapieën.

Tenslotte wordt in **hoofdstuk 7** de waarde van het gebruik van diermodellen in translationeel onderzoek behandeld. Een vergelijking tussen MI-R en permanente myocardiale schade in hypercholesterolemische APOE*3-Leiden muizen toonde een kleinere infarctgrootte, beperkte LV-dilatatie en -wandverdunning drie weken na MI-R schade, maar zonder behoud van hartfunctie. Bovendien onthulde een verschillend distributiepatroon van lokaal geïnfilterde leukocyten het belang van het selecteren van een geschikt diermodel om een optimale vertaling van nieuwe cardioprotectieve therapieën van laboratorium naar kliniek te garanderen. Door rekening te houden met een hypercholesterolemisch fenotype en MI-R schade, biedt het hypercholesterolemische APOE*3-Leiden MI-R model een betere voorspellende waarde van experimentele therapieën in klinisch vervolgonderzoek.

TOEKOMSTPERSPECTIEVEN

Post-ischemische myocardiale inflammatie speelt een belangrijke en onmisbare rol bij het herstel van myocardiale schade. Echter, als het niet wordt behandeld, resulteert dit uiteindelijk in de vorming van littekenweefsel welke gepaard gaat met een ongunstige LV remodellering. Gelukkig blijkt het tegengaan van een nadelige inflammatoire respons gunstig te zijn en de post-ischemische hartfunctie te verbeteren, voornamelijk in een preklinische setting. Men moet echter in gedachten houden dat het beïnvloeden van de nadelige inflammatoire respons niet interfereert met benigne wondgenezing.

Preklinische studies betreffende het gebruik van recombinant AnxA5 en PC-mAb therapie bleken een gunstig effect te hebben op de post-ischemische inflammatoire respons en LV remodellering resulterend in een verbeterde hartfunctie. Het uiteindelijke doel om deze therapieën met succes te vertalen naar een klinische toepassing, vereist een proces van effectiviteits- en veiligheidsstudies met bepaling van de optimale therapeutische dosis en het tijdstip van toediening. Aangezien deze immunomodulerende therapieën alleen ischemische schade kunnen beperken, zijn aanvullende behandelingsstrategieën vereist om regeneratie van beschadigd myocard te verkrijgen. Naast hun immunomodulerende effecten, kan celtherapie bijvoorbeeld ook bijdragen aan nieuwe strategieën in de regeneratieve geneeskunde van het hart. Om het percentage preklinisch onderzoek dat met succes wordt vertaald naar nieuwe klinische therapieën te vergroten, moeten de hypothetische gunstige effecten nauwkeuriger worden onderzocht in deze preklinische setting. Het verbeteren en optimaliseren van translationele experimentele diermodellen, zoals het MI-R model in hypercholesterolemische APOE*3-Leiden muizen, of mogelijke ontwikkeling van nieuwe onderzoeksmodellen, zouden kunnen bijdragen aan het verhogen van dit succespercentage.

