



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Immunity in atherosclerosis: novel assays, biomarkers and therapeutic approaches**

Grievink, H.W.

### **Citation**

Grievink, H. W. (2023, October 26). *Immunity in atherosclerosis: novel assays, biomarkers and therapeutic approaches*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3655349>

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/1887/3655349>

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



**CHAPTER 11**  
**Nederlandse samenvatting**

Hart- en vaatziekten zijn wereldwijd de belangrijkste doodsoorzaak.<sup>1</sup> Hart- en vaatziekten omvatten alle aandoeningen van het hart en het vaatsysteem, waaronder onder andere beroertes, hartritmestoornissen, hartfalen, aangeboren hartafwijkingen en hartinfarcten vallen. De belangrijkste onderliggende oorzaak voor hart- en vaatziekten is atherosclerose, ook wel slagaderverkalking genoemd. Atherosclerose wordt gekenmerkt door de vorming van een plaque, voornamelijk bestaande uit lipiden en ontstekingscellen, in de vaatwand. Uiteindelijk kan deze plaquevorming leiden tot atherotrombose of stenose van het bloedvat wat resulteert in een hartinfarct, longembolie of beroerte en uiteindelijk tot de dood kan leiden.

De ontwikkeling van atherosclerose begint al bij jongvolwassenen,<sup>2,3</sup> en ontwikkelt zich langzaam in de meeste mensen. Er zijn diverse risicofactoren die de ontwikkeling van atherosclerose beïnvloeden. Sommige zijn aanpasbaar, zoals levensstijl, waaronder roken en dieet, terwijl andere niet beïnvloedbaar zijn, zoals leeftijd en erfelijke factoren. De ontwikkeling van atherosclerose begint met een disbalans in cholesterolwaarden in het bloed, voornamelijk een verhoging van de hoeveelheid lipoproteïnen met een lage dichtheid (low density lipoproteins, LDL). LDL accumuleert in de subendotheliale ruimte in de vaatwand op plaatsen waar een hoge verstoring in de bloedsomloop is, zoals in de cardiovasculaire bloedvaten. Momenteel bestaat de behandeling van atherosclerose, naast chirurgisch ingrijpen bij acute klinische klachten, uit het gebruik van cholesterolverlagende middelen. Daarnaast wordt levensstijlverandering geadviseerd en worden anticoagulantia en bloeddrukverlagende middelen voorgeschreven. Hoewel atherosclerose primair een ziekte is die wordt veroorzaakt door lipiden, speelt het immuunsysteem ook een belangrijke rol tijdens de ontwikkeling van atherosclerose. Daarom wordt atherosclerose tegenwoordig ook gezien als een chronische ontstekingsziekte. De behandeling met cholesterolverlagende middelen is maar gedeeltelijk succesvol, aangezien de kans op terugkerende cardiovasculaire events groot blijft.<sup>4</sup> Dit benadrukt de noodzaak voor additionele therapieën om atherosclerose te behandelen. Bij de ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën is het essentieel om de rol van het immuunsysteem tijdens de ontwikkeling van atherosclerose, en het micromilieu van de plaque zelf, te ontrafelen om nieuwe diagnostische tools en behandelingen voor atherosclerose te kunnen ontwikkelen.

## HET IMMUNUSYSTEEM IN ATHEROSCLEROSE

Zoals hierboven genoemd, begint atherosclerose met een ophoping van LDL in de vaatwand. In de vaatwand wordt LDL geoxideerd (oxLDL), en hierbij wordt het immuunsysteem geactiveerd. In eerste instantie spelen macrofagen een grote rol. Ze fagocyteren oxLDL en differentiëren hierdoor naar pro-inflammatoire schuimcellen.<sup>5,6</sup> Naast oxLDL kunnen ook cholesterolkristallen zich ophopen in macrofagen wat leidt tot activatie van het inflammasoom,<sup>7,8</sup> een eiwit dat resulteert in productie en uitscheiding van het cytokine interleukine(IL)-1 $\beta$  en verdere inflammatie. Naast macrofagen migreren neutrofielen, ook onderdeel van het aangeboren immuunsysteem, in een vroeg stadium naar de plaque. Na neutrofielactivatie vindt er opregulatie van adhesiemoleculen plaats wat dysfunctie van het endotheel verergert.<sup>9</sup> Tijdens de eerste stadia van de ontwikkeling van atherosclerose speelt het aangeboren immuunsysteem een belangrijke rol. In latere stadia wordt het verworven immuunsysteem ook geactiveerd. In de plaque zijn T-cellen te vinden, die bijvoorbeeld oxLDL-specifieke epitopen herkennen.<sup>10,11</sup> Daarnaast spelen B-cellen ook een rol bij atherosclerose, onder andere door de productie van antilichamen tegen oxLDL.

Niet alle immuuncellen spelen een atherogene rol tijdens de ontwikkeling van atherosclerose. Sommige immuuncellen remmen de ontwikkeling van atherosclerose, voornamelijk door het onderdrukken van de immuunrespons. Regulatorische T- en B-cellen bijvoorbeeld, remmen activatie van het verworven immuunsysteem, voornamelijk door de uitscheiding van het anti-inflammatoire cytokine IL-10. Daarnaast kunnen B-cellen atherosclerose remmen door de productie van antilichamen tegen oxLDL van het immunoglobuline(Ig)M type. Wanneer oxLDL-IgM bindt aan oxLDL, wordt de opname van oxLDL door macrofagen geblokkeerd en worden de partikels uiteindelijk geklaard door de lever.<sup>12-14</sup> In tegenstelling tot oxLDL-IgM zorgt oxLDL-specifiek IgG er juist voor dat oxLDL sneller wordt opgenomen door macrofagen, en versterkt het daarmee de plaque ontwikkeling.<sup>15</sup>

## IMMUNOMODULATIE VAN ATHEROSCLEROSE

Aangezien het immuunsysteem een belangrijke rol speelt in de ontwikkeling van atherosclerose, is modulatie van het immuunsysteem een potentieel belangrijke methode om cardiovasculaire events te voorkomen. Recent



zijn de eerste klinische studies uitgevoerd in patiënten met hart- en vaatziekten naar het effect van immunomodulatie op terugkerende cardiovasculaire events. De eerste klinische studie die effect liet zien is de CANTOS (canakinumab antiinflammatory thrombosis outcome study) trial. Tijdens deze studie zijn patiënten, die zijn opgenomen voor een hartinfarct en met een hsCRP level >2mg/L (een indicatie voor ontsteking), behandeld met canakinumab, een antilichaam dat IL-1 $\beta$  blokkeert, of een placebo.<sup>16</sup> De studie toonde aan dat de patiënten behandeld met canakinumab minder kans hadden op een terugkerend cardiovasculair event. Behandeling met colchicine, een breed immunosuppressief middel, resulteerde in een lagere kans op een terugkerend cardiovasculair event.<sup>17</sup> Helaas liet de CANTOS trial ook zien dat patiënten behandeld met canakinumab een hogere kans hadden op een fatale infectie, wat aangeeft dat de balans tussen immuunactivatie en immunosuppressie precair is, en dat immunomodulatie voorzichtig moet worden toegepast en bij voorkeur specifiek voor atherosclerose.

## DOEL VAN HET ONDERZOEK

Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift is het ontwikkelen van diagnostische handvaten en potentiële biomarkers gericht op de identificatie van immunomodulatoire medicijn-effecten in toekomstige klinische studies. Daarnaast is er onderzoek verricht naar nieuwe immunomodulatoire strategieën om atherosclerose te remmen, zowel in muisen als in de mens.

### *Deel I: Identificatie van potentiële atherosclerose gerelateerde biomarkers, en ontwikkeling van assays voor gebruik in klinische studies*

In Hoofdstuk 2 is een observationele klinische studie beschreven waarin het effect van leeftijd en roken, beiden risicofactoren voor hart- en vaatziekten, op het immuunsysteem is onderzocht. In deze studie zijn vijf groepen vrijwilligers geïncludeerd. Dit zijn jonge, gezonde vrijwilligers (18-25 jaar, n=30), gezonde ouderen (>60 jaar, n=20), jonge rokers (18-25 jaar, n=20), zware rokers (>45 jaar, n=11) en patiënten met coronaire hartziekten (>60 jaar, n=27). In deze groepen werden circulerende immuuncellen geanalyseerd met flowcytometrie, monocyt- en T-cel responsen na volbloed stimulatie gemeten en proteomics gebruikt om inflammatoire eiwitten te meten. Ondanks kleine groeps groottes, waren er duidelijke effecten te zien van zowel veroudering als roken op het immuunsysteem.

In ouderen was een lager niveau van totaal CD8<sup>+</sup> T-cellen en naïeve CD4<sup>+</sup> en CD8<sup>+</sup> T-cellen te zien, met een verhoging in CD4<sup>+</sup> en CD8<sup>+</sup> effector geheugen-cellen. Daarnaast werd een verhoogd niveau gevonden van de pro-inflammatoire en chemotactische eiwitten TREM1 en CCL11 in ouderen. Het immuunsysteem van zware rokers was in het algemeen in een verhoogd geactiveerde staat, met verhoogde neutrofiel-aantallen, een hoger percentage TH1-cellen en interferon (IFN) $\gamma$ -producerende T-cellen, en minder regulatoire B-cellen. Het immuunsysteem van de hartpatiënten leek over het algemeen op dat van de gezonde ouderen, waarschijnlijk door het gebruik van immunomodulatoire medicatie, zoals statines. Wel was het atheroprotectieve OXLDL-specifieke IgM significant verlaagd in patiënten, in vergelijking met gezonde jongeren. Deze data laten zien dat in relatief kleine groepen duidelijke immunologische verschillen tussen populaties aan te tonen zijn, wat deze populaties (voornamelijk ouderen en zware rokers) potentieel geschikt maakt als ‘modelpopulatie’ in klinische studies, afhankelijk van het medicijn dat getest gaat worden. In hoofdstuk 3 wordt onderzoek naar het effect van lipopolysacchariden- (LPS) stimulatie op neutrofielen beschreven. Neutrofielen spelen een rol in het beginstadium van atherosclerose zoals hierboven beschreven, maar neutrofielen spelen ook een belangrijke rol bij de destabilisatie van de plaque.<sup>18-20</sup> Om nieuwe medicijnen gericht op neutrofielfunctie te testen in gezonde vrijwilligers, is activatie van neutrofielen nodig aangezien neutrofielen in deze populatie onder basale omstandigheden niet geactiveerd zijn. Hiervoor kan een intraveneuze toediening van LPS gebruikt worden, die zorgt voor een korte inflammatoire respons van enkele uren. In het onderzoek in hoofdstuk 3 wordt beschreven dat deze LPS-toediening zorgt voor activatie van neutrofielen, gemeten aan de hand van activatiemarkers met flowcytometrie en de uitscheiding van eiwitten uit de granules van neutrofielen in het plasma. Deze metingen werden ook uitgevoerd in LPS-gestimuleerde volbloedkweken van gezonde vrijwilligers. De effecten van de *in vitro* stimulatie komen grotendeels overeen met die van de *in vivo* stimulatie. Op basis van deze uitkomsten kunnen de *in vitro* en *in vivo* LPS-stimulaties toegepast worden in toekomstige klinische onderzoeken met nieuwe neutrofiel-gerichte middelen. In hoofdstukken 4 en 5 wordt de ontwikkeling van volbloedassays beschreven, wat waardevolle assays zijn om te gebruiken in klinische studies om medicatie-effecten te meten. In hoofdstuk 4 wordt de ontwikkeling van een volbloed NLRP3 inflammasoom assay beschreven. Zoals eerder al genoemd,

speelt het inflammasoom een belangrijke rol tijdens de ontwikkeling van atherosclerose, en inhibitie van IL-1 $\beta$  (geproduceerd na inflammasoom activatie) was succesvol in het verlagen van de kans op een terugkerend cardiovasculair event. Voor toekomstige klinische studies gericht op (modulatie van) inflammasoom activiteit is een goede assay van belang. In de assay beschreven in hoofdstuk 4 wordt volbloed eerst gestimuleerd met LPS, om cellen aan te zetten tot inflammasoom-activatie, gevolgd door toevoeging van ATP als tweede stimulus om het inflammasoom volledig te activeren. We laten zien dat deze assay geschikt is om inflammasoom-activatie, en de daaropvolgende IL-1 $\beta$ - en IL-18-productie, te meten terwijl het bloed minimaal verdund wordt. Hierdoor is het een geschikte assay voor gebruik tijdens klinische studies om medicijneffecten te monitoren. In hoofdstuk 5 werd de volbloedassay verder gekarakteriseerd. In dit hoofdstuk is gekeken naar het effect van veroudering van bloedmonsters op de cytokineproductie door monocyt en lymfocyt. Volbloed werd gestimuleerd met LPS om monocyt te activeren, of PMA + ionomycine of SEB om lymfocyt te activeren. Dit werd gedaan direct na bloedafname tot maximaal 24 uur na bloedafname. De respons van monocyt verminderde snel gedurende de veroudering, na 30 minuten is de uitscheiding van cytokinen al verlaagd met 20–50%, verder dalend tot 80–100% 10 uur na bloedafname. De respons van lymfocyt was veel stabiel, de uitscheiding van cytokinen was verlaagd met 20–50% 24 uur na bloedafname. Het toevoegen van kweekmedium, en daarmee nutriënten, herstelde het vermogen tot cytokineproductie niet, wat laat zien dat de geobserveerde vermindering waarschijnlijk niet door een tekort aan nutriënten kwam. Daarnaast bleef de hoeveelheid cellen die cytokinen produceren gelijk, wat duidt op een afname van cytokineproductie en niet het afsterven van cellen. Deze data laten zien dat snelle monsterverwerking belangrijk is wanneer monocytresponsen worden gemeten in volbloedkweken.

## DEEL II: IMMUNOMODULATIE VAN ATHEROSCLEROSE

In Hoofdstuk 6 wordt een klinische studie beschreven waarin gezonde vrijwilligers werden gevaccineerd met het pneumokokkenvaccin Prevenar-13 of een placebo om de effecten van vaccinatie op circulerende antilichamen tegen OXLDL en phosphorylcholine (PC) te meten. In muizen is beschreven dat immunisatie van muizen met *Streptococcus pneumoniae* resulteerde in een verhoging van het circulerende OXLDL-specifieke IgM-gehalte en

daardoor een verlaging van atherosclerose-ontwikkeling.<sup>21</sup> Deze toename in OXLDL-specifiek IgM komt door de aanwezigheid van PC in de celwand van *Streptococcus pneumoniae* dat moleculaire overeenkomsten vertoont met OXLDL. Gezonde vrijwilligers werden gerandomiseerd om 0, 1, 2 of 3 vaccinaties te krijgen met Prevenar-13, en OXLDL, PC-antilichamen en lipidegehalten in het serum werden gemeten vanaf baseline tot 68 weken na de eerste dosis. Helaas werd er geen effect gevonden van vaccinatie op de eerdergenoemde eindpunten. Dit kan liggen aan het feit dat het Prevenar-13-vaccin bestaat uit specifieke peptiden van *Streptococcus pneumoniae* in tegenstelling tot de immunisatie in muizen, waarbij de volledige bacterie gebruikt werd. Hierdoor is mogelijk de hoeveelheid PC, en dus de antilichaamrespons, tegen het vaccin lager. Daarnaast kan het zijn dat de situatie in de muis niet vertaalbaar is naar de situatie in de mens. In Hoofdstuk 7 zijn de effecten van hydroxychloroquine (HCQ) op zowel *in vitro* als *in vivo* celactivatie bestudeerd. HCQ is een breed immunosuppressief medicijn, dat gebruikt wordt voor de behandeling van malaria, en diverse auto-immuunziekten. Een klinische studie naar het effect van HCQ op terugkerende cardiovasculaire events is momenteel gaande.<sup>22</sup> Het exacte werkingsmechanisme van HCQ en de dosisafhankelijkheid van de immunosuppressieve effecten is nog onbekend. In deze studie hebben werden immuunsuppressie-assays uitgevoerd met immuuncellen van gezonde vrijwilligers die oraal HCQ toegediend kregen, en vergeleken met celkweken met perifere bloed mononucleaire cellen (PBMCs), waarbij HCQ direct aan de cellen toegevoegd werd. Het effect van HCQ op endosomale TLR-stimulatie werd onderzocht door PBMCs te stimuleren met TLR3-, -7-, en -9- liganden en vervolgens IFN $\alpha$ - en IL-6-productie te meten. Daarnaast zijn de effecten op T- en B-celproliferatie gemeten. In de *in vitro* experimenten werden duidelijke suppressie van zowel TLR-responsen als B-celproliferatie gevonden bij concentraties >1000ng/mL. Er werd geen effect op T-cel-activatie en proliferatie gevonden, wat mogelijk veroorzaakt werd door de gekozen stimulus. Deze was mogelijk te sterk om een medicatie-effect te kunnen meten. De concentraties HCQ die gevonden werden in plasma van HCQ-gedoseerde proefpersonen, waren lager dan de concentraties waarbij effect te zien was *in vitro*. Hierdoor was er ook weinig immuunsuppressie in de *ex vivo* cellulaire assays. Ondanks dat er geen immuun suppressie te zien was in onze gedoseerde proefpersonen, werkt HCQ wel bij de behandeling van auto-immuunziekten. Dit komt waarschijnlijk doordat de lokale concentraties HCQ

in de weefsels en intracellulair hoger zijn dan wat we in plasma kunnen meten. Hoofdstuk 8 beschrijft een klinische trial waarbij het nieuwe medicijn amlitelimab (KY1005), een antilichaam dat OX40L blokkeert, is getest in gezonde vrijwilligers. OX40L wordt tot expressie gebracht op antigeen-presenterende cellen en speelt een rol bij de activatie van T-cellen: het is een zogenaamde co-stimulatie-factor die nodig is voor volledige activatie van T-cellen via binding aan OX40. Om te testen of amlitelimab zowel klinisch veilig is als ook daadwerkelijk immuunsuppressief werkt, werd vaccinatie met het neo-antigen keyhole limpet hemocyanin (KLH) toegepast. Ook is het effect op een herhaalvaccinatie met tetanus getest. Eerder is in muizen aangetoond dat het blokkeren van de OX40-OX40L signalering atherosclerose significant remt.<sup>23,24</sup> Blokkeren van OX40L in de mens zou dus ook mogelijk een goede methode zijn om atherosclerose te remmen. De toediening van amlitelimab leidde alleen tot milde bijwerkingen. Amlitelimab-behandeling verlaagde de KLH-specifieke IgG-productie, maar niet significant. Daarnaast was de respons op een intradermale KLH-injectie na vaccinatie significant verlaagd in de vrijwilligers die amlitelimab kregen ten opzichte van placebo. Deze resultaten laten zien dat amlitelimab veilig is om toe te dienen, en ook in de mens de immunorespons remt. Hoofdstuk 9 beschrijft een muizenstudie waarbij het effect van stimulatie van het immuuncheckpoint-eiwit PD-1 op atherosclerose ontwikkeling is getest. PD-1 komt tot expressie op geactiveerde T- en B-cellen en bij binding aan hun ligand (PD-L1 of PD-L2) wordt de T- of B-cel geremd, een zogenaamd co-inhibitoir signaal. Eerdere studies in muizen hebben aangetoond dat inhibitie van het PD-1 signaal resulteerde in verergering van atherosclerose-ontwikkeling, wat leidde tot de hypothese dat stimulatie van het PD-1-signaal ontwikkeling van atherosclerose zal remmen.<sup>25-27</sup> Voor dit experiment zijn LDLR<sup>-/-</sup> muizen gebruikt. Deze muizen missen de receptor voor LDL, waardoor de hoeveelheid cholesterol in het bloed stijgt wanneer deze muizen een dieet met een hoog cholesterolgehalte krijgen. Hierdoor ontwikkelen deze muizen atherosclerose. Stimulatie van PD-1 met een agonistisch antilichaam resulteerde inderdaad in een verlaging van atherosclerose-ontwikkeling. Daarnaast zagen we dat de monocytinflux in het bloed, veroorzaakt door hoge cholesterolgehalten, werd vertraagd. Ook was er een verhoging van B1-cellen in het bloed met daarbij behorende verhoging van OXLDL-specifiek IgM en een verlaging van pro-inflammatoir IFN $\gamma$  producerende T-cellen en verhoging van T-cellen die het anti-inflammatoire cytokine

IL-10 produceren. Deze resultaten tonen aan dat stimulatie van het PD-1-signaal inflammatie remt en daardoor de atherosclerose-ontwikkeling.

## PERSPECTIEVEN

Momenteel lopen patiënten met hart- en vaatziekten veroorzaakt door atherosclerose een groot risico op (terugkerende) cardiovasculaire events. Om dit risico te verkleinen zijn nieuwe geneesmiddelen voor atherosclerose nodig. Aangezien het immuunsysteem een belangrijke rol speelt tijdens de ontwikkeling van atherosclerose, lijkt immunomodulatie een belangrijke stap richting deze nieuwe behandelmethoden. Er zijn enkele klinische studies uitgevoerd waarvan er twee succesvol waren, namelijk het gebruik van canakinumab (een IL-1 $\beta$  inhibitor) en colchicine.<sup>16,17,28</sup> Beide medicijnen hebben een brede immunosuppressieve werking. Het risico daarbij is dat er bijwerkingen zijn. Dit is bijvoorbeeld geïllustreerd in de studie met canakinumab, waarbij het risico op (fatale) infecties groter was in vergelijking met placebo.<sup>16</sup> Om de kans op bijwerkingen zo klein mogelijk te houden is het nodig om medicijnen te hebben die specifiek atherosclerose remmen. Daarnaast zijn niet alle patiënten met hart- en vaatziekten hetzelfde: het risico op een terugkerend cardiovasculair event is verschillend tussen patiënten. Zo waren patiënten met een verhoogde waarde van hs-CRP meer gebaat bij behandeling met canakinumab dan patiënten met lagere ontstekingswaarden.<sup>29</sup>

Op het moment richten klinische studies zich vooral op het voorkomen van terugkerende cardiovasculaire events, maar idealiter zou een primair cardiovasculair event voorkomen de voorkeur hebben. Hiervoor is een behandeling nodig, die specifiek is voor de individuele patiënt en zonder (serieuze) bijwerkingen. Het is lastig te voorspellen welke personen risico lopen op een cardiovasculair event aangezien vrijwel iedereen in meer of mindere mate atherosclerose ontwikkelt gedurende zijn/haar leven. Het verhogen van OXLDL-specifiek IgM lijkt een ideale methode. In diverse muizenstudies is namelijk gebleken dat dit de ontwikkeling van atherosclerose remt,<sup>21</sup> en ook in de mens is aangetoond dat het niveau van OXLDL-IgM omgekeerd correleert met de hoeveelheid atherosclerose.<sup>30</sup> Vaccinatie zou alleen OXLDL-specifiek IgM moeten verhogen, en niet IgG, aangezien OXLDL-specifiek IgG juist atherosclerose-ontwikkeling stimuleert via de verhoogde opname van OXLDL door macrofagen. Ook in de mens is OXLDL-specifiek IgG gecorreleerd met atherosclerose.<sup>31,32</sup> Een

behandeling of vaccinatie zou zich dus vooral moeten richten op de B1-cellen, die verantwoordelijk zijn voor productie van autoantilichamen van het IgM-subtype. Een andere methode kan zijn om class-switching naar het IgG-subtype te blokkeren tijdens vaccinatie. Dit zou mogelijk gedaan kunnen worden met het blokkeren van de OX40-OX40L signalering, OX40 speelt namelijk een belangrijke rol bij class-switching van IgM naar IgG.<sup>33</sup>

## CONCLUSIES

Het voorkomen van de progressie van atherosclerose en destabilisatie van de plaque is nodig om (terugkerende) cardiovasculaire events te voorkomen. Hiervoor is modulatie van het immuunsysteem een veelbelovende methode. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift kan bijdragen aan de ontwikkeling van een dergelijke therapie. In deel I is de ontwikkeling van volbloedassays en potentiële biomarkers beschreven die bij kunnen dragen aan toekomstig onderzoek naar immunomodulatoire medicijnen in klinische studies. In deel II zijn nieuwe strategieën voor immunomodulatoire therapieën beschikbaar voor de behandeling van atherosclerose, maar deze komen waarschijnlijk beschikbaar in de niet al te verre toekomst.

## REFERENTIES

- 1 Tsao, C.W., et al., Heart Disease and Stroke Statistics & #x2014; 2022 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 2022. 145(8): p. e153-e639.
- 2 Stary, H.C., Lipid and macrophage accumulations in arteries of children and the development of atherosclerosis. *Am J Clin Nutr*, 2000. 72(5 Suppl): p. 1297s-1306s.
- 3 Knoflach, M., et al., Cardiovascular Risk Factors and Atherosclerosis in Young Women. *Stroke*, 2009. 40(4): p. 1063-1069.
- 4 Peters, S.A.E., et al., Trends in Recurrent Coronary Heart Disease After Myocardial Infarction Among US Women and Men Between 2008 and 2017. *Circulation*, 2021. 143(7): p. 650-660.
- 5 Ley, K., Y.I. Miller, and C.C. Hedrick, Monocyte and Macrophage Dynamics During Atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2011. 31(7): p. 1506-1516.
- 6 Shashkin, P., B. Dragulev, and K. Ley, Macrophage Differentiation to Foam Cells. *Current Pharmaceutical Design*, 2005. 11(23): p. 3061-3072.
- 7 Rajamäki, K., et al., Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PLoS one*, 2010. 5(7): p. e11765-e11765.
- 8 DUEWELL, P., et al., NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*, 2010. 464(7293): p. 1357-61.
- 9 Döring, Y., et al., Neutrophils in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2015. 35(2): p. 288-295.
- 10 Stemme, S., et al., T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(9): p. 3893-7.
- 11 Paulsson, G., et al., Oligoclonal T cell expansions in atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. 20(1): p. 10-7.
- 12 Shaw, P.X., et al., Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity. *J Clin Invest*, 2000. 105(12): p. 1731-40.
- 13 Litvack, M.L., M. Post, and N. Palaniyar, IgM promotes the clearance of small particles and apoptotic microparticles by macrophages. *PLoS one*, 2011. 6(3): p. e17223-e17223.
- 14 Grönwall, C., J. Vas, and G.J. Silverman, Protective Roles of Natural IgM Antibodies. *Frontiers in Immunology*, 2012. 3: p. 66-66.
- 15 Oksjoki, R., et al., OxLDL-IgG immune complexes induce survival of human monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. 26(3): p. 576-83.
- 16 Ridker, P.M., et al., Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med*, 2017. 377(12): p. 1119-1131.
- 17 Nidorf, S.M., et al., Low-dose colchicine for secondary prevention of cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*, 2013. 61(4): p. 404-410.
- 18 Pertiwi, K.R., et al., Neutrophil Extracellular Traps Participate in All Different Types of Thrombotic and Haemorrhagic Complications of Coronary Atherosclerosis. *Thromb Haemost*, 2018. 118(06): p. 1078-1087.
- 19 Franck, G., et al., Flow Perturbation Mediates Neutrophil Recruitment and Potentiates Endothelial Injury via TLR2 in Mice: Implications for Superficial Erosion. *Circulation research*, 2017. 121(1): p. 31-42.
- 20 Quillard, T., et al., TLR2 and neutrophils potentiate endothelial stress, apoptosis and detachment: implications for superficial erosion. *European Heart Journal*, 2015. 36(22): p. 1394-1404.
- 21 Binder, C.J., et al., Pneumococcal vaccination decreases atherosclerotic lesion formation: molecular mimicry between *Streptococcus pneumoniae* and oxidized LDL. *Nat Med*, 2003. 9(6): p. 736-43.
- 22 Hartman, O., et al., Hydroxychloroquine for the prevention of recurrent cardiovascular events in myocardial infarction patients: rationale and design of the OXI trial. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother*, 2017. 3(2): p. 92-97.
- 23 Foks, A.C., et al., Interruption of the OX40-OX40 ligand pathway in LDL receptor-deficient mice causes regression of atherosclerosis. *J Immunol*, 2013. 191(9): p. 4573-80.
- 24 Wanrooij, E.J.A.v., et al., Interruption of the Tnfrsf4/Tnfsf4 (OX40/OX40L) Pathway Attenuates Atherogenesis in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2007. 27(1): p. 204-210.
- 25 Cochain, C., et al., Programmed cell death-1 deficiency exacerbates T cell activation and atherogenesis despite expansion of regulatory T cells in atherosclerosis-prone mice. *PLoS One*, 2014. 9(4): p. e93280.
- 26 Bu, D.-x., et al., Impairment of the programmed cell death-1 pathway increases atherosclerotic lesion development and inflammation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2011. 31(5): p. 1100-1107.
- 27 Gotsman, I., et al., Proatherogenic immune responses are regulated by the PD-1/PD-L pathway in mice. *J Clin Invest*, 2007. 117(10): p. 2974-82.
- 28 Nidorf, S.M., et al., Colchicine in Patients with Chronic Coronary Disease. *New England Journal of Medicine*, 2020. 383(19): p. 1838-1847.
- 29 Ridker, P.M., et al., Relationship of C-reactive protein reduction to cardiovascular event reduction following treatment with canakinumab: a secondary analysis from the CANTOS randomised controlled trial. *Lancet*, 2018. 391(10118): p. 319-328.
- 30 Karvonen, J., et al., Immunoglobulin M type of autoantibodies to oxidized low-density lipoprotein has an inverse relation to carotid artery atherosclerosis. *Circulation*, 2003. 108(17): p. 2107-12.

- 31 Laczik, R., et al., Assessment of IgG antibodies to oxidized LDL in patients with acute coronary syndrome. *Lupus*, 2011. 20(7): p. 730-5.
- 32 Shoji, T., et al., Inverse relationship between circulating oxidized low density lipoprotein (oxLDL) and anti-oxLDL antibody levels in healthy subjects. *Atherosclerosis*, 2000. 148(1): p. 171-7.
- 33 Stüber, E. and W. Strober, The T cell-B cell interaction via OX40-OX40L is necessary for the T cell-dependent humoral immune response. *J Exp Med*, 1996. 183(3): p. 979-89.