



## UvA-DARE (Digital Academic Repository)

### Monocytes in ischemic heart disease

van der Laan, A.M.

**Publication date**  
2013

[Link to publication](#)

**Citation for published version (APA):**

van der Laan, A. M. (2013). *Monocytes in ischemic heart disease*. [Thesis, fully internal, Universiteit van Amsterdam]. Boxpress.

**General rights**

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

**Disclaimer/Complaints regulations**

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

## NEDERLANDSE SAMENVATTING

Gedurende de laatste decennia is gebleken dat het immuunsysteem een belangrijke rol speelt in ischemische hartziekten. Het immuunsysteem bestaat o.a. uit verschillende soorten immuuncellen, die ieder een eigen taak hebben. Met behulp van diermodellen en *in vitro* experimenten is steeds duidelijker geworden welke taken deze immuuncellen hebben in ischemische hartziekten. Het nadeel van deze diermodellen is dat er veel verschillen bestaan tussen het immuunsysteem van dieren en van patiënten. Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift was dan ook om meer inzicht te krijgen in de rol van immuuncellen in de natuurlijke herstelprocessen die optreden in patiënten met ischemische hartziekten. Daarbij ligt de nadruk op de rol van een bepaald type immuuncel, de monocyt. De resultaten beschreven in dit proefschrift komen voort uit klinische studies, autopsie studies, preklinische studies en *in vitro* studies die uitgevoerd zijn in nauwe samenwerking met verschillende onderzoeksgroepen wereldwijd. Het integreren van deze informatie heeft geleid tot meer inzicht in de rol die monocyten spelen in patiënten met ischemische hartziekten en biedt aanknopingspunten voor de ontwikkeling van nieuwe behandelingsmethoden die schade aan het hart kunnen beperken of het herstel kunnen verbeteren. De belangrijkste bevindingen van dit proefschrift worden hieronder weergegeven.

### **Celtherapie in patiënten met een acuut hartinfarct**

Door de geavanceerde behandeling van patiënten met een acuut hartinfarct met o.a. primaire percutane coronaire interventie (PCI) en medicamenteuze therapie is het aantal patiënten dat een hartinfarct overleeft enorm toegenomen. Ondanks optimale behandeling kan niet voorkomen worden dat een deel van het hart beschadigd raakt. Een groot deel van de patiënten met een hartinfarct ontwikkelt uiteindelijk hartfalen, doordat de hartspier niet goed herstelt. Ongeveer 10 jaar geleden verschenen de eerste studies waaruit bleek dat een aanvullende behandeling met stamcellen uit het beenmerg het herstel na een hartinfarct gunstig zou kunnen beïnvloeden. De precieze werkingsmechanismen zijn tot op heden niet opgehelderd. De resultaten uit preklinische studies toonden aanwijzingen dat stamcellen uit het beenmerg het herstel van de bloedvaten en de myocardiale functie zouden kunnen verbeteren door de uitscheiding van groeifactoren en cytokinen. Tot op heden is het niet duidelijk of een dergelijke therapie met cellen uit het beenmerg ook in patiënten met een acuut hartinfarct het herstel van de myocardiale perfusie zou kunnen stimuleren.

In **hoofdstuk 2** worden de effecten onderzocht van celtherapie met cellen uit het beenmerg op het herstel van de myocardiale perfusie in patiënten met een acuut hartinfarct die geïncubeerd zijn in de HEBE studie. In deze studie kregen patiënten aanvullende behandeling met intracoronaire infusie van autologe mononucleaire cellen uit het beenmerg (beenmerg groep), autologe mononucleaire cellen uit het veneuze bloed (bloed groep), of standaard behandeling (controle groep). Drieëntwintig patiënten uit de beenmerg groep, 18 patiënten uit de bloed groep, en 19 patiënten uit de controle groep ondergingen tevens intracoronaire hemodynamische metingen op dag 3-8 na primaire PCI en op 4 maanden. Er werden geen verschillen gevonden in de verandering van de coronaire bloedstroomreserve en microvasculaire weerstand

tijdens hyperemie tussen de twee behandelingsgroepen en de controle groep. Deze resultaten suggereren dat een aanvullende behandeling met cellen uit het beenmerg geen effect heeft op het herstel van de myocardiale perfusie na een acuut hartinfarct.

Er is vrij weinig onderzoek gedaan naar de effecten van celtherapie met beenmergcellen op de lange termijn. In **hoofdstuk 3** worden daarom de lange termijn effecten onderzocht van de aanvullende behandeling met beenmergcellen en cellen uit het bloed op het herstel van de globale en regionale myocardiale functie in de patiënten van de HEBE studie. Naast een cardiovasculair magnetische resonantie (CMR) onderzoek op dag 3-7 en 4 maanden na primaire PCI ondergingen patiënten ook een CRI onderzoek op 2 jaar na primaire PCI. Na 2 jaar werden er geen verschillen gevonden ten aanzien van het herstel van zowel de globale als de regionale myocardiale functie tussen de twee behandelingsgroepen en de controle groep. We concludeerden dan ook dat aanvullende behandeling met celtherapie ook op de lange termijn geen gunstig effect heeft op het herstel van de myocardiale functie na een acuut hartinfarct.

### **Monocyten en herstel na een hartinfarct**

Monocyten zijn immuuncellen die een belangrijke rol spelen in het herstel van de hartspier na een hartinfarct. Verschillende klinische studie hebben laten zien dat patiënten met een hoog aantal circulerende monocyten na een acuut hartinfarct een slecht herstel tonen van de myocardiale functie en vaker hartfalen ontwikkelen als gevolg van structurele veranderingen in de hartspier, zogenaamde negatieve remodelering. Mogelijk wordt deze negatieve remodelering veroorzaakt door een buiten proportionele respons van de monocyten. Overactieve monocyten/macrofagen in en rondom het infarctgebied zouden te veel extracellulaire matrix kunnen afbreken en het hartspierweefsel juist kunnen verzwakken, met als potentiële gevolgen, dilatatie van de linker hartkamer, aneurysma vorming, of zelfs een ruptuur van de linker ventrikel. Op de lange termijn zouden disfunctionerende monocyten/macrofagen aanleiding kunnen geven tot overmatige fibrose, waardoor de linker ventrikel zijn compliantie verliest. Het moduleren van de monocyten respons wordt daarom gezien als een interessante optie om het herstel na een hartinfarct te verbeteren en om de ontwikkeling van hartfalen te voorkomen. Meer inzicht in de rol die monocyten spelen na een acuut hartinfarct in patiënten biedt mogelijk aanknopingspunten voor de ontwikkeling van nieuwe behandelingsmethoden.

In hoofdstuk 4 en 5 worden twee substudies van de HEBE studie beschreven. In **hoofdstuk 4** worden de aantallen van twee monocyten subpopulaties (i.e. de klassieke en niet-klassieke monocyten) in het bloed van 58 patiënten met een acuut hartinfarct gemeten en de relatie onderzocht met myocardiale schade en herstel van de myocardiale functie. Patiënten met een grote hoeveelheid circulerende klassieke monocyten hadden een verminderde linker ventrikel ejectie fractie, een groter infarctgebied en hadden vaker microvasculaire obstructie kort na primaire PCI. Ook na 4 maanden was de regionale myocardiale functie verminderd in patiënten met een hoog aantal circulerende klassieke monocyten. Daarentegen werd een omgekeerde associatie gevonden voor de hoeveelheid niet-klassieke monocyten in het bloed. De resultaten van deze studie doen vermoeden dat een buiten proportionele mobilisatie

van klassieke monocyten de schade aan het hart na een acuut hartinfarct zou kunnen verergeren.

Monocyten bestaan niet alleen uit verschillende subpopulaties met bepaalde functies, maar ze kunnen ook hun functionele eigenschappen aanpassen op basis van signalen uit de omgeving. In **hoofdstuk 5** wordt nader onderzoek gedaan naar eigenschappen van monocyten die relateren aan negatieve remodelering in patiënten met een acuut hartinfarct. Een vergelijking van genexpressie profielen van monocyten tussen patiënten met negatieve remodelering en patiënten met positieve remodelering toonde aan dat de expressie van type I interferon gereguleerde genen verlaagd is in patiënten met negatieve remodelering. Daarnaast werden er in klinisch autopsie materiaal van patiënten die overleden zijn na een hartinfarct aanwijzingen gevonden voor lokale expressie van een type I interferon, interferon- $\alpha$ , in monocyten/macrofagen in het infarctgebied. Uit deze resultaten blijkt dat type I interferonen een gunstige rol zouden kunnen spelen in het herstel proces na een acuut hartinfarct in patiënten.

**Hoofdstuk 6** beschrijft een autopsie studie waarin de monocyten respons verder wordt onderzocht op weefselniveau. In deze studie werden biopten van het hart, de milt en het beenmerg onderzocht van 28 patiënten die op verschillende tijdstippen na een hartinfarct overleden zijn. Monocyten/macrofagen die zich tussen 12 uur en 5 dagen na een acuut hartinfarct hadden opgehoopt in het geïnfarceerde gebied bevonden zich voornamelijk in het gebied rondom het primaire infarct (de zogenaamde infarct “border zone”) tussen de cardiomyocyten die de ischemische periode hadden overleefd. Echter tussen 5 en 14 dagen na een acuut hartinfarct waren de monocyten/macrofagen vooral gelokaliseerd in de kern van het primaire infarct (de zogenaamde infarct “core zone”), welke bestaat uit granulatiweefsel. Analyse van subpopulaties toonde aan dat de monocyten/macrofagen in de infarct “border zone” tussen 12 uur en 5 dagen na een hartinfarct voornamelijk bestonden uit het klassieke type, terwijl vergelijkbare hoeveelheden klassieke en niet-klassieke monocyten/macrofagen werden gevonden in de “infarct core” tussen 5 en 14 dagen na een hartinfarct. Onderzoek van de monocyten/macrofagen in de milt en het beenmerg liet een opvallende afname van monocyten/macrofagen zien, welke het meest opvallend was in de milt. Hieruit blijkt dat de milt wellicht als een belangrijk reservoir voor monocyten fungeert.

Tot op heden is het niet duidelijk of monocyten ook een rol spelen in negatieve remodelering van het gedeelte van de hartspier dat niet geïnfarceerd is na een acuut hartinfarct, (de zogenaamde “remote zone”). Met behulp van geavanceerde positron emissie tomografie/computed tomografie en CMR technieken wordt in een preklinische studie beschreven in **hoofdstuk 7** aangetoond dat monocyten niet alleen ophopen in het geïnfarceerde deel van het hart, maar ook in de “remote zone” na een hartinfarct in muizen. Deze bevinding werd ondersteund door de aanwezigheid van monocyten/macrofagen in de “remote zone” van patiënten die overleden zijn na een hartinfarct. Daarnaast werd na een hartinfarct in muizen in de “remote zone” een verhoogde expressie van adhesie moleculen en chemokinen gevonden die betrokken zijn bij het aantrekken van monocyten uit de bloedbaan, evenals een verhoogde activiteit van matrix metalloproteinases. Deze resultaten

wijzen niet alleen uit dat monocyten ophopen in de “remote zone” na een acuut hartinfarct, maar geven ook aanwijzingen voor het concept dat monocyten betrokken zijn bij negatieve remodelering van de “remote zone”.

### Monocyten in atherosclerose

Het is bekend dat monocyten ook een rol spelen bij de ontwikkeling van atherosclerotische plaques. Ophopende monocyten/macrofagen in atherosclerotische plaques kunnen de ontsteking in de vaatwand verergeren en de progressie van de ziekte versnellen. De identificatie van karakteristieke in monocyten die relateren aan atherosclerose kunnen aanwijzingen geven voor de mechanismen die betrokken zijn bij de progressie van atherosclerose.

In **hoofdstuk 8** worden de genexpressie profielen van ongestimuleerde en gestimuleerde monocyten, macrofagen en T-cellen onderzocht en vergeleken tussen patiënten met uitgebreide atherosclerose van de kransslagaderen en patiënten met normale kransslagaderen. Er werd een lagere expressie van genen gevonden die betrokken zijn bij ontsteking in de patiënten met atherosclerose van de kransslagaderen. Mogelijk heeft de ontsteking in de vaatwand tot gevolg dat de expressie van genen die betrokken zijn bij ontsteking wordt verlaagd, als een poging de progressie van atherosclerose tegen te onderdrukken.

Onderzoek heeft aangetoond dat het aantal circulerende monocyten toeneemt na een acuut hartinfarct. Of deze toename ook effect heeft op de progressie van atherosclerose, en dus de kans op reïnfarcering, was tot op heden niet opgehelderd. In **hoofdstuk 9** wordt daarom het effect van een hartinfarct op de progressie van atherosclerose onderzocht in *ApoE*<sup>-/-</sup> muizen die spontaan atherosclerose ontwikkelen. Na het induceren van een hartinfarct ontstond er een langdurige monocytose en was er duidelijk meer progressie van de atherosclerotische plaques ten opzichte van *ApoE*<sup>-/-</sup> muizen zonder hartinfarct. Na een hartinfarct werden hematopoietische stamcellen vanuit het beenmerg naar de milt gemobiliseerd door de activatie van het sympathisch zenuwstelsel. Hierop ontstond een verhoogde productie van monocyten in de milt. Deze bevindingen laten niet alleen zien dat een hartinfarct de progressie van atherosclerose kan verergeren, maar geven ook aanwijzingen voor een belangrijk onderliggend mechanisme dat gebruikt kan worden voor de ontwikkeling van een nieuwe therapie voor patiënten met een acuut hartinfarct.

### Monocyten in arteriogenese

Arteriogenese is een natuurlijk compensatie mechanisme in patiënten met atherosclerose van de kransslagaders. Monocyten spelen een belangrijke rol tijdens arteriogenese. Nadat deze cellen getransmigreerd zijn in de vaatwand, kunnen monocyten/macrofagen de omvorming van pre-existente arteriolen tot functionele collaterale arteriën stimuleren door uitscheiding van o.a. groeifactoren en cytokinen. In een eerder onderzoek is aangetoond dat interferon- $\beta$  een remmend effect heeft op de arteriogene respons. In **hoofdstuk 10** wordt onderzocht of het blokkeren van interferon- $\beta$ , en dus ook de interferon- $\beta$  signalering, de arteriogenese juist kan stimuleren. Blokkering van interferon- $\beta$  leidde tot een verhoogde proliferatie van gladde spiercellen. In *IFNAR*<sup>-/-</sup> muizen, waarin de receptor voor interferon- $\beta$  ontbreekt,

werd een verlaagde expressie van genen gevonden in monocyten, die betrokken zijn bij apoptose. Verder werd de arteriogene respons onderzocht in IFNAR<sup>-/-</sup> muizen door het meten van het herstel van de perfusie na ligatie van de arteria femoralis. De arteriogene respons was duidelijk verbeterd in de IFNAR<sup>-/-</sup> muizen in vergelijking tot wildtype muizen. Tot slot werd in een cohort van 50 patiënten met een chronische totale occlusie van een van de kransslagaderen een associatie gevonden tussen een verminderde arteriogene respons en verhoogde interferon- $\beta$  signalering. Deze bevindingen laten op een mechanistische wijze een nieuwe mogelijkheid zien om de arteriogene respons in patiënten te stimuleren door het blokkeren van interferon- $\beta$  (signalering).

In **hoofdstuk 11** wordt nader onderzoek gedaan naar eigenschappen van monocyten die relateren aan de arteriogene respons in de patiëntengroep beschreven in hoofdstuk 10. In deze studie werd een verhoogde genexpressie gevonden van galectine-2 in patiënten met een verminderde arteriogene respons. De genexpressie van galectine-2 in deze patiënten bleek geassocieerd te zijn met een genetisch polymorfisme in het gen dat codeert voor galectin-2. Toediening van galectine-2 in muizen liet een duidelijk vermindering zien van de arteriogene respons. Hiermee is voor het eerst een remmende rol voor deze nieuwe factor in de arteriogene respons aangetoond, wat suggereert dat remming van galectine-2 mogelijk een stimulerend effect kan hebben op arteriogenese in patiënten met een (genetisch) verhoogd galectine-2 gehalte.

### **Toekomstperspectieven**

De studies beschreven in dit proefschrift hebben geleid tot meer inzicht in de rol die immuuncellen spelen in de natuurlijke herstelprocessen in patiënten met ischemische hartziekten en bieden aanknopingspunten voor de ontwikkeling van nieuwe behandelingsmethoden die schade aan het hart kunnen beperken of het herstel kunnen verbeteren.

Ondanks dat er geen gunstige effecten van celtherapie werden gevonden op het herstel na een acuut hartinfarct in de studies beschreven in dit proefschrift, blijft celtherapie een veelbelovende behandelingsmethode. Echter, verder preklinisch en klinisch onderzoek is nodig om de werkingsmechanismen te doorgronden en om de juiste keuzes te maken betreffende het celtyp, de isolatie- en toedieningsmethode, en het moment van toediening.

In dit proefschrift wordt een associatie gevonden tussen een hoog aantal circulerende klassieke monocyten in patiënten met een acuut hartinfarct en een verminderde myocardiale functie, die doet vermoeden dat een buitenproportionele mobilisatie van monocyten het herstel na een hartinfarct negatief beïnvloedt. Daarbij lijkt de milt te fungeren als een belangrijke bron voor deze monocyten. Toekomstig onderzoek zal moeten uitwijzen of de klassieke monocyten, die door het geïnfarceerde hartweefsel worden aangetrokken, het beschadigde hart beschermen of dat ze juist de schade aan het hart vergroten. Dit proefschrift laat een aantal interessante opties zien om de monocyten respons te moduleren; echter, aanvullend onderzoek is noodzakelijk, niet alleen om de effecten op het herstel na een acuut hartinfarct te onderzoeken, maar tevens de effecten op o.a. atherosclerose en arteriogenese.