



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Mast cells in advanced atherosclerosis: from human plaque stability to new therapeutic targets**

Hemme, E.

### **Citation**

Hemme, E. (2025, February 19). *Mast cells in advanced atherosclerosis: from human plaque stability to new therapeutic targets*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4195812>

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/1887/4195812>

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

# Appendix

Nederlandse samenvatting

## **Nederlandse samenvatting**

Hart- en vaatziekten zijn wereldwijd verantwoordelijk voor hoge sterftecijfers en vormen daarmee een grote uitdaging voor de volksgezondheid<sup>1</sup>. De onderliggende pathologie van de meeste hart- en vaatziekten is slagaderverkalking, ofwel atherosclerose. Atherosclerose wordt gekenmerkt door de geleidelijke opbouw van plaques in middelgrote tot grote slagaders<sup>2,3</sup>. Deze plaques bestaan uit vetten, immuuncellen en vezelachtige elementen zoals collageen. Het ontstaan van plaques verloopt vaak zonder duidelijke klachten, totdat de slagader aanzienlijk vernauwd is, wat kan resulteren in klinische symptomen zoals pijn op de borst. In een vergevorderd stadium kunnen de plaques instabiel worden en scheuren, wat acute en ernstige complicaties veroorzaakt, zoals de vorming van een bloedprop, ook wel trombus genoemd. Een trombus kan de slagader gedeeltelijk of volledig blokkeren, wat ernstige, mogelijk fatale aandoeningen tot gevolg kan hebben, zoals een beroerte of een hartaanval<sup>4</sup>.

De huidige medicatie om dit te voorkomen is vooral gericht op het verlagen van het cholesterolgehalte in het bloed, bijvoorbeeld middels het gebruik van statines<sup>5</sup>. Hoewel deze aanpak effectief is in het verminderen van het risico op hart- en vaatziekten, laten de hoge sterftecijfers zien dat de huidige behandelingen voor een groot deel van de mensen met een hoog risico op hart- en vaatziekten niet voldoende zijn. Daarom is er een grote behoefte aan nieuwe therapeutische strategieën die ingrijpen in de ontwikkeling van atherosclerose.

## **Ontwikkeling van atherosclerose**

Een gezonde slagaderwand bestaat uit drie lagen, waarbij de binnenste laag, de intima, fungeert als een beschermende barrière van endotheelcellen om te voorkomen dat ongewenste stoffen uit het bloed de omliggende weefsels bereiken<sup>6</sup>. In de loop der jaren kan deze endotheelbarrière beschadigd raken door een verstoorde bloedstroom of risicofactoren zoals roken, hoog cholesterol en diabetes<sup>7</sup>. Deze beschadigingen maken de endotheellaag doorlaatbaar, waardoor stoffen zoals lage-dichtheidslipoproteïne (LDL)-cholesterol, ook wel "slecht" cholesterol genoemd, vanuit het bloed de vaatwand kunnen binnendringen. In de slagaderwand ondergaat LDL-cholesterol een oxidatieproces, waardoor geoxideerd LDL (oxLDL) ontstaat<sup>8</sup>. De ophoping van oxLDL in de intima activeert ontstekingsreacties, waarbij endotheelcellen chemische signaalstoffen produceren en uitscheiden in de omgeving. Hierdoor worden circulerende immuuncellen van het aangeboren immuunsysteem, zoals monocytën, aangetrokken naar de plaats van ontsteking. Deze monocytën hechten stevig aan adhesiemoleculen op endotheelcellen en migreren vervolgens in de vaatwand. Hier differentiëren de monocytën tot macrofagen, die gespecialiseerd zijn in het opruimen van oxLDL-deeltjes, een proces genaamd fagocytose. Door overmatige opname van oxLDL transformeren de macrofagen in zogenoemde schuimcellen. Ophoping van deze schuimcellen in de intima leidt tot de eerste opbouw van een atherosclerotische plaque, bekend als een "fatty streak"<sup>9</sup>. Naarmate de plaque groeit, worden ook immuuncellen van het verworven

immuunsysteem, zoals T-cellen, aangetrokken naar de plaque. Deze T-cellen worden geactiveerd door interacties met antigeenpresenterende cellen (APC's), zoals macrofagen en dendritische cellen, wat leidt tot de productie van pro-inflammatoire cytokinen zoals interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ). Deze cytokinen stimuleren de instroom van andere immuuncellen in de plaque, waaronder neutrofielen, B-cellen en mestcellen. Dit zorgt voor een chronische ontstekingsreactie, wat de groei van de plaque versnelt<sup>3</sup>. De overgang van fatty streaks naar gevorderde plaques gaat ook gepaard met de migratie van vasculaire gladde spiercellen (VSMCs) vanuit de media-laag (de middelste laag van de vaatwand) naar de intima. In de intima dragen VSMCs bij aan de structuur en stabiliteit van de plaque door de productie van extracellulaire matrixcomponenten, zoals collageen en elastine. Deze componenten vormen een fibreuze kap over de vet- en immuuncel rijke kern van de plaque om het risico op scheuren te beperken<sup>10</sup>.

In een gevorderd stadium van plaqueontwikkeling kunnen VSMCs, net als macrofagen, oxLDL opnemen. Door de overmatige opname van oxLDL ontstaat lipotoxiciteit, wat leidt tot geprogrammeerde celdood, ook wel apoptose genoemd. Normaal gesproken worden deze dode cellen opgeruimd door fagocyten. In gevorderde plaques verloopt dit opruimproces echter inefficiënt, wat leidt tot secundaire necrose, waarbij de volledige celinhoud in de omgeving vrijkomt. Dit resulteert in de vorming van een vetrijke necrotische kern in de plaque<sup>11,12</sup>. Naast vorming van de necrotische kern spelen VSMCs en macrofagen ook een rol bij verkalking van de plaque door pro-inflammatoire cytokinen en verkalkende blaasjes af te geven. Dit leidt aanvankelijk tot kleine verkalkingen (microverkalkingen), die de plaque instabiel maken. In een later stadium kunnen deze microverkalkingen uitgroeien tot grotere kalkafzettingen (macroverkalkingen), die bijdragen aan de stabilisatie van de plaque<sup>13</sup>. In gevorderde plaques wordt ook de vorming van nieuwe bloedvaten (neovascularisatie) waargenomen, een proces dat door het zuurstoftekort en de ontsteking in de plaque wordt geïnitieerd. Deze nieuwgevormde maar kwetsbare bloedvaten zijn vatbaar voor lekkage en kunnen scheuren, wat tot bloedingen (intraplaque hemorrhagie; IPH) in de plaque leidt. Neovascularisatie bevordert daarnaast de instroom van circulerende immuuncellen, wat de ontstekingsreactie in de plaque versterkt en de instabiliteit verder vergroot<sup>14</sup>.

De instabiliteit van gevorderde plaques neemt ook toe door het dunner worden van de fibreuze kap. Lokale immuuncellen, zoals macrofagen en mestcellen, produceren enzymen die de extracellulaire matrixcomponenten afbreken, waardoor de integriteit van de kap verzwakt en het risico op scheuren toeneemt<sup>15</sup>. Na het scheuren komt de inhoud van de plaque in contact met het bloed, wat trombusvorming kan veroorzaken en in ernstige gevallen tot volledige afsluiting van de slagader leidt. Naast het scheuren kan ook oppervlakkige erosie van de plaque trombusvorming veroorzaken. Dit komt vooral voor bij plaques met een dikke laag gladde spiercellen en extracellulaire matrix, maar weinig vetten en schuimcellen<sup>16</sup>. Zowel

plaqueruptuur als erosie kunnen ernstige klinische complicaties veroorzaken, zoals een beroerte of hartinfarct.

In de afgelopen decennia is het belang van het immuunsysteem naar voren gekomen als een cruciale factor in de ontwikkeling van atherosclerose. Recente (pre)klinische studies, zoals de bekende CANTOS-studie, hebben aangetoond dat het aangrijpen op het immuunsysteem een veelbelovende strategie is om het cardiovasculaire risico te verminderen<sup>17-20</sup>. Echter, de algehele onderdrukking van het immuunsysteem door een immunomodulerende behandeling ging gepaard met een verhoogd risico op ernstige of zelfs dodelijke infecties<sup>20</sup>. Daarom is aanvullend onderzoek nodig om immunomodulerende therapieën voor atherosclerose verder te verbeteren met minder bijwerkingen. Veel typen immuuncellen van het aangeboren en verworven immuunsysteem zijn betrokken bij de ontwikkeling van atherosclerose. Mestcellen, onderdeel van het aangeboren immuunsysteem, spelen een belangrijke rol in de verdediging tegen ziekteverwekkers, maar zijn ook bekend om hun betrokkenheid bij allergische reacties. Ze bevatten granules gevuld met pro-inflammatoire stoffen zoals histamine en proteasen, die bij activatie vrijkomen. Mestcellen zijn aanwezig in verschillende weefsels, waaronder de huid en de longen, maar komen ook in lage aantallen voor in gezond arterieel weefsel. Mestcellen zijn beschreven als belangrijke mediators van plaqueprogressie en -destabilisatie door het uitscheiden van pro-atherogene mediators. In experimentele atherosclerosemodellen leidde overmatige activatie van mestcellen bij muizen tot grotere plaques en een hogere incidentie van bloedingen in de plaque<sup>21,22</sup>. In humane atherosclerotische plaques neemt het aantal mestcellen toe naarmate de plaque vordert, en deze intraplaque mestcellen worden positief geassocieerd met kenmerken van plaque instabiliteit<sup>23</sup>. Een beter begrip van de door mestcellen geïnduceerde mechanismen in atherosclerose is echter noodzakelijk om nieuwe potentiële therapeutische doelwitten te identificeren, die de progressie en destabilisatie van atherosclerotische plaques kunnen beperken.

### **Dit proefschrift**

In dit proefschrift hebben we nieuwe inzichten verkregen in de rol van mestcellen bij de ontwikkeling en destabilisatie van gevorderde humane atherosclerotische plaques, met als uiteindelijke doel nieuwe immunomodulerende strategieën te identificeren om deze processen te remmen.

De rol van mestcellen in humane atherosclerotische plaques is de afgelopen decennia uitgebreid onderzocht, met bewijs dat wijst op hun actieve bijdrage aan de destabilisatie van plaques en hun associatie met cardiovasculaire manifestaties<sup>23-25</sup>. Tot nu toe zijn al deze studies uitgevoerd met behulp van een histologische tryptasekleuring om mestcellen in de plaque te identificeren. Hoewel deze methode waardevolle inzichten biedt in de lokalisatie van mestcellen binnen plaques, is deze beperkt doordat slechts één marker wordt gebruikt om mestcellen en hun activatiestatus vast te stellen. Recent is een nieuwe flowcytometrie-

gebaseerde methode ontwikkeld, waarbij meerdere mestcelspecifieke markers, zoals CD117 en FcεRI, gebruikt worden om de mestcelpopulatie in humane plaques gedetailleerder te identificeren<sup>26</sup>. In **hoofdstuk 2** hebben we deze op flowcytometrie-gebaseerde methode toegepast om mestcellen in humane halsslagaderplaques te karakteriseren en hun activatiestatus te beoordelen. Daarnaast hebben we deze bevindingen gecorreleerd aan metingen van plaquestabiliteit.

In onze studie werden halsslagaderplaques geanalyseerd van 85 patiënten, waarbij de plaque operatief verwijderd was, ook wel endarterectomie genoemd. Vergelijkbaar met andere onderzoeken vonden we dat mestcellen ongeveer één procent van alle immuuncellen in de plaque uitmaken, bepaald op basis van de expressie van de markers CD117 en FcεRI<sup>26</sup>. Het merendeel van deze mestcellen was geactiveerd, gemeten middels de expressie van CD63, een marker voor degranulatie. In tegenstelling tot eerdere histologische studies vonden wij geen significante verbanden tussen geactiveerde mestcellen en de algehele plaquestabiliteitscore of individuele parameters van plaquestabiliteit, zoals neovascularisatie, intraplaque hemorragie of de necrotische kern<sup>23,24,27</sup>. Dit verschil kan mogelijk verklaard worden door de verschillende methoden die zijn gebruikt om mestcellen in plaques te identificeren. In onze studie werd flowcytometrie gebruikt om het volledige plaqueweefsel te analyseren, terwijl eerdere studies met histologische methoden zich voornamelijk richtten op het meest kwetsbare deel van de plaque, ook wel het culprit-segment genoemd. Dit kan hebben geleid tot een verdunningseffect in de mestcelaantallen, aangezien eerder onderzoek significante variaties liet zien in mestcelaantallen tussen verschillende plaque-segmenten, met sterkere associaties in het culprit-segment vergeleken met aangrenzende segmenten<sup>28</sup>. In onze studie identificeerden we wel een positieve associatie tussen IgE-gebonden geactiveerde mestcellen en neovascularisatie binnen de plaque. Eerdere studies suggereerden eveneens een verband tussen mestcelactivatie en neovascularisatie<sup>27</sup>. Omdat deze correlatiestudies echter geen oorzakelijk verband kunnen aantonen, blijft onduidelijk of geactiveerde mestcellen daadwerkelijk de vorming van nieuwe bloedvaten in de plaque bevorderen of dat de nieuwgevormde bloedvaten juist mestcellen aantrekken die ophopen in de plaque. Beide mechanismen zouden kunnen optreden, aangezien mestcellen neovascularisatie stimuleren door het vrijmaken van angiogene factoren, zoals VEGF en bFGF<sup>25,29</sup>. Daarnaast verhoogt de afgifte van stoffen zoals histamine, chymase en tryptase door mestcellen de permeabiliteit van nieuwgevormde bloedvaten en veroorzaakt dit endotheeldisfunctie. Deze verhoogde permeabiliteit kan leiden tot infiltratie van immuuncellen in de plaque en bijdragen aan intraplaque hemorragie.

Voorgaand klinisch onderzoek rapporteerde dat hogere IgE-concentraties in het plasma geassocieerd zijn met een verhoogde incidentie van hart- en vaatziekten<sup>30,31</sup>. Andere studies, waaronder onze studie, konden echter geen verband aantonen tussen totale IgE-niveaus in het plasma en zowel plaque-destabilisatie als intraplaque mestcelactivatie<sup>32</sup>. Onze

flowcytometrie-gebaseerde methode stelde ons in staat IgE-gebonden geactiveerde mestcellen binnen de plaque te identificeren en te onderzoeken of deze mestcellen verband hielden met de totale IgE-niveaus in het plasma. In ons cohort weerspiegelden de totale plasma IgE-niveaus echter niet het aantal IgE-positieve geactiveerde mestcellen in de plaque. Wel zagen we geslachtsspecifieke verschillen, met een positieve associatie bij vrouwen en een onverwachte negatieve associatie bij mannen. Een belangrijk detail is dat in deze studie de totale plasma-IgE-niveaus werden gemeten, terwijl IgE-antilichamen doorgaans worden aangemaakt als reactie op specifieke lichaamsvreemde antigenen<sup>33</sup>. Het antigeen dat IgE-responsen bij atherosclerose uitlokt, is echter nog onbekend. Toekomstig onderzoek naar de identificatie van deze specifieke antigenen zou het IgE-afhankelijke mechanisme van mestcelactivatie in de plaque kunnen verduidelijken en inzicht kunnen bieden in de geslachtsgerelateerde verschillen.

Samenvattend toont **hoofdstuk 2** aan dat flowcytometrie een uitgebreidere methode biedt voor het identificeren van mestcellen en hun activatiestatus in atherosclerotische plaques vergeleken met de conventionele tryptase-gebaseerde histologische analyse, die met name inzicht geeft in de ruimtelijke lokalisatie van mestcellen. Verdere fundamentele studies en grootschaliger klinische onderzoeken zijn nodig om de mechanismen en oorzakelijke verbanden van (IgE-afhankelijke) mestcelactivatie en neovascularisatie beter te begrijpen, wat mogelijk kan bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën om deze processen te remmen.

Naast neovascularisatie en IPH is verkalking een belangrijk kenmerk van gevorderde atherosclerotische plaques. Tijdens de progressie van de plaque ontwikkelen zich zowel micro- als macroverkalkingen. Microverkalkingen worden geassocieerd met instabiliteit van de plaque, terwijl macroverkalkingen juist verband houden met verminderde ontsteking en verbeterde stabiliteit van de plaque<sup>34,35</sup>. De exacte moleculaire mechanismen en de interacties tussen immuuncellen en VSMCs, die het verkalkingsproces reguleren, zijn echter nog niet volledig bekend. Hoewel we in **hoofdstuk 2** geen significante correlatie vonden tussen mestcelactivatie en plaqueverkalking, wees een recente studie met een grote biobank van humane halsslagaderplaques wel op een specifiek verband tussen deze factoren<sup>35</sup>. In **hoofdstuk 3** gebruikten wij dezelfde patiëntbiobank data om het verband tussen mestcellen en plaqueverkalking te bestuderen. Aangezien gevorderde, verkalkte plaques voornamelijk worden gedomineerd door VSMCs, richtte deze studie zich op de onderliggende interacties tussen mestcellen en VSMCs binnen het verkalkingsproces.

In deze studie werd met een preoperatieve CT-scan van de bloedvaten (CT-angiografie) de mate van verkalking, vetrijke necrotische kern en IPH in halsslagaderplaques gemeten. In tegenstelling tot de flowcytometrie-gebaseerde methode die in **hoofdstuk 2** werd toegepast, gebruikten we in **hoofdstuk 3** de CIBERSORT-software, een bioinformatica analyse

(deconvolutie), om immuuncellen in plaques te identificeren. Onze analyse toonde een significante aanwezigheid van geactiveerde mestcellen in laag-verkalkte plaques met een grote necrotische kern, vooral bij symptomatische patiënten, terwijl hoog-verkalkte plaques relatief meer rustende mestcellen bevatten. Correlatieanalyses lieten zien dat mestcelactivatie negatief geassocieerd was met macroverkalking van de plaque en, consistent met eerdere studies, positief geassocieerd was met andere kenmerken van plaque instabiliteit, zoals IPH<sup>23</sup>. Eerdere histologische studies van humane plaques ondersteunen de mogelijke rol van mestcellen bij plaqueverkalking, aangezien geactiveerde mestcellen vaak aanwezig zijn in gescheurde plaques, met name in de verkalkte, scheurgevoelige gebieden<sup>36</sup>. Een klinisch relevante bevinding van onze studie is dat veelgebruikte cardiovasculaire medicatie, zoals cholesterol- en bloeddrukverlagende middelen, geen invloed heeft op de aanwezigheid en activatiestatus van mestcellen in de plaques.

De functionele rol van mestcellen in VSMC-gemedieerde verkalking werd mechanistisch onderzocht met behulp van *ex vivo* plaqueweefsel uit de biobank en *in vitro* celkweek. Onze *in vitro* data bevestigden de bevindingen uit de bioinformatica-analyse: mestcelactivatie en cytokine-afgifte werden geremd wanneer mestcellen werden gekweekt in supernatanten van verkalkt plaqueweefsel en VSMCs die onder verkalkte omstandigheden waren gekweekt. Hoewel onze bioinformatica analyse geen significante correlatie liet zien tussen mestcelactivatie en de necrotische kern, bleek *in vitro* dat mestcelactivatie toenam bij blootstelling aan supernatanten van laag-verkalkte plaques met een grote necrotische kern. Het omgekeerde effect van rustende en geactiveerde mestcel supernatanten op gekweekte VSMCs toonde aan dat zowel rustende als geactiveerde mestcellen het verkalkingsproces induceren. Onder calcificatiecondities zorgden deze supernatanten bovendien voor een transdifferentiatie van VSMCs naar een bot- en kraakbeenachtig (osteocondrogeen) fenotype, zichtbaar door de upregulatie van osteocondrogene markers zoals SOX9, SMAD3 en BMP2. Deze transdifferentiatie van VSMCs wordt mogelijk veroorzaakt door verschillende mestcelmediatoren zoals TGF $\beta$ , TNF en IL-6. De modulerende effecten van deze mediators zijn eerder onderzocht bij botvorming, en onze resultaten suggereren dat sommige van deze mechanismen toepasbaar zijn op de atherosclerotische plaque<sup>37</sup>. Op basis van deze bevindingen stellen wij voor dat de VSMCs in gevorderde verkalkte plaques een feedbackmechanisme hebben dat mestcelactivatie in verkalkte plaques onderdrukt. Dit mechanisme lijkt op te wegen tegen de effecten van mestcellen op VSMC-verkalking, een proces dat waarschijnlijk eerder plaatsvindt tijdens de progressie van plaques. Toekomstig onderzoek met humane mestcellen *in vitro* kan gedetailleerder inzicht geven in de rol van mestcellen bij de transitie van VSMCs en het verkalkingsproces. De bevindingen in **hoofdstuk 3** benadrukken nieuwe mogelijkheden voor therapieën die zich richten op de interactie tussen mestcellen en VSMCs, met als doel de destabilisatie van atherosclerotische plaques te verminderen.

In het tweede deel van dit proefschrift werden nieuwe potentiële immunomodulerende therapieën onderzocht in een muismodel van atherosclerose. Hoewel mestcellen slechts een kleine celpopulatie vormen in de plaque, dragen ze actief bij aan de progressie en destabilisatie van de plaque, waardoor ze een veelbelovend therapeutisch doelwit zijn. Mestcellen beïnvloeden de plaque door het uitscheiden van pro-inflammatoire en proteolytische mediators via specifieke activatieroutes. Het remmen van mestcelactivatie en de afgifte van deze mediators kan daarom een veelbelovende strategie zijn om het risico op acute cardiovasculaire manifestaties te verminderen. In **hoofdstuk 2** toonden we aan dat de meeste mestcellen in de plaque geactiveerd zijn en dat de IgE-FcεR interactie waarschijnlijk de primaire activatieroute vormt. In **hoofdstuk 4** onderzochten we deze IgE-gemedieerde activatieroute verder in zowel vroege als gevorderde stadia van experimentele atherosclerose. Hierbij onderzochten we de therapeutische potentie van Bruton's Tyrosine Kinase (BTK), een cytoplasmatische tyrosine kinase die betrokken is bij FcεR-afhankelijke signalering.

In onze single-cell RNA sequencing-data van gevorderde humane halsslagaderplaques en plaques van muizen hebben we vastgesteld dat BTK tot expressie komt op intraplaque mestcellen, B-cellen en myeloïde cellen<sup>38</sup>. Voorgaande experimentele studies lieten zien dat verschillende BTK-remmers de IgE-gemedieerde activatie van humane mestcellen kunnen remmen<sup>39</sup>. In onze studie bevestigden we dat de tweede generatie BTK-remmer Acalabrutinib *in vitro* effectief de IgE-FcεR-gemedieerde activatie van muizenmestcellen (BMMC's) remt op een dosisafhankelijke wijze. Vervolgens onderzochten we de effecten van BTK-remming bij vroege en gevorderde atherosclerose in een experimenteel muismodel (*Ldlr*<sup>-/-</sup> muizen), door deze muizen te behandelen met Acalabrutinib. Ondanks de veelbelovende effecten op mestcelactivatie *in vitro*, onderdrukte Acalabrutinib de mestcelactivatie *in vivo* niet. Na behandeling met Acalabrutinib bleven mestcellen in de buitenste laag (adventitia) van de aorta grotendeels geactiveerd, wat suggereert dat de concentratie Acalabrutinib in de plaqueomgeving onvoldoende is om mestcelactivatie effectief te remmen. Een andere mogelijkheid is dat niet-IgE-afhankelijke activatieroutes, zoals via toll-like receptoren of complement componenten, de mestcelactivatie in stand houden<sup>26</sup>. Naast de rol in FcεR-afhankelijke signalering, is BTK ook essentieel voor de ontwikkeling en signalering van B-cellen. B-cellen bestaan uit verschillende subsets die atherosclerose beïnvloeden door de productie van antilichamen, de afgifte van cytokinen en de regulatie van T-cellen. In deze studie toonden we aan dat BTK-remming vooral effect had op de atherogene folliculaire (FO) B-celsubsets: de behandeling leidde tot een verschuiving van gematureerde/geactiveerde FO I B-cellen naar minder gematureerde FO II B-cellen. Aangezien FO B-cellen differentiëren in antilichaamproducerende plasmacellen, onderzochten we het effect van Acalabrutinib op de humorale immuunrespons door de antilichaamtiteren in het plasma te meten. Bij vroege atherosclerose veranderden de antilichaamtiteren niet, terwijl in gevorderde atherosclerose de totale IgG-titers daalden. Ondanks de invloed van Acalabrutinib op de rijping van FO B-cellen, had de behandeling geen effect op de grootte en samenstelling van de plaques, zowel in vroege als

gevorderde stadia van atherosclerose. Deze resultaten suggereren dat behandeling met alleen Acalabrutinib onvoldoende is om atherosclerose te remmen. Dit kan mogelijk worden verklaard door de verschillende pathogene mechanismen en celtypen die bij atherosclerose betrokken zijn, die verschillen van andere ziekten, zoals B-cel maligniteiten, waarbij Acalabrutinib wel effectief bleek<sup>40</sup>. Toekomstig onderzoek zou kunnen focussen op andere BTK-remmers met een verschillend werkingsmechanisme of op combinatietherapieën die gericht zijn op specifieke therapeutische doelwitten binnen BTK-signalering.

Na activatie scheiden mestcellen, net als andere immuuncellen, grote hoeveelheden cytokinen uit in hun omgeving. Veel van deze cytokinen, zoals TNF $\alpha$  en IL-6, zijn uitgebreid bestudeerd in de context van atherosclerose en worden over het algemeen geassocieerd met ziekteprogressie. De rol van vele andere cytokinen in de ontwikkeling van atherosclerose is echter nog niet volledig vastgesteld. De toepassing van single-cell transcriptomics op atherosclerotische plaques maakt het mogelijk om nieuwe, mogelijk celspecifieke therapeutische doelwitten te identificeren. In **hoofdstuk 5** analyseerden we single-cell RNA-sequencing-data van atherosclerotische plaques van mensen en muizen en ontdekten we dat humane intraplaque mestcellen specifiek en in hoge mate het gen *LIF* tot expressie brengen, dat codeert voor het eiwit Leukemia Inhibitory Factor (LIF). LIF signaleert via de LIF-receptor, die vooral tot expressie kwam in geactiveerde endotheelcellen binnen atherosclerotische plaques bij zowel mensen als muizen. Bovendien detecteerden we LIF-concentraties in het serum van hart- en vaatpatiënten, ondanks de relatief korte halfwaardetijd van LIF in de circulatie<sup>41</sup>.

**Hoofdstuk 5** richtte zich verder op het verkrijgen van inzicht in de rol van LIFR-signalering in de ontwikkeling van atherosclerose door LIFR systemisch te blokkeren in *Ldlr*<sup>-/-</sup> muizen. Behandeling met de LIFR-antagonist EC359 gedurende acht weken verminderde de mate van vernauwing in de aorta, ook wel vasculaire stenose, zonder de samenstelling van de plaque te beïnvloeden. Dit wijst op een mogelijke pro-atherogene rol van LIF/LIFR-signalering. De afname in vasculaire stenose leek gedeeltelijk gerelateerd aan verlaagde cholesterolwaarden in het plasma van EC359-behandelde muizen. Er werden geen effecten waargenomen op de synthese en het vervoer van cholesterol in de lever, het belangrijkste orgaan voor cholesterolmetabolisme. Het galzuurmetabolisme in de lever was echter wel beïnvloed door EC359 behandeling, waarbij een verhoogde expressie van *Abcb11* werd gemeten. Dit gen is betrokken bij het transport van galzuren vanuit de lever naar de darm<sup>42</sup>. Op basis van deze bevindingen veronderstellen wij dat EC359 de uitscheiding van galzuren via ontlasting stimuleert, maar verder onderzoek is nodig om dit te bevestigen. Naast de effecten op cholesterol bleek LIFR-remming ook de expressie van het adhesiemolecuul VCAM1 te verminderen, zowel in aortaweefsel *in vivo* als in gekweekte humane endotheelcellen (HUVECs) *in vitro*. Deze verminderde VCAM1-expressie duidt op een afgenomen endotheelactivatie, wat mogelijk resulteerde in een lagere infiltratie van immuuncellen in de

plaque en daarmee bijdroeg aan een vermindering van vasculaire stenose. Ondanks de afname in het aantal immuuncellen binnen de plaque, observeerden we een significante toename in de proporties van circulerende en intraplaque neutrofielen. Hoewel het exacte mechanisme achter deze bevinding onduidelijk blijft, lijken de beschermende effecten van EC359-behandeling het mogelijke pro-atherogene effect van verhoogde neutrofielenniveaus te compenseren, die na toename nog steeds een relatief klein deel van de celpopulatie in de plaque uitmaken. Samenvattend benadrukt **hoofdstuk 5** de potentie van LIFR als therapeutisch doelwit in atherosclerose, maar vervolgonderzoek is noodzakelijk om de onderliggende mechanismen verder te verduidelijken. Daarnaast zou het testen van LIFR-remming in muizen met reeds opgebouwde plaques een meer klinisch relevante benadering zijn, wat kan bijdragen aan een beter begrip van de therapeutische werkzaamheid bij gevorderde atherosclerose.

### Toekomstperspectieven

In de afgelopen decennia is ontsteking steeds meer erkend als een cruciale factor in de ontwikkeling van atherosclerose, en immunomodulatie is naar voren gekomen als een veelbelovende therapeutische strategie. Verschillende klinische onderzoeken hebben al aangetoond dat het richten op componenten van het immuunsysteem kan helpen om ontsteking te verminderen en de stabiliteit van plaques te verbeteren bij hart- en vaatpatiënten. Niet alle immunomodulerende therapieën hebben echter geleid tot verbeterde cardiovasculaire uitkomsten; sommige gingen bijvoorbeeld gepaard met ernstige immuunsysteem onderdrukkende bijwerkingen. Deze uitdagingen benadrukken de noodzaak om deze therapeutische strategieën verder te optimaliseren. Toekomstig onderzoek moet zich richten op de specificiteit van immunomodulerende therapieën, met name door te focussen op plaque-specifieke doelwitten binnen immuuncelpopulaties en daarbij bijwerkingen tot een minimum te beperken. In dit proefschrift hebben we de therapeutische potentie van mestcellen in atherosclerose verder onderzocht en verschillende veelbelovende interventieroutes geïdentificeerd.

Neovascularisatie en IPH zijn belangrijke kenmerken van kwetsbare, gevorderde atherosclerotische plaques en worden geassocieerd met een verhoogd risico op cardiovasculaire manifestaties<sup>43</sup>. Klinische en experimentele studies hebben eerder een verband aangetoond tussen mestcellen en het optreden van neovascularisatie en IPH bij atherosclerose<sup>23,44</sup>. In **hoofdstuk 2** leverden we aanvullend bewijs voor de mogelijke rol van mestcellen in als drijvende krachten van intraplaque neovascularisatie. Op basis van deze bevindingen veronderstellen wij dat mestcellen een veelbelovend doelwit vormen om neovascularisatie te beperken en IPH te voorkomen, wat mogelijk de incidentie van cardiovasculaire manifestaties en de ziektelast kan verlagen. De precieze mechanismen waardoor mestcellen bijdragen aan neovascularisatie en IPH, evenals de therapeutische

aanknopingspunten binnen deze processen, zijn echter nog onduidelijk en vereisen verder onderzoek.

Mestcellen vertonen, net als andere immuuncellen, een aanzienlijke fenotypische en functionele plasticiteit, die sterk afhankelijk is van de omgeving waarin ze zich bevinden. Analyse van mastceltranscriptomen uit verschillende weefsels heeft de grote heterogeniteit van deze immuuncelpopulatie bij zowel muizen als mensen bevestigd<sup>45</sup>. Het karakteriseren van het atherosclerose-specifieke mestcelfenotype kan leiden tot de identificatie van potentiële, plaque-specifieke therapeutische doelwitten. Recent gepubliceerde single-cell transcriptomische datasets van humane plaques bevatten een mestcelpopulatie binnen de plaque, waardoor een gedetailleerde karakterisering van het intraplaque mestceltranscriptoom mogelijk wordt<sup>46,47</sup>. Door het mestceltranscriptoom in de plaque te vergelijken met dat van andere mestcel-bevattende weefsels, zoals longen, darmen of huid, kunnen mogelijk plaque-specifieke therapeutische doelwitten worden gevonden. Naast mestcellen bevatten deze datasets ook clusters van endotheelcellen, die verder gekarakteriseerd kunnen worden. Het in kaart brengen van ligand-receptor interacties en het voorspellen van intercellulaire communicatie binnen de atherosclerotische plaque, met een focus op mestcellen en endotheelcellen, kan nieuwe aangrijpingspunten opleveren om de door mestcellen veroorzaakte destabilisatie van de plaque te remmen. Daarnaast heeft ruimtelijke transcriptomics (spatial transcriptomics) analyse van colorectaal kankerweefsel aangetoond dat ruimtelijke transcriptomische analyse waardevolle informatie kan opleveren over de co-lokalisatie van mestcellen en endotheelcellen in weefsel, waarmee mogelijke cel-cel interacties in de plaque kunnen worden gevalideerd<sup>48</sup>. Onlangs is spatial transcriptomics ook toegepast op humane atherosclerotische plaques<sup>49</sup>. In de context van dit proefschrift zou het gebruik van spatial transcriptomics nuttig zijn om de interacties tussen mestcellen en endotheelcellen binnen de atherosclerotische plaque te onderzoeken, specifiek met betrekking tot neovascularisatie en intraplaque bloeding (IPH).

Daarnaast kunnen experimentele muismodellen worden ingezet om nieuw geïdentificeerde doelwitten in de ontwikkeling van atherosclerose te valideren. **Hoofdstuk 5** van dit proefschrift illustreert een perfect voorbeeld van een ligand-receptorinteractie in de plaque. De rol van deze specifieke interactie in relatie tot neovascularisatie en IPH vereist echter verder onderzoek. In tegenstelling tot mensen, vertonen veelgebruikte experimentele muismodellen voor atherosclerose, zoals *Ldlr*<sup>-/-</sup> en *ApoE*<sup>-/-</sup> muizen, geen spontane neovascularisatie en IPH, waardoor deze modellen minder geschikt zijn voor het bestuderen van deze belangrijke processen. Het unieke *ApoE*<sup>-/-</sup>*Fbn1*<sup>C1039+/-</sup> muismodel daarentegen vertoont kenmerken van gevorderde humane atherosclerotische plaques, zoals een vergrote necrotische kern, aanwezigheid van neovascularisatie, IPH en zelfs plaque-ruptuur bij een vetrijk dieet<sup>50</sup>. Het valideren van veelbelovende therapeutische doelwitten, zoals de LIF/LIFR-interactie, in dit

model kan waardevolle inzichten bieden in de rol van mestcel-geïnduceerde neovascularisatie en IPH. Daarnaast kan het gebruik van mestcel-stabiliserende middelen in dit model helpen om de causaliteit tussen mestcelactivatie en de ontwikkeling van neovascularisatie in de plaque vast te stellen.

Verkalking is een belangrijk kenmerk van gevorderde atherosclerotische plaques. **Hoofdstuk 3** biedt nieuwe perspectieven voor mestcel-gerelateerde therapieën om in te grijpen in VSMC-gemedieerde plaqueverkalking. We hebben de cellulaire interacties tussen mestcellen en VSMCs in de atherosclerotische plaque vastgesteld door aan te tonen dat zowel rustende als geactiveerde mestcellen verkalking van VSMCs kunnen induceren, waarschijnlijk in de vroege stadia van plaquevorming. In meer gevorderde plaques lijken VSMCs een feedbackmechanisme te ontwikkelen dat de activatie van mestcellen onderdrukt. Een vergelijkbare bioinformatische benadering, zoals hierboven beschreven, kan worden toegepast om specifieke doelwitten te identificeren die een rol spelen in de interactie tussen mestcellen en VSMCs in de plaque. Dit opent mogelijkheden voor nieuwe therapeutische strategieën die gericht zijn op het verbeteren van de plaquestabilisatie.

Mestcellen oefenen hun pro-atherogene functies hoofdzakelijk uit via het uitscheiden van pro-inflammatoire mediators na activatie en degranulatie. Het remmen van specifieke mestcel activatieroutes in de plaque biedt daarom een veelbelovende therapeutische strategie om de invloed van mestcelmediators op de ontwikkeling van atherosclerose te beperken. Gebaseerd op de bevindingen in **hoofdstuk 2** van dit proefschrift, vermoeden we dat de IgE-FcεR-afhankelijke route een aanzienlijke rol speelt in de activatie van mestcellen binnen de plaque, wat deze route tot een interessant doelwit voor therapeutische interventie maakt. Momenteel worden patiënten met ernstig allergisch astma en chronische urticaria al behandeld met Omalizumab, een monoklonaal antilichaam specifiek gericht op IgE<sup>51</sup>. In experimentele modellen van atherosclerose heeft het blokkeren van de IgE-FcεR-gemedieerde route met anti-IgE neutraliserende antilichamen veelbelovende resultaten laten zien in het remmen van mestcelactivatie en het vertragen van plaqueprogressie<sup>52</sup>. Dit suggereert dat Omalizumab een effectieve therapie kan zijn voor het verminderen van IgE-gemedieerde mestcelactivatie in de plaque bij patiënten met hart- en vaatziekten. Naast IgE-neutralisatie biedt het aangrijpen van intracellulaire componenten van de IgE-FcεR-gemedieerde route een alternatieve therapeutische benadering. In de afgelopen decennia is BTK naar voren gekomen als een potentieel therapeutisch doelwit in IgE-gerelateerde ziekten vanwege zijn essentiële rol in de regulering van FcεR-signalering. Verschillende BTK-remmers worden momenteel onderzocht in klinische studies of experimentele modellen voor de behandeling van astma, allergieën en urticaria, en hebben veelbelovende resultaten laten zien bij het verminderen van mestcelactivatie en het verlagen van de ziektelast<sup>53</sup>. **Hoofdstuk 4** heeft aangetoond dat het gebruik van Acalabrutinib, een BTK-remmer, in vroege en gevorderde experimentele atherosclerose echter niet geleid heeft tot een effectieve remming van mestcelactivatie of

plaqueprogressie, hoewel de rijping van FO B-cellen wel succesvol werd onderdrukt. Desalniettemin blijft BTK een interessant doelwit voor de behandeling van atherosclerose. Het testen van hogere doses Acalabrutinib of alternatieve BTK-remmers met verschillende werkingsmechanismen kan mogelijk grotere effecten hebben op zowel systemische als intraplaque mestcelactivatie. Bij patiënten met chronische lymfocyttaire leukemie (CLL) hebben combinatietherapieën met BTK-remmers en BCL2-remmers geleid tot verbeterde therapeutische effecten en duurzamere responsen<sup>54</sup>. Op een vergelijkbare manier zou in de context van atherosclerose het combineren van BTK-remmers met middelen die zich richten op andere specifieke routes de effectiviteit van de behandeling kunnen vergroten en de behandelresultaten kunnen verbeteren.

## Conclusie

Dit proefschrift biedt nieuwe inzichten in de rol van mestcellen in gevorderde atherosclerotische plaques en onthult mogelijkheden voor therapeutische interventies om plaquedestabilisatie door mestcellen tegen te gaan. Een gedetailleerde karakterisering van het mestceltranscriptoom en hun cellulaire interacties binnen de plaque kan leiden tot de identificatie van plaque-specifieke doelwitten. Dit opent de weg voor de ontwikkeling van op maat gemaakte immunomodulerende therapieën die de plaquestabiliteit verbeteren en de incidentie van hart- en vaatziekten kunnen verminderen.

## References

1. Organization, W. H. Fact sheet - Cardiovascular diseases (CVDs). [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
2. Libby, P. The changing landscape of atherosclerosis. *Nat.* 2021 5927855 **592**, 524–533 (2021).
3. Wolf, D. & Ley, K. Immunity and Inflammation in Atherosclerosis. *Circ. Res.* **124**, 315–327 (2019).
4. Bentzon, J. F., Otsuka, F., Virmani, R. & Falk, E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ. Res.* **114**, 1852–1866 (2014).
5. Gupta, K. K., Ali, S. & Sanghera, R. S. Pharmacological Options in Atherosclerosis: A Review of the Existing Evidence. *Cardiol. Ther.* **8**, 5–20 (2019).
6. Mannarino, E. & Pirro, M. Molecular biology of atherosclerosis. *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* **5**, 57 (2008).
7. Hadi, H. A. R., Carr, C. S. & Al Suwaidi, J. Endothelial Dysfunction: Cardiovascular Risk Factors, Therapy, and Outcome. *Vasc. Health Risk Manag.* **1**, 183 (2005).
8. Ference, B. A. *et al.* Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur. Heart J.* **38**, 2459–2472 (2017).
9. Usman, A., Ribatti, D., Sadat, U. & Gillard, J. H. From Lipid Retention to Immune-Mediate Inflammation and Associated Angiogenesis in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *J. Atheroscler. Thromb.* **22**, 739–749 (2015).
10. Grootaert, M. O. J. & Bennett, M. R. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis: time for a re-assessment. *Cardiovasc. Res.* **117**, 2326–2339 (2021).
11. Doran, A. C., Yurdagul, A. & Tabas, I. Efferocytosis in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 254–267 (2020).
12. Silvestre-Roig, C. *et al.* Atherosclerotic plaque destabilization: Mechanisms, models, and therapeutic strategies. *Circ. Res.* **114**, 214–226 (2014).
13. Barrett, H. E., Van der Heiden, K., Farrell, E., Gijzen, F. J. H. & Akyildiz, A. C. Calcifications in atherosclerotic plaques and impact on plaque biomechanics. *J. Biomech.* **87**, 1–12 (2019).

14. Ugusman, A. *et al.* Pharmacological interventions for intraplaque neovascularization in atherosclerosis. *Pharmacol. Ther.* **261**, 108685 (2024).
15. Watanabe, N. & Ikeda, U. Matrix metalloproteinases and atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* **6**, 112–120 (2004).
16. Quillard, T., Franck, G., Mawson, T., Folco, E. & Libby, P. Mechanisms of erosion of atherosclerotic plaques. *Curr. Opin. Lipidol.* **28**, 434–441 (2017).
17. Ridker, P. M. From RESCUE to ZEUS: will interleukin-6 inhibition with ziltivekimab prove effective for cardiovascular event reduction? *Cardiovasc. Res.* **117**, e138 (2021).
18. Zhao, T. *et al.* Low dose interleukin-2 in patients with stable ischaemic heart disease and acute coronary syndrome (LILACS). *Eur. Heart J.* **41**, (2020).
19. Sriranjani, R. *et al.* Low-dose interleukin 2 for the reduction of vascular inflammation in acute coronary syndromes (IVORY): protocol and study rationale for a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase II clinical trial. *BMJ Open* **12**, e062602 (2022).
20. Ridker, P. M. *et al.* Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N. Engl. J. Med.* **377**, 1119–1131 (2017).
21. Bot, I. *et al.* Perivascular mast cells promote atherogenesis and induce plaque destabilization in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* **115**, 2516–2525 (2007).
22. Lagraauw, H. M., Wezel, A., van der Velden, D., Kuiper, J. & Bot, I. Stress-induced mast cell activation contributes to atherosclerotic plaque destabilization. *Sci. Rep.* **9**, (2019).
23. Willems, S. *et al.* Mast cells in human carotid atherosclerotic plaques are associated with intraplaque microvessel density and the occurrence of future cardiovascular events. *Eur. Heart J.* **34**, 3699–3706 (2013).
24. Kupreishvili, K. *et al.* Mast cells are increased in the media of coronary lesions in patients with myocardial infarction and may favor atherosclerotic plaque instability. *J. Cardiol.* **69**, 548–554 (2017).
25. Lappalainen, H., Laine, P., Pentikäinen, M. O., Sajantila, A. & Kovanen, P. T. Mast cells in neovascularized human coronary plaques store and secrete basic fibroblast growth factor, a potent angiogenic mediator. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1880–1885 (2004).
26. Kritikou, E. *et al.* Flow Cytometry-Based Characterization of Mast Cells in Human Atherosclerosis. *Cells* **8**, (2019).
27. Kaartinen, M., Penttilä, A. & Kovanen, P. T. Mast cells accompany microvessels in human coronary atheromas: implications for intimal neovascularization and hemorrhage. *Atherosclerosis* **123**, 123–131 (1996).
28. Mekke, J. M. *et al.* Mast Cell Distribution in Human Carotid Atherosclerotic Plaque Differs Significantly by Histological Segment. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **62**, 808–815 (2021).
29. Kovanen, P. T. Mast Cells as Potential Accelerators of Human Atherosclerosis-From Early to Late Lesions. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
30. Erdogan, O., Gul, C., Altun, A. & Ozbay, G. Increased immunoglobulin E response in acute coronary syndromes. *Angiology* **54**, 73–79 (2003).
31. Guo, X. *et al.* Serum IgE levels are associated with coronary artery disease severity. *Atherosclerosis* **251**, 355–360 (2016).
32. Willems, S. *et al.* Circulating immunoglobulins are not associated with intraplaque mast cell number and other vulnerable plaque characteristics in patients with carotid artery stenosis. *PLoS One* **9**, (2014).
33. Taylor, J. A., Hutchinson, M. A., Gearhart, P. J. & Maul, R. W. Antibodies in action: the role of humoral immunity in the fight against atherosclerosis. *Immun. Ageing* **19**, (2022).
34. Kataoka, Y. *et al.* Spotty Calcification as a Marker of Accelerated Progression of Coronary Atherosclerosis: Insights From Serial Intravascular Ultrasound. *J. Am. Coll. Cardiol.* **59**, 1592–1597 (2012).
35. Karlöf, E. *et al.* Correlation of computed tomography with carotid plaque transcriptomes associates calcification with lesion-stabilization. *Atherosclerosis* **288**, 175–185 (2019).
36. Kaartinen, M., Penttilä, A. & Kovanen, P. T. Accumulation of activated mast cells in the shoulder region of human coronary atheroma, the predilection site of atheromatous rupture. *Circulation* **90**, 1669–1678 (1994).
37. Ragipoglu, D. *et al.* The Role of Mast Cells in Bone Metabolism and Bone Disorders. *Front. Immunol.* **11**, 163 (2020).
38. Zhu, S. *et al.* Multifaceted Immunomodulatory Effects of the BTK Inhibitors Ibrutinib and Acalabrutinib on Different Immune Cell Subsets – Beyond B Lymphocytes. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, 727531 (2021).
39. Dispenza, M. C. *et al.* Bruton's tyrosine kinase inhibition effectively protects against human IgE-mediated anaphylaxis. *J. Clin. Invest.* **130**, 4759–4770 (2020).

40. Byrd, J. C. *et al.* Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **369**, 32–42 (2013).
41. Hilton, D. J., Nicola, N. A., Waring, P. M. & Metcalf, D. Clearance and fate of leukemia-inhibitory factor (LIF) after injection into mice. *J. Cell. Physiol.* **148**, 430–439 (1991).
42. Mareux, E. *et al.* In Vitro Rescue of the Bile Acid Transport Function of ABCB11 Variants by CFTR Potentiators. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, (2022).
43. Kolodgie, F. D. *et al.* High-risk carotid plaque: lessons learned from histopathology. *Semin. Vasc. Surg.* **30**, 31–43 (2017).
44. Bot, I. *et al.* Local Mast Cell Activation Promotes Neovascularization. *Cells* **9**, (2020).
45. Tauber, M. *et al.* Landscape of mast cell populations across organs in mice and humans. *J. Exp. Med.* **220**, (2023).
46. Depuydt, M. A. C. *et al.* Microanatomy of the Human Atherosclerotic Plaque by Single-Cell Transcriptomics. *Circ. Res.* **127**, 1437–1455 (2020).
47. Bashore, A. C. *et al.* High-Dimensional Single-Cell Multimodal Landscape of Human Carotid Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **44**, 930–945 (2024).
48. Xie, Z. *et al.* Single-cell analysis unveils activation of mast cells in colorectal cancer microenvironment. *Cell Biosci.* **13**, 1–17 (2023).
49. Sun, J. *et al.* Spatial Transcriptional Mapping Reveals Site-Specific Pathways Underlying Human Atherosclerotic Plaque Rupture. *J. Am. Coll. Cardiol.* **81**, 2213–2227 (2023).
50. Van Der Donckt, C. *et al.* Elastin fragmentation in atherosclerotic mice leads to intraplaque neovascularization, plaque rupture, myocardial infarction, stroke, and sudden death. *Eur. Heart J.* **36**, 1049 (2015).
51. Kawakami, T. & Blank, U. From IgE to Omalizumab. *J. Immunol.* **197**, 4187–4192 (2016).
52. Tsiantoulas, D. *et al.* Increased Plasma IgE Accelerate Atherosclerosis in Secreted IgM Deficiency. *Circ. Res.* **120**, 78–84 (2017).
53. Rozkiewicz, D., Hermanowicz, J. M., Kwiatkowska, I., Krupa, A. & Pawlak, D. Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors (BTKIs): Review of Preclinical Studies and Evaluation of Clinical Trials. *Molecules* **28**, (2023).
54. Zhang, J., Lu, X., Li, J. & Miao, Y. Combining BTK inhibitors with BCL2 inhibitors for treating chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma. *Biomark. Res.* **10**, (2022).