



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Post-interventional vascular remodeling: novel insights and therapeutic strategies

Sluiter, T.J.

Citation

Sluiter, T. J. (2025, October 16). *Post-interventional vascular remodeling: novel insights and therapeutic strategies*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4273530>

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/1887/4273530>

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

APPENDICES

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Post-interventionele vasculaire remodeling is een delicaat proces dat een nauwkeurige balans vereist van zowel ontsteking als proliferatie. Enerzijds is de acute ontstekingsreactie, die wordt geïnduceerd door chirurgie, noodzakelijk om proliferatie van endotheelcellen te initiëren en zo de re-endothelialisatie van de beschadigde vaten te faciliteren. Deze snelle re-endothelialisatie voorkomt trombose en beperkt overmatige ontsteking zodra de endotheliale barrière is hersteld. Bovendien triggert de acute ontstekingsreactie na chirurgie de proliferatie van gladde spiercellen in de vaatwand. Dit is op zijn beurt nodig om de hemodynamische (flow-gerelateerde) en biomechanische (druk-gerelateerde) stress op de vaatwand te verlichten en adaptatie (uitwaartse remodeling) te initiëren. Anderzijds kan chronische ontsteking en overmatige proliferatie in de vaatwand resulteren in een overgang van adaptatie naar maladaptatie na de chirurgische ingreep, wat leidt tot inwaartse in plaats van uitwaartse remodeling. Deze ongecontroleerde ontstekings- en myofibroproliferatieve reactie zal leiden tot overmatige verdikking van de vaatwand, waarin nieuwe atherosclerotische plaques kunnen ontstaan. Dit leidt tot een vernauwing van het lumen, wat resulteert in verminderde bloedstroom en hernieuwde symptomen waarvoor patiënten aanvankelijk (endo)vasculaire interventies ondergingen.

De exacte moleculaire en cellulaire mechanismen aan de basis liggen die maladaptive post-interventionele vasculaire remodeling, zijn slechts gedeeltelijk begrepen en therapieën om deze nadelige reactie na chirurgie te verminderen zijn beperkt, wat leidt tot een groot aantal patiënten die na verloop van tijd wederom eenzelfde ingreep nodig hebben. Het **doel van dit proefschrift** was om de biologische processen die ten grondslag liggen aan post-interventionele vasculaire remodeling verder te ontrafelen en deze kennis te gebruiken om nieuwe therapeutische strategieën te ontwerpen om gunstige vasculaire remodeling na chirurgie te bevorderen.

In dit proefschrift hebben we ons gericht op de rol van het endotheel en de interactie tussen endotheelcellen en leukocyten, evenals hun effect op atherosclerotische cardiovasculaire ziekten en post-interventionele vasculaire remodeling. Het endotheel bekleedt het lumen van alle bloedvaten en fungeert als een semi-permeabele barrière en derhalve de migratie van leukocyten van het lumen naar de vaatwand controleert. Extravasatie van leukocyten vereist gecoördineerd samenspel tussen endotheelcellen en immuun cellen. Ondanks variaties in de specifieke mechanismen die door verschillende leukocyten worden gebruikt om diverse vaatbedden te passeren, is er een algemeen principe van vangst, rollen, langzaam rollen, stilstand, kruipen en uiteindelijk diapedese (transmigratie) via een paracellulair of transcellulair pad, zonder dat er lekkage van andere cellen of vloeistoffen optreedt.

Onder pathofysiologische omstandigheden, bijvoorbeeld na vasculaire interventies, wordt de barrièrefunctie van het endotheel aangetast, wat leidt tot ongecontroleerde leukocytenmigratie die tevens gepaard gaat met lekkage. De immuun cellen die de vaatwand binnendringen, veroorzaken uiteindelijk een ontstekings- en proliferatieve reactie die post-interventionele vasculaire remodeling initieert en de vorming van een atherosclerotische plaque kan starten. Tijdens de beginfasen van plaqueontwikkeling heeft deze influx van leukocyten met name plaats via het lumenale endotheel, terwijl in latere stadia nieuwe, lekke microvessels de belangrijkste toegangspoort worden naarmate de plaque blijft groeien.

In **hoofdstuk 2** vatten we de moleculaire processen samen die betrokken zijn bij het handhaven van de integriteit van het endotheel en geven we een overzicht van de huidige kennis over de transendotheliale migratie van leukocyten. We benadrukken de centrale rol van het (dysfunctionele) endotheel in atherosclerotische cardiovasculaire ziekte, evenals post-interventionele vasculaire remodeling. Daarnaast onderstrepen we het belang van cel-cel verbindingen en accentueren we de rol van intraplaque angiogenese bij de progressie van atherosclerotische plaques en nadelige vasculaire remodeling. De associatie tussen neovascularisatie en intraplaque bloeding wordt besproken, evenals de effecten van de verschillende leukocytensubtypen, waaronder macrofagen en T-cellen, op het ontstaan van atherosclerotische plaques. Verder benadrukken we het herstel van de endotheliale barrièrefunctie als een potentiële therapie om de belasting van atherosclerotische cardiovasculaire ziekten te verminderen.

In **hoofdstuk 3** onderzochten we hoe de monolaag van endotheel cellen rijpt in de loop van de tijd en het verband met de herstructurering van het actine-cytoskelet. Hiervoor hebben we humane endotheelcellen van de navelstrengader (HUVECs) gekweekt *in vitro* en op verschillende tijdstippen geanalyseerd om te bepalen hoe stabiele intercellulaire verbindingen zich ontwikkelen. We onderscheidden een cruciale rol voor F-actine bundels die direct naast de cel-cel juncties liggen. Deze bundels rekruteren verschillende junction-eiwitten (zoals claudine-1/5) naar de celrand om de endotheel integriteit te reguleren. Het verhogen van de F-actine bundels op de cel juncties door overexpressie van RhoGEF Trio resulteerde in verminderde vasculaire lekkage *in vitro*. Bovendien resulteerde lokale toediening van lentivirale vectoren gelijk na de chirurgische tot expressie van Trio in veneuze bypass graft. Daarnaast leidde Trio overexpressie tot verminderde vaatlekkage, terwijl het aantal vaten gelijk bleef.

Vervolgens hebben wij in **hoofdstuk 4** Trio gebruikt om het effect van verbeterde endotheliale integriteit op transmigratie van immuun cellen te beoordelen. Interessant genoeg werd de paracellulaire, maar niet de transcellulaire transendotheliale migratie van zowel polymorfonucleaire neutrofielen, CD4⁺ en CD8⁺ T-cellen verminderd door TrioN. In de veneuze bypass grafts leidde dit ook tot een afname van het aantal CD8⁺ T cellen. De interactie tussen immuuncellen, met name macrofagen, en endotheelcellen in post-interventionele vasculaire remodelling en

de vorming van atherosclerotische plaques wordt verder onderzocht in **hoofdstuk 5**. Om de wisselwerking tussen macrofagen en endotheelcellen, evenals de rol van hypoxie(-signaaltransductie) in deze interactie te beoordelen, voerden we veneuze bypass chirurgie uit bij een myeloïde specifieke PHD2 conditionele knock-out muis. De deletie van PHD2 veroorzaakt pseudo-hypoxische signaalgeving en we observeerden dat de uitscheiding van VEGF door macrofagen *in vitro* is verhoogd. Bovendien was VEGF expressie in de veneuze bypass grafts verhoogd *in vivo*, wat samenviel met toegenomen neovascularisatie (dichtheid van microvessels in de atherosclerotische plaque). Interessant genoeg nam de rijping van deze neovaten toe, terwijl het aantal geëxtravaseerde erythrocyten afnam, wat wijst op een vermindering van intraplaque bloeding. Verder was de vaatwand remodeling en de stabiliteit van de atherosclerotische plaque verbeterd bij myeloïde PHD2 knock-out muizen in vergelijking met wildtype. Het toegenomen aantal nieuwe microvessels, in combinatie met verminderde vaatlekkage toont aan dat intraplaque angiogenese en intraplaque bloeding twee afzonderlijke processen zijn. Bovendien blijkt hieruit dat de kwaliteit (rijping) van de neovaten belangrijker is dan het aantal (kwantiteit) voor het lot van de atherosclerotische plaque. Dit benadrukt bovendien dat intraplaque angiogenese op zich niet noodzakelijk plaquegroei hoeft te veroorzaken wanneer deze niet gepaard gaat met intraplaque bloeding.

In dit proefschrift hebben we ook de effectiviteit beoordeeld van therapeutische interventies die gericht zijn op de pre-, peri- en postoperatieve periode om post-interventionele vasculaire remodelering te verbeteren. Het therapeutische potentieel en het belang van de preoperatieve periode worden benadrukt in **hoofdstuk 6**. In dit hoofdstuk laten we zien dat kortdurende (preoperatieve) restrictie in de inname van zwavelhoudende aminozuren (methionine en cysteïne), bekend als methioninebeperking (MetR), nadelige veneuze graft- en arteriële remodelering vermindert. Het voedingsregime, dat bestaat uit een isocalorisch dieet (vergeleken met een hoog vet dieet, dat als controle diende in deze studie) met voldoende niveaus van alle macronutriënten, verhoogt de endogene productie van waterstofsulfide, een gasvormig molecuul met vaatbeschermende effecten. Slechts één week van de MetR-interventie voorafgaand aan de operatie beschermde tegen arteriële intimale hyperplasie in een muizenmodel van focale stenose, en tegen nadelige remodelering na veneuze bypass chirurgie. Specifiek voor veneuze bypasschirurgie hebben we vastgesteld dat het beschermende effect van de dieetinterventie afhangt van de aanwezigheid van het perivasculaire vetweefsel (PVAT), dat een fenotypische verandering ondergaat van negatief naar beschermend als reactie op MetR. Muizen die een controledieet kregen en een vena cava met intact PVAT ontvingen, hadden verergerde veneuze graftziekte, in tegenstelling tot MetR-gevoede muizen, die verminderde nadelige veneuze graftremodelling vertoonden. Dit wijst dus op een door het dieet geïnduceerde omkering van PVAT van een negatief naar een beschermend fenotype bij MetR.

Mechanistisch hebben we ontdekt dat MetR het 'bruinen' van PVAT induceert. Door bulk en nucleaire RNA-sequencing onthulden we opregulatie van verschillende pathways (AMPK- en PPAR-signaling en thermogenese) die duiden op het bruinen van PVAT van de vena cava bij MetR. Interessant is dat we observeerden dat deze bruiningsrespons tot 28 dagen na de operatie werd gehandhaafd. Naast het bruinen van PVAT, observeerden we ook dat MetR een anti-inflammatoir fenotype induceert in macrofagen in zowel de vaatwand als het PVAT. Dit anti-inflammatoire effect van MetR werd tot postoperatieve dag 28 gehandhaafd voor de macrofagen in het PVAT en in de veneuze graft wand. *In vitro* toonden we aan dat MetR adipocyten activeert om een anti-inflammatoire respons in macrofagen te triggeren, maar niet andersom.

Alles tezamen, laten we zien dat preoperatieve preconditionering door kortdurende MetR de langetermijnresultaten van vaatchirurgische ingrepen verbetert in muizen, met name door verbetering van het PVAT-fenotype, wat de ontstekingsreactie na de operatie vermindert. Dit werk benadrukt dus het therapeutische potentieel van zowel de preoperatieve periode als PVAT bij vasculaire interventies. De invasieve aard van vasculaire interventies legt een last op patiënten, terwijl het ook de mogelijkheid biedt voor lokale toediening van therapeutische middelen. Het potentieel van lokale therapieën wordt onderstreept door bijvoorbeeld met geneesmiddelen gecoate stents. Bij vasculaire reconstructies, zowel arterieel als veneus, wordt deze therapeutische optie in de huidige klinische praktijk onderbenut. Bij veneuze bypass chirurgie wordt de graft bijvoorbeeld volledig vrij geprepareerd vóór implantatie, wat dus ruimte biedt voor lokale toepassing van bijvoorbeeld een met geneesmiddelen of virussen geladen vloeistof.

In hoofdstuk 3 hebben we de mogelijkheid gebruikt voor lokale virale toediening en observeerden dat RhoGEF Trio de endotheliale barrière kon herstellen om intraplaque bloeding te verminderen, nadat we in hoofdstuk 3 en 4 hadden vastgesteld dat Trio vasculaire lekkage en immuun cel transmigration *in vitro* verminderde. De associatie tussen het endotheel (intraplaque angiogenese) en immuun cellen, met name T-cellen, wordt verder onderzocht in **hoofdstuk 7**. We hebben het T cel immuunlandschap van de veneuze graft beoordeeld door middel van flow cytometrie tijdens verschillende stadia van vasculaire remodellering. Een progressieve toename van het aantal CD4⁺ en CD8⁺, specifiek effector-geheugen, T-cellen werd in de loop van de tijd waargenomen, terwijl voornamelijk CD8⁺ T-cellen snel na de operatie werden geactiveerd.

Verder identificeren we CD137-CD137L-signalering als een belangrijke regulator van voornamelijk CD8⁺ T-cel activatie in de veneuze graftwand. CD137-expressie was alleen verhoogd op T-cellen in de veneuze graftwand daags na de operatie, maar niet in ander weefsel, en dient dus als een aantrekkelijk doelwit voor immunomodulatie tijdens de peri-/vroeg postoperatieve periode. Therapeutische activering van CD137 door agonistische antilichamen op postoperatieve dag 1 verbeterde de remodellering van de veneuze graft door het induceren van uitwaarts remodellering, terwijl remming van CD137-signalisering de ontwikkeling van atherosclerotische lesies versnelde. Bovendien induceerde agonistische CD137-behandeling effector-

geheugen T-celdifferentiatie zowel systemisch als lokaal, d.w.z. in de veneuze graftwand. De systemische IFN- γ -niveaus werden kort verhoogd na agonistische CD137-behandeling, terwijl de expressie van IFN- γ op lesionale T-cellen verhoogd bleef tot 28 dagen na de operatie in vergelijking met de controle, wat wijst op een lokaal effect op CD137⁺ T-cellen in de veneuze graft dat zich vertaalde naar een systemisch effect. Verder verbeterde agonistische CD137-behandeling de stabiliteit van de plaque door intraplaque angiogenese te remmen, terwijl tegelijkertijd de rijping van neovaten werd verbeterd. Daarentegen verminderde antagonistische CD137-behandeling de rijping van neovaten. Al met al onderstrepen deze resultaten het belang van vroege immuunactivatie als een kritieke regulator van post-interventionele vasculaire remodelering en tonen ze aan dat vroege immunomodulatie door activering of remming van CD137-CD137L-signalisering langdurige effecten heeft die de remodelering van de veneuze graft reguleren.

In **hoofdstuk 8** onderzochten we het therapeutische potentieel van PARP1-remming om post-interventionele vasculaire remodelering te verbeteren voor zowel arteriële, arterioveneuze als veneuze remodelering. PARP1 is een enzym dat cellulaire reacties op (DNA) schade en oxidatieve stress coördineert. Overmatige PARP-activering resulteert in cel dysfunctie, ontsteking, proliferatie en necrose. We tonen aan dat PARP1 na een operatie steeds meer tot expressie wordt gebracht in veneuze bypass grafts, voornamelijk in macrofagen en, in mindere mate, in vasculaire gladde spiercellen. Daarom veronderstelden we dat PARP1 nauw samenhangt met de (chronische) inflammatoire en myofibroproliferatieve respons na een operatie, die nadelige post-interventionele vasculaire remodelering aandrijft. Bijgevolg beoordeelden we de effectiviteit van een nieuw ontwikkelde, zeer selectieve PARP1-remmer om gunstige vasculaire remodelering te bevorderen. Toediening van deze inhibitor verminderde op dosisafhankelijke wijze nadelige remodelering van veneuze grafts. Daarnaast observeerden we dat PARP1-remming neointimavorming in een arterioveneuze fistel voorkomt. Bovendien werd arteriële restenose en intimale hyperplasie ook verminderd door PARP1-remming. Mechanistisch zagen we dat de PARP1-remmer voornamelijk invloed had op de ontstekingsreactie na de operatie. Over het geheel genomen benadrukken onze gegevens het therapeutische potentieel van deze PARP1-remmer om gunstige arteriële, arterioveneuze en veneuze remodelering te induceren na een operatie, wat verder onderzoek in grotere diermodellen rechtvaardigt.

De inflammatoire en (myofibro)proliferatieve reactie in de vaatwand na een operatie zijn intrinsiek gecorreleerd, grotendeels als gevolg van chronische hemodynamische en biomechanische veranderingen. Cellen in de vaatwand kunnen deze mechanische stimuli waarnemen en erop reageren. In **hoofdstuk 9** beschrijven we hoe progenitorcellen van de vena saphena, cellen in de adventitia, worden geactiveerd door mechanische rek (zoals waargenomen na vasculaire interventies). Dit induceert nucleaire translocatie van YAP, wat resulteert in differentiatie naar myofibroblasten, proliferatie en migratie. Deze myofibroproliferatieve reactie

op mechanische belasting werd onderbroken door de door de FDA goedgekeurde YAP-TAZ-remmer Verteporfin. *Ex vivo* gekweekte vena saphena die werden blootgesteld aan arteriële stroming vertoonden ook een verhoogde expressie van YAP-doelgenen, wat werd verminderd door Verteporfin. *In vivo* nam de expressie en nucleaire translocatie van YAP in de loop van de tijd toe in zowel varkens- als muizen veneuze grafts. In veneuze grafts van muizen werd YAP niet alleen uitgedrukt in cellen in de mediale en adventitiële laag van de veneuze graftwand, maar ook door endotheelcellen, zowel lumaal als adventitieel/neovaten. Dit zou kunnen duiden op een rol van YAP-TAZ bij intraplaque angiogenese. Toediening van Verteporfine remde intraplaque angiogenese en verminderde nadelige remodellering van veneuze grafts, wat de remming van YAP-TAZ benadrukt als een potentiële therapeutische strategie om post-interventionele vasculaire remodellering te verbeteren.

TOEKOMSTPERSPECTIEVEN

Het klinisch succes na invasieve interventies bij patiënten met hart- en vaatziekten is suboptimaal als gevolg van maladaptieve post-interventionele vasculaire remodellering. De mechanismen die dit fenomeen aansturen, zijn echter nog niet volledig begrepen. In dit proefschrift hebben we de rol van het endotheel en immuuncellen, evenals hun interactie bij atherosclerotische hart- en vaatziekten en post-interventionele vasculaire remodellering, onderzocht.

Intimale hyperplasie en de opbouw van een atherosclerotische plaque zijn de belangrijkste drijfveren van nadelige (inwaartse) post-interventionele vasculaire remodellering. Ondanks subtiele verschillen lijken deze processen sterk op primaire plaquevorming. Atherosclerose wordt van oudsher beschouwd als een door lipiden aangedreven ziekte. Als gevolg hiervan zijn lipiden-verlagende medicijnen een hoeksteen van de behandeling geworden om (de progressie van) atherosclerotische hart- en vaatziekten te voorkomen. Ondanks aanzienlijke verlagingen van het circulerende LDL-cholesterol door hoog-gedoseerde statinetherapie, die de eerste keuze is bij hypercholesterolemie, ontwikkelen nog steeds veel patiënten ernstige cardiovasculaire gebeurtenissen. Dit geeft aan dat naast een verstoorde cholesterolstofwisseling andere factoren betrokken zijn bij de ontwikkeling en progressie van atherosclerotische hart- en vaatziekten.

De sterke associatie tussen ontstekingsmarkers, zoals hoog-sensitief C-reactief proteïne (hsCRP) en IL-6, en een verhoogd risico op cardiovasculaire gebeurtenissen – onafhankelijk van cholesterolniveaus – bij zowel mannen als vrouwen heeft het huidige paradigma van atherosclerose als een chronische ontstekingsziekte bevestigd. Specifiek bij ogenschijnlijk gezonde personen, die relatief lage lipidenpiegels hebben, is aangetoond dat hsCRP het risico op hart- en vaatziekten voorspelt. Interessant is dat statines hsCRP-niveaus verlagen, onafhankelijk van hun cholesterolverlagende effect, wat wijst op een ontstekingsremmend effect van statinetherapie. De CANTOS-studie, waarin een monoklonaal antilichaam dat bindt aan IL-1 β werd gebruikt, heeft

ondubbelzinnig bewezen dat ontstekingsremmende therapie cardiovasculaire gebeurtenissen vermindert bij hoog risico patiënten met een stabiele status, die eerder een hartinfarct hebben gehad en een aanhoudende ontstekingsreactie vertonen (bepaald door hsCRP). Bovendien toonden andere klinische studies aan dat het gebruik van colchicine, een breed werkend ontstekingsremmend middel, na een recent hartinfarct het risico op cardiovasculaire gebeurtenissen vermindert.

Naast de invloed van ontsteking op atherosclerose is er ook bewijs dat ontsteking post-interventionele vasculaire remodelering beïnvloedt. Bij patiënten die PCI of CABG ondergaan, was preoperatieve CRP geassocieerd met restenose of mortaliteit, terwijl hoge postoperatieve CRP ook verband hield met nadelige cardiovasculaire gebeurtenissen. Het verminderen van ontsteking vóór of tijdens de operatie lijkt daarom een veelbelovende techniek om klinische resultaten te verbeteren. Momenteel is er echter tegenstrijdig bewijs over de vraag of perioperatieve statinetherapie (die hsCRP vermindert) deze nadelige cardiovasculaire gebeurtenissen na hartchirurgie kan beperken. Aan de ene kant benadrukken deze studies het belang van vroege, en zelfs pre-operatieve, ontsteking bij post-interventionele vasculaire remodelering, terwijl ze ook een rationale bieden voor vroege immunomodulatie. Aan de andere kant laten deze studies, evenals de CANTOS- en colchicinstudies, zien dat het ontwerpen van therapieën om immunomodulatie te bereiken en de resultaten van vasculaire interventies te verbeteren een uitdaging blijft. Het relatieve voordeel, dat slechts 15-20% bedroeg, van canakinumab en colchicine werd pas duidelijk na ongeveer een jaar, wat ruimte laat voor verbetering bij het ontwerpen van ontstekingsremmende therapieën. Bovendien roept het de vraag op of de ontstekingsremmende therapie bestaande, instabiele plaques beïnvloedde of de ontwikkeling van 'nieuwe' instabiele plaques voorkwam. Verder is het onbekend of een grotere effectiviteit van de behandeling kan worden bereikt wanneer deze onmiddellijk na vasculaire interventies wordt gestart. In de huidige opzet werd de buitensporige ontstekingsreactie die vaak wordt veroorzaakt door vasculaire interventies niet vermindert, wat de deur openlaat voor onderzoek naar een mogelijk therapeutisch voordeel van de huidige ontstekingsremmende therapie, wanneer deze vroeg – of zelfs vóór – vasculaire interventies wordt toegediend.

In het geval van post-interventionele vasculaire remodelering biedt de pre-operatieve periode een unieke kans voor chirurgische preconditionering, vanwege het geplande karakter van een groot aantal van de vasculaire interventies. Zorgverleners zouden deze periode moeten benutten voor therapeutische interventies om de resultaten te optimaliseren. Kortdurende preoperatieve dieetinterventies, zoals het MetR-dieet dat in hoofdstuk 6 werd gebruikt, vormen een zeer aantrekkelijke benadering om patiënten voor te bereiden op geplande stressfactoren zoals chirurgie. Dieetbeperkingsregimes hebben enorme gezondheidsvoordelen, waaronder, maar niet beperkt tot, verbeterde cardiometabole gezondheid en herstel van de immuunbalans. De gunstige effecten van kortdurende preoperatieve dieetbeperkingsen zijn eerder beschreven in modellen van renale, hepatische en vasculaire schade, evenals

veneuze bypasschirurgie. Bovendien is de veiligheid en haalbaarheid bij patiënten aangetoond in vasculaire en hartchirurgie. Interessant genoeg verkortte een week MetR voorafgaand aan cardiothoracale chirurgie het verblijf op de intensive care en de totale hospitalisatie, hoewel de studie te klein was om de effecten op chirurgische uitkomsten te beoordelen.

De klinische vertaling van dieetinterventies blijft echter lastig omdat de naleving van het dieet bij patiënten vaak niet voldoende is. Daarnaast kan de grote variëteit in (biologische) reacties op dieetveranderingen de klinische successen en de implementatie van dieetinterventies belemmeren, zelfs bij perfecte naleving. In het geval van MetR bijvoorbeeld, zijn de cardiometabole reacties sterk verschillend tussen mannen en vrouwen. Veel bewijs toont resistentie bij vrouwen tegen metabole voordelen, waaronder de bruining van vetweefsel. Het is daarom een illusie om een 'one-size-fits-all'-benadering te vinden, iets waar de geneeskunde historisch gezien altijd naar heeft gestreefd. Recente vooruitgangen in het begrijpen van cardiometabole gezondheid zouden de weg kunnen effenen naar op maat gemaakte dieetinterventies voor individuele patiënten. Ondertussen zal een beter begrip van de moleculaire paden en cellulaire effectoren die de beschermende effecten van dieetbeperkingen overbrengen cruciaal blijken te zijn voor het ontwerpen van nieuwe farmacologische therapieën, vooral voor patiënten die zich niet aan dieetinterventies kunnen houden. Identificatie van de 'bruinen' van PVAT als gevolg van MetR, en het positieve effect ervan op post-interventionele vasculaire remodellering, rechtvaardigt verder onderzoek naar het preoperatieve gebruik van verbindingen (zoals resveratrol, PPAR α -agonisten en β 3-adrenoceptor agonisten) om dieetinterventies farmacologisch te imiteren. Of deze medicijnen dezelfde beschermende effecten zullen hebben als de dieetinterventies, blijft een onderwerp voor toekomstig onderzoek. Hoogstwaarschijnlijk zullen de pleiotrope effecten van de dieetregimes niet volledig worden nagebootst door de farmacologische imitaties, hoewel de therapietrouw waarschijnlijk zal toenemen.

PERI-OPERATIEF

Naast de mogelijkheid tot chirurgische preconditionering, biedt de invasieve aard van de vasculaire interventies de mogelijkheid voor lokale in plaats van systemische toediening van een medicijn tijdens de operatie. Een klinische studie die onderzoekt of transfectie van vena saphena magna met TIMP3, via een kort *ex vivo* incubatieprotocol met virale vectoren, vóór implantatie effect heeft, is momenteel gaande (G1001147/1). Eerdere onderzoeken met een vergelijkbare opzet, maar gericht op transcriptiefactor E2F, dat geassocieerd is met de proliferatie van vasculaire gladde spiercellen, waren niet succesvol, ondanks voldoende transgenexpressie, wat het belang van de juiste doelkeuze benadrukt. Het voorkomen van overmatige extracellulaire matrixafbraak en daaropvolgende MMP-gemedieerde celmigratie, die in de dagen na de operatie plaatsvindt, door overexpressie van TIMP3 is waarschijnlijk een beter doel dan het

remmen van de proliferatie van gladde spiercellen, wat pas problematisch wordt in de maanden en jaren na de operatie. Bovendien is de experimentele opzet cruciaal. In hoofdstuk 3 gebruikten we een pluronic-gel geladen met lentivirale vectoren, waarvan bekend is dat ze transgenexpressie voor een langere periode bewerkstelligen in vergelijking met adenovirale vectoren. Vooral in het geval van veneuze bypasschirurgie en het creëren van een arterioveneuze fistel zijn de cellen die uiteindelijk de vaatwand zullen bevolken zowel van veneuze als arteriële oorsprong. Het gebruik van een *ex vivo* incubatieprotocol zou de therapeutische werkzaamheid van virale transfectie kunnen belemmeren, afhankelijk van de doelkeuze, aangezien alleen veneuze cellen transgenexpressie zullen vertonen.

Hoewel overexpressie van Trio de plaque-stabiliteit verbetert door intraplaque-bloedingen te verminderen, werd overmatige verdikking van de vaatwand niet voorkomen. Desalniettemin moet het gebruik van een pluronic-gel voor lokale toediening van verbindingen niet worden verworpen. Het combineren van ontstekingsremmende medicatie (zoals canakinumab of dexamethason) met een pluronic-gel blijft een aantrekkelijke benadering om de acute ontstekingsreactie na de operatie lokaal te verminderen, aangezien de gel ongeveer 5-7 dagen op zijn plaats blijft, zoals aangetoond door onze groep in eerdere studies. Om vroege en lokale immunomodulatie te bereiken, is het cruciaal om (ontstekings-)doelen te identificeren die lokaal tot expressie komen in de veneuze graft in deze peri-operatieve periode en de kinetiek van deze expressie te beoordelen. Zoals besproken in hoofdstuk 7, vertegenwoordigt CD137 een aantrekkelijk doel voor vroege immunomodulatie vanwege de lokale expressie ervan in de vaatwand kort na de operatie. Systemische toediening van agonistische CD137-antilichamen resulteerde in gunstige remodeling van veneuze grafts, wat de vraag oproept of lokale toediening – bijvoorbeeld via een pluronic-gel – hetzelfde effect zou hebben zonder ongewenste bijwerkingen. Bovendien zou men zich een therapeutische aanpak kunnen voorstellen waarbij CD8⁺ T-cellen, verzameld uit bloed, *ex vivo* worden behandeld met agonistisch CD137 en na de operatie worden geïnjecteerd. Of, en in hoeverre, dit tot dezelfde gunstige effecten zou leiden na vasculaire interventies, moet nog worden onderzocht. Tegelijkertijd is het van cruciaal belang om oncologiepatiënten die immuun-controlepunt-remmers ontvangen nauwlettend in de gaten te houden voor de versnelde ontwikkeling van hart- en vaatziekten. De activering van immuuncellen als gevolg van immunotherapie heeft de overleving van patiënten met specifieke kankers dramatisch verbeterd sinds de introductie ervan in 2011. Het gebruik van deze medicijnen zal ongetwijfeld toenemen, terwijl de eerste wetenschappelijke publicaties over versnelde plaquevorming als gevolg van immuunactivatie ook op ernstige lange termijn bijwerkingen wijzen. In de komende jaren zou het vakgebied moeten onderzoeken of dit ook leidt tot ernstige nadelige cardiovasculaire gebeurtenissen (zoals een hart- of herseninfarct). Niet-invasieve beeldvormingstechnieken zoals echografie, MRI of foto-akoestische beeldvorming zouden de mogelijkheid kunnen bieden om patiënten die cardiovasculaire therapie ontvangen nauwgezet te volgen en

bijvoorbeeld grote, onstabiele atherosclerotische plaques te identificeren. Vooral de combinatie van echografie en fotoakoestische beeldvorming zal informatie opleveren over zowel de grootte van de plaque als de samenstelling ervan. Het toepassen van kunstmatige intelligentie voor multimodale beeldanalyse zou in de toekomst klinische besluitvorming kunnen begeleiden en de selectie van patiënten voor chirurgische interventie en/of (agressieve) medicamenteuze therapie kunnen verbeteren.

Naast farmacotherapie zouden externe ondersteuningsapparaten voor (arterio-) veneuze vaten ook post-interventionele vasculaire remodellering kunnen verbeteren. Theoretisch zouden deze apparaten de pathologische respons op verstoorde hemodynamiek moeten afremmen door veneuze wanduitrekking te verminderen en de arteriële bloeddruk te absorberen. Het gebruik ervan bij veneuze bypasschirurgie en arterioveneuze fistels blijft echter controversieel. Klinische studies die de effectiviteit van externe ondersteuningsapparaten na veneuze bypasschirurgie beoordelen, hebben aanvankelijk geen vermindering van graftfalen na één jaar kunnen aantonen, hoewel de intimale hyperplasie in de stent was verminderd, wat het preklinische bewijs bevestigt. Het is echter belangrijk op te merken dat bypassfalen binnen 12 maanden meestal te wijten is aan technische complicaties en trombose, wat externe stents niet primair beogen te voorkomen. Analyse van 21 gestente en 29 niet-gestente veneuze grafts na 4,5 jaar toonde aan dat neointima-vorming significant was verminderd in de gestente bypasses, wat aangeeft dat de gunstige effecten van externe ondersteuningsapparaten langer behouden blijven. Of deze vermindering zich vertaalt in klinisch significante resultaten, zoals het voorkomen van angina of een vermindering van graftfalen, blijft onderwerp van toekomstig onderzoek. Voor arterioveneuze fistels is aangetoond dat externe vasculaire ondersteuning haalbaar is en het aantal re-interventies vermindert in vergelijking met traditionele fistels. Vooral voor arterioveneuze fistels is de configuratie, en daarmee de richting van de bloedstroom, een cruciale determinant van klinische resultaten. Het is te verwachten dat de effecten van externe ondersteuningsapparaten groter zouden zijn in vergelijking met veneuze bypasses. Klinisch bewijs uit grote cohortstudies of gerandomiseerde gecontroleerde onderzoeken met betrekking tot de effectiviteit van externe ondersteuningsapparaten voor arterioveneuze fistels ontbreekt echter momenteel. Desondanks suggereert het huidige (pre-)klinische bewijs dat het gebruik van een extern ondersteuningsapparaat bij veneuze bypasses of arterioveneuze fistels onmiddellijke maximale uitzetting na de operatie zal voorkomen door de hemodynamische krachten te verbeteren en de biomechanische stress te verminderen.

Net zoals de voortdurende evolutie van 'interne' stents, zoals gebruikt bij percutane coronaire interventie, heeft geleid tot de ontwikkeling van medicijnafgevend-stents met superieure klinische resultaten in vergelijking met de oorspronkelijk gebruikte stents, kan men zich een vergelijkbaar proces voorstellen voor externe stents. Preklinisch bewijs suggereert al superieure prestaties van een rapamycine-gecoate externe stent om intimale hyperplasie na veneuze bypasschirurgie te voorkomen in

vergelijking met een niet-gecoate stent. Hoewel het gebruik van anti-proliferatieve medicijn-gemoduleerde interne stents voor endovasculaire interventies de vorming van neointima heeft verminderd, resulteerde dit in een verhoogde (late) trombose-incidentie door vertraagde re-endothelialisatie, wat endotheelcelproliferatie vereist. Het zal interessant zijn om te zien of gecooate, externe stents neointimavorming zullen voorkomen zonder het verhoogde risico op trombose als gevolg van de externe afgifte van antiproliferatieve therapie, die mogelijk geen effect heeft op de endotheelcelproliferatie. Bovendien lijkt het gebruik van biologisch afbreekbare stents veelbelovend, hoewel er aanzienlijke uitdagingen moeten worden aangepakt. De optimale timing voor afbraak, vooral na (arterio-)veneuze reconstructies, moet nog worden bepaald om mechanische weerstand te bieden en acute en chronische terugslag te voorkomen, terwijl matige vaatwandverdikking wordt toegestaan voordat de stent volledig is afgebroken.

POSTOPERATIEVE PERIODE

De acute, hyper-inflammatoire reactie die wordt waargenomen in de eerste weken na de vasculaire interventie, zet de aanpassing van bloedvaten aan de nieuwe hemodynamische omgeving in gang. Na verloop van tijd zou de ontsteking moeten afnemen om overmatige verdikking van de vaatwand te voorkomen. Vaak wordt deze acute ontsteking echter slechts gedeeltelijk opgelost en keert deze later terug gedurende het post-interventionele vasculaire remodeling proces in een chronische vorm die vergelijkbaar is met de ontsteking die wordt waargenomen bij primaire atherosclerose. De chronische inflammatoire reactie veroorzaakt de neointima vorming en de ontwikkeling van een atherosclerotische plaque, die doet denken aan naïeve atherosclerose, hoewel deze zich sneller ontwikkelt door de aanvankelijke extreme hemodynamische verstoringen.

De aanvankelijke verdikking van de intima-laag wordt gedreven door de proliferatie en migratie van vasculaire gladde spiercellen. Tijdens (versnelde) plaquevorming worden ook andere cellen zoals macrofagen en gedifferentieerde endotheelcellen steeds vaker in de atherosclerotische plaque aangetroffen. Recentelijk is aangetoond dat mesenchymale (stam)cellen en fibroblast(-achtige) cellen ook actief bijdragen aan plaquegroei. Daarnaast beschrijven we in hoofdstuk 9 hoe progenitorcellen van de vena saphena magna mechanische stress kunnen waarnemen en reageren door celproliferatie te induceren via de activatie van YAP-TAZ-signaaltransductie, wat wijst op een mogelijke bijdrage aan post-interventionele vasculaire remodeling. Het blokkeren van YAP-TAZ-signaaltransductie met het door de FDA goedgekeurde medicijn Verteporfin, voorkwam proliferatie en migratie van deze progenitorcellen. Therapeutische behandeling met Verteporfin, beginnend 10 dagen na veneuze bypassoperatie, beperkte ongunstige remodeling van de vena saphena, wat wijst op het therapeutische potentieel van YAP-TAZ-remming bij post-interventionele vasculaire remodeling. Verteporfin verminderde het aantal myofibroblastachtige

cellen in de vaatwand van de bypass, terwijl ook het aantal neovaten dat in de plaque groeide, afnam. Dit wijst enerzijds op het feit dat Verteporfin de proliferatieve reactie in meerdere celtypen blokkeert, wat leidde tot verminderde pathologische verdikking van de vaatwand. Anderzijds verhoogt de alomtegenwoordige expressie van YAP-TAZ in verschillende celtypen het risico op ongewenste bijwerkingen, wat verder onderzoek naar de effecten van YAP-remming in bijvoorbeeld leukocyten rechtvaardigt. De systemische afname van pro-inflammatoire cytokinen roept ook de vraag op in hoeverre de gunstige effecten werden veroorzaakt door lokale effecten op de vaatwand van de bypass in vergelijking met de systemische effecten. Desondanks vraagt de desensibilisatie voor mechanische prikkels door Verteporfin om onderzoek in andere modellen van post-interventionele vasculaire remodeling die verstoorde biomechanica ervaren. Het evalueren van de effectiviteit van Verteporfin na bijvoorbeeld arterioveneuze fisteloperaties zal ook aantonen of de gunstige effecten berustten op het afremmen van de myofibroproliferatieve reactie of ook (gedeeltelijk) op de remming van intraplaque angiogenese.

INTRAPLAQUE ANGIOGENESE

De ingroei van neovaten in de atherosclerotische plaque is een kenmerk van plaque-instabiliteit. Hoewel de angiogene reactie op hypoxie aanvankelijk fysiologisch is, wordt deze na verloop van tijd pathologisch door het gebrek aan pericyte-bedekking en de vorming van juiste endotheelcel-celverbindingen, wat deze neovaten vatbaar maakt voor vaatlekkage. De ongecontroleerde extravasatie van bijvoorbeeld leukocyten en erythrocyten voedt ontsteking en veroorzaakt plaque-instabiliteit en -groei. Anti-angiogene therapie gericht op het voorkomen van plaque-neovascularisatie heeft aangetoond atherosclerose in veneuze bypasses te verminderen, hoewel niet elke strategie vergelijkbare resultaten heeft opgeleverd. Blokkade van de basis fibroblast groeifactor (bFGF)-signaaltransductie leidde tot verminderde intraplaque angiogenese en bloeding, terwijl remming van VEGFR2-signaltransductie de lekkage van neovaten verminderde, hoewel het niet resulteerde in verminderde neovascularisatie. Bovendien verminderde bFGF-blokkade plaque-ontsteking en remming van VEGFR2-vergroei vertraagde plaquegroei. Tezamen met ons werk dat in hoofdstuk 3 en 5 wordt beschreven, levert dit overtuigend bewijs dat de kwaliteit, in plaats van de kwantiteit, van deze neovaten de toekomst van de atherosclerotische plaque bepaalt. Systemische toediening van anti-angiogene therapie zal echter waarschijnlijk niet in de klinische praktijk worden toegepast. De atherosclerotische plaque zelf, wanneer symptomatisch, veroorzaakt hypoxie stroomafwaarts van de laesie. Patiënten met atherosclerotische hart- en vaatziekten hebben daarom neovascularisatie nodig in het hypoxische weefsel, wat het paradoxale karakter van angiogenese bij atherogenese benadrukt. Lokale toediening van anti-angiogene behandeling tijdens een operatie zal waarschijnlijk geen betekenisvolle resultaten opleveren, aangezien plaque-neovascularisatie optreedt in latere stadia van post-

interventionele vasculaire remodeling. De lekkage van deze neovaten biedt echter de mogelijkheid voor gerichte therapie met bijvoorbeeld (lipide) nanodeeltjes. Wanneer geladen met een VEGFR2-remmer, bijvoorbeeld, zouden de nanodeeltjes intra-arterieel kunnen worden geïnjecteerd stroomopwaarts van de atherosclerotische laesie, waarin ze zich lokaal zouden ophopen vanwege de defecte endotheliale barrière. Theoretisch zou dit systemische bijwerkingen beperken. Bovendien kan het lokale effect worden versterkt in combinatie met ultrasone-puls vibratie van microbellen, waarbij een laser de nanodeeltjes lokaal kan vernietigen, wat leidt tot gecontroleerde afgifte van de verbinding, die bijvoorbeeld ook immunomodulerend kan zijn.

PVAT

De neovaten die in de hypoxische plaque groeien, ontstaan vaak uit de vasa vasorum van de adventitiële laag en het perivasculaire vetweefsel (PVAT). Lange tijd over het hoofd gezien in de vasculaire biologie, wordt PVAT momenteel erkend als een endocrien orgaan dat actief bijdraagt aan (post-interventionele) vasculaire remodeling. Door bijvoorbeeld een verhoogde uitscheiding van pro-inflammatoire cytokinen na vetrijke voeding, kan PVAT neointima-vorming verergeren. Bij patiënten met coronaire hartziekten wordt ontstoken PVAT (gemeten door CT-angiografie en PVAT-attenuatie genoemd) geassocieerd met plaque-instabiliteit. In hoofdstuk 6 hebben we aangetoond dat PVAT therapeutisch kan worden gericht om ongunstige post-interventionele vasculaire remodeling te verminderen. Het evalueren van PVAT-attenuatie bij patiënten met atherosclerotische hart- en vaatziekten kan daarom mogelijk hoog-risico plaques identificeren en de patiëntselectie voor anti-inflammatoire therapie verbeteren. Bovendien zou het ook kunnen worden gebruikt om de effectiviteit van behandelingen te monitoren en als gevolg daarvan klinische besluitvorming sturen. Het niet verminderen van PVAT-attenuatie na canakinumab-therapie, bijvoorbeeld, zou kunnen wijzen op beperkte effecten en een arts ertoe aanzetten de huidige medicatie te wijzigen of te stoppen. Huidige onderzoeken hebben zich gericht op arterieel PVAT, wat resulteert in een gebrek aan kennis over de vraag of op CT gebaseerde attenuatie kan worden toegepast op veneus PVAT. Het evalueren van PVAT-attenuatie voorafgaand aan veneuze bypass of arterioveneuze fisteloperaties zou kunnen helpen bij de selectie van vaten en patiënten identificeren die mogelijk baat hebben bij chirurgische preconditionering door bijvoorbeeld dieetbeperkingen (mimetica) of anti-inflammatoire therapie. Bovendien zou het de chirurgische besluitvorming kunnen beïnvloeden en het rechtvaardigen om PVAT te verwijderen tijdens operatie in geval van attenuatie, gezien de negatieve effecten van ontstoken PVAT op vasculaire remodeling.

THERAPEUTISCHE ANGIOGENESE

Het idee dat intraplaque neovaten voornamelijk afkomstig zijn van bestaande adventitiële vaten en perivasculair vetweefsel (PVAT), impliceert dat veneuze cellen in staat zijn om arteriële neovessels te vormen. Recente bewijzen suggereren dat in ontwikkelende zebravissen veneuze cellen inderdaad in staat zijn tot arteriële neovascularisatie, hoewel dit nog niet eenduidig is aangetoond voor niet-ontwikkende veneuze endotheelcellen. Het concept van veneuze neovascularisatie zou een nieuwe benadering kunnen zijn om therapeutische angiogenese te stimuleren. Om dit te bereiken, moeten de signaalroutes die betrokken zijn bij veneuze uitlopervorming worden geïdentificeerd met behulp van RNA-sequencing en (fosfo)proteomics. De routes die veneuze endotheelcellen aansturen tot vorming van neovessels, zijn waarschijnlijk anders dan die van arteriële cellen, wat de mogelijkheid biedt om nieuwe therapeutische wegen te verkennen.

In de afgelopen jaren hebben de meeste onderzoeken gericht op het induceren van therapeutische angiogenese zich gericht op het verhogen van VEGF-niveaus, de meest bekende groeifactor die (neo)vascularisatie stimuleert, wat tegenstrijdige resultaten heeft opgeleverd. Bij patiënten met perifere arteriële aandoeningen is er controversieel klinisch bewijs dat suggereert dat gentherapie voor VEGF de angiogenese stimuleert, wat resulteert in een significante toename van pijnvrije loopafstand. Tegelijkertijd werd amputatie van ledematen niet voorkomen, en liet een andere fase-II klinische proef geen verbetering in fysieke prestaties of kwaliteit van leven zien. Bovendien werden ernstige bijwerkingen waargenomen, zoals de ontwikkeling van spinnenangiomen en oedeem, waarschijnlijk veroorzaakt door lekkende neovaten, wat mogelijk voortkomt uit het effect van VEGF op vasculaire permeabiliteit. Interessant is dat recentere studies verhoogde niveaus van zowel circulerend als intramusculair VEGF (en andere groeifactoren) hebben aangetoond bij patiënten met perifere arteriële aandoeningen. Bovendien correleren VEGF-niveaus met de ernst van de ziekte en zijn ze geassocieerd met slechte behandeluitkomsten. Dit wijst dus eerder op inadequate VEGF-signalisatie, in plaats van een tekort aan VEGF-productie, wat het concept van VEGF-gentherapie om perifere arteriële aandoeningen te verminderen ter discussie stelt. Over het geheel genomen pleit dit voor de selectie van andere doelen, die ook stroomopwaarts of stroomafwaarts (zoals Trio) van VEGF kunnen liggen, voor therapeutische angiogenese. Integratie van nieuwe RNA-sequencinggegevens (bij voorkeur ook die waarbij veneuze angiogenese betrokken is) met bestaande datasets zou door kunstmatige intelligentie kunnen worden gebruikt om doelwitten te identificeren. Tegelijkertijd moet de validatie van potentiële doelwitten plaatsvinden op eiwitniveau bij patiënten en bijpassende controles. Bij voorkeur zou een onderscheid moeten worden gemaakt tussen circulerend, onaangetast en ischemisch weefsel voordat wordt overgegaan tot (preklinische) onderzoeken. Patiënten met coronaire hartziekten zouden een interessante groep zijn vanwege de toenemende klinische vraag en het relatief kleine

gebied van ischemisch weefsel (vergeleken met patiënten met perifere arteriële aandoeningen), dat ook direct kan worden behandeld door intramyocardiale injectie.

Over het geheel genomen heeft het werk dat in dit proefschrift wordt beschreven zich gericht op het begrijpen en verbeteren van post-interventionele vasculaire remodeling om chirurgische resultaten te verbeteren. De (mechanistische) inzichten hebben nieuw licht geworpen op de cellulaire en moleculaire mechanismen die betrokken zijn bij vaatziekten en hebben hopelijk de weg geëffend voor nieuwe therapeutische mogelijkheden. Om ons begrip van hart- en vaatziekten verder te vergroten en uiteindelijk de medische zorg te verbeteren, moeten clinici en wetenschappers uit verschillende disciplines nauw samenwerken, zonder daarbij het perspectief van de patiënt uit het oog te verliezen. Alleen dan zullen deze internationale, interdisciplinaire en inter-institutionele inspanningen op de lange termijn succesvol zijn. In de nabije toekomst kan de integratie van verschillende bestaande technieken in multi-modale beeldvormingsplatforms, die worden geanalyseerd en ondersteund door kunstmatige intelligentie, klinische besluitvorming begeleiden en de klinische zorg verbeteren door de patiëntenselectie voor huidige medische interventies te optimaliseren. De integratie van nieuwe en bestaande RNA- en multi-omische datasets zou de basis moeten vormen voor de identificatie van nieuwe therapeutische doelwitten door kunstmatige intelligentie en clinician-scientists, na zorgvuldige validatie van de doelwitten in menselijke monsters op zowel gen- als eiwitniveau.

