

# Nederlandse samenvatting

## Inflammatie in hartziekten:

### De verbetering van diagnose en nieuwe therapieën

#### Hoofdstuk 1: Introductie

Hart- en vaatziekten zijn wereldwijd verantwoordelijk voor een belangrijk aantal doodsoorzaken. Zowel het hartinfarct, ofwel myocard infarct (MI), als een infectieuze ontsteking van de hartspier, ofwel lymfocyttaire myocarditis (LM), behoren tot deze doodsoorzaken. Ontsteking speelt als mechanisme een belangrijke rol bij zowel LM als bij MI. In dit proefschrift hebben wij de ontsteking bij LM en MI bestudeerd om de diagnostiek te verbeteren en om nieuwe therapieën te vinden.

In het algemeen wordt myocarditis gedefinieerd als een ontsteking (*itis*) van de hartspier (*myocardium*). De oorzaak van myocarditis kan een infectie zijn, bijvoorbeeld door virussen, bacteriën en schimmels, maar kan ook veroorzaakt worden door een auto-immuunreactie. In Europa wordt een infectieuze myocarditis meestal veroorzaakt door virussen. Door de grote diversiteit in klinische presentatie is het diagnosticeren van LM moeilijk. Bovendien is er tot op heden geen specifieke therapie voor LM. Het is daarom belangrijk beter te begrijpen hoe LM ontstaat zodat er adequatere diagnostische hulpmiddelen en mogelijk nieuwe therapieën ontwikkeld kunnen worden.

Een MI is meestal het gevolg van een obstructie van de kransslagader die het hart van zuurstofrijk bloed voorziet. Dergelijke obstructies kunnen het gevolg zijn van een zogenaamde erosie, ontsteking en/of ruptuur van de atherosclerotische plaque met als gevolg dat zich in de kransslagader een bloedstolsel ontwikkelt. De klinische presentatie van MI is duidelijker dan bij LM. De diagnose van MI is gebaseerd op specifieke veranderingen van electrocardiogram, biomarkers, echocardiogram en angiogram. Hoewel de behandeling van MI de afgelopen jaren aanzienlijk is verbeterd, is er nog steeds vraag naar therapieën om het verlies van hartweefsel te voorkomen en hartspier regeneratie te verbeteren.

#### Hoofdstuk 2: Voor de diagnose van lymfocyttaire myocarditis is CD45 gevoeliger dan CD3

De gouden standaard om LM te diagnosticeren is pathologische onderzoek van endomyocard (hart) bipten. In deze hartbipten kunnen middels immunohistochemie verschillende ontstekingscellen aangetoond worden. Om LM te diagnosticeren met behulp van deze immunohistochemische kleuringen zijn duidelijke richtlijnen opgesteld; in het endomyocard bipt dienen  $\geq 14$  ontstekingscellen per  $\text{mm}^2$  aanwezig te zijn, bestaande uit  $\geq 7$  (CD3 positieve) T-lymfocyten en maximaal 4 macrofagen. Onze hypothese was dat de ontstekingsmarker CD45 veel beter LM kon diagnosticeren dan CD3. In harten van muizen met virus geïnduceerde myocarditis hebben wij met behulp van de richtlijn van  $\geq 14$  ontstekingscellen per  $\text{mm}^2$  gevonden dat zich slechts 33% classificeerde voor de diagnose LM bij het gebruik van de CD3 T-lymfocyt marker, en 89% bij het gebruik van de CD45 lymfocyt marker. Ook in humaan obductie materiaal van overleden patiënten met bewezen LM vonden wij dat de diagnose van LM met behulp van de  $\geq 14$  ontstekingscellen per  $\text{mm}^2$  richtlijn, in het bipteergebied verhoogd kon worden van 17% naar 50% bij het gebruik maken van CD45 in plaats van CD3. Het gebruik van de CD45 lymfocyt marker verhoogt

dus de gevoeligheid van de diagnose van LM. Daarnaast vonden wij ook meer ontstekingscellen in het biopteergebied dan in de resterende hartweefsel, suggererend dat het biopteergebied inderdaad de hoogste trefkans heeft om LM te diagnosticeren.

### **Hoofdstuk 3: Infiltratie van ontstekingscellen in de bovenbeen dijspier bij mensen met lymfocyttaire myocarditis: een potentiële nieuwe diagnostische methode**

Zoals boven beschreven is de gouden standaard om LM te diagnosticeren het afnemen van endomyocard (hart) biopten. Aangezien dit kleine biopten zijn is er een kans dat de ontsteking zich niet in het hartbiopt bevindt. Bovendien is het afnemen van een hartbiopt niet geheel zonder risico, aangezien er een kleine kans is op potentieel ernstige complicaties, zoals hartspierperforatie en schade aan de hartkleppen. Dit alles maakt dat nieuwe diagnostische methodes nodig zijn voor het verbeteren van de diagnose van LM. Van andere hartziekten is bekend dat veranderingen in de hartspier soms ook in andere spieren terug te vinden zijn. In dit hoofdstuk is onderzocht of het aantonen van ontstekingscellen in de bovenbeen dijspier een potentiële nieuwe methode is om LM te diagnosticeren. In obductie materiaal van patiënten met bewezen LM en van gezonde controles zijn verschillende ontstekingscellen gekwantificeerd in de bovenbeen dijspier. Ten opzichte van de controles bevonden zich in de patiënten met LM aanzienlijk meer lymfocyten. Het aantal lymfocyten in de bovenbeen dijspier kon LM diagnosticeren met een specificiteit van 100% en een gevoeligheid van 71%. Deze studie toont duidelijk aan dat immunohistochemie op biopten van de bovenbeen dijspier een potentiële nieuwe methode is om LM te diagnosticeren.

### **Hoofdstuk 4: Colchicine verergert coxsackievirus B3 infectie in muizen**

Momenteel is er geen specifieke therapie voor patiënten met LM. Indien LM patiënten een verminderde hartfunctie hebben worden ze vaak behandeld met ondersteunde medicijnen voor de stabilisatie van het hartfalen. Hoewel dit nuttig is om de symptomen te onderdrukken en de hartfunctie te verbeteren, behandelen ze niet specifiek de onderliggende oorzaak (de LM). Er is dus een klinische noodzaak om effectieve therapieën te vinden om LM te behandelen. In dit hoofdstuk is onderzocht of het immunosuppressieve geneesmiddel colchicine, dat veelal gebruikt wordt bij patiënten met pericarditis (ontsteking van de buitenkant van het hart), gebruikt kan worden bij LM. Hiervoor hebben wij muizen met coxsackievirus B3 geïnduceerde myocarditis behandeld met colchicine. Wij vonden dat colchicine therapie ernstige ziekteverschijnselen vertoonden, zoals gewichtsverlies, inactiviteit en in sommige gevallen zelfs leidend tot de dood. Uit weefselonderzoek bleek dat colchicine therapie in de alveesklier resulteerde in de vernietiging van de acini, waardoor de muizen hoogstwaarschijnlijk deze ernstige ziekteverschijnselen ontwikkelden. Daarnaast zagen wij in het hart dat colchicine behandeling resulteerde in een verhoging van het aantal neutrofielen en verlaging van het aantal macrofagen. Tevens bleek dat colchicine in tegenstelling tot de placebo behandeling in muizen met coxsackievirus B3 geïnduceerde myocarditis, leidde tot verhoging van het coxsackievirus B3 level in zowel het hart als de alveesklier.

### **Hoofdstuk 5: Lymfocyttaire myocarditis treedt gelijktijdig op met een hartinfarct en gaat gepaard met verhoogde ontsteking, bloeding en instabiliteit van de atherosclerotische plaques in de kransslagader**

Patiënten met LM kunnen ook klinische symptomen hebben die passen bij MI. In de praktijk wordt LM alleen beschouwd als mogelijke oorzaak van infarctklachten wanneer MI is uitgesloten op basis van afwezigheid van een obstructie in de kransslagaders. De algemene consensus is dat hoewel LM en MI vergelijkbare klinische symptomen kunnen hebben, ze beschouwd worden als afzonderlijke ziektebeelden. In dit hoofdstuk hebben wij in obductie patiënten met een recente MI aangetoond dat er een hoge prevalentie is (32%) van patiënten die gelijktijdig een LM vertonen. Om te onderzoeken of LM invloed heeft op atherosclerotische plaques is gekeken naar ontsteking en stabiliteit van de atherosclerotische plaques in de kransslagaders van patiënten met LM en/of recente MI. In kransslagaders van patiënten met alleen LM of MI was een toename te zien van macrofagen en neutrofielen ten opzichte van controle patiënten, terwijl in patiënten met zowel LM als MI of alleen MI, een toename te zien was van lymfocyten en mastcellen. Bovendien hadden patiënten met zowel LM en MI, als met alleen MI een toename van het aantal onstabiele plaques en bloedstolsels. Ten slotte hadden patiënten met LM een verhoogd aantal plaque bloedingen ten opzichte van controles en hadden patiënten met MI, al dan niet gepaard met LM, nog een groter aantal plaque bloedingen. Deze studie toont dus aan dat LM gelijktijdig met MI kan optreden en dat LM kan leiden tot ontsteking en veranderingen in de atherosclerotische plaque.

### **Hoofdstuk 6: Infectieuze myocarditis: de rol van het vaatstelsel in het hart**

In dit hoofdstuk hebben wij de bestaande literatuur gereviewd met betrekking tot de rol van infectieuze myocarditis op de vaten van het hart. Allereerst hebben we beschreven dat de bloedvaten van het hart, zowel de kleine bloedvaten als de grote kransslagaders, een belangrijke rol spelen in de pathogenese van infectieuze myocarditis. Zo zijn endotheelcellen, die de binnenste bekleding vormen van de hartvaten, het directe doelwit voor infectie. Daarnaast spelen de bloedvaten door middel van de expressie van adhesiemoleculen een rol bij de vorming van de cellulaire immuunrespons bij infectieuze myocarditis. Bovendien wordt de schade en disfunctie van vaten in het hart geassocieerd met de vorming van bloedstolsels en vasospasmen in de kransslagaders. Deze kunnen op hun beurt leiden tot perfusie problemen en zelfs MI.

### **Hoofdstuk 7: De ontwikkeling van een nieuwe therapeutische techniek om stamcellen naar het geïnfarceerde hart te sturen met behulp van microbellen: StemBells**

Stamceltherapie wordt gezien als een veelbelovende therapie voor weefsel regeneratie om de ontwikkeling van hartfalen na een MI te voorkomen. Eén van de belangrijkste belemmeringen van stamceltherapie is het lage percentage stamcellen dat het infarctgebied bereikt en daar weet te overleven. Om dit probleem te verhelpen hebben wij een nieuwe techniek ontwikkeld waarbij vetstamcellen gekoppeld worden aan gelabelde microbellen ofwel 'StemBells'. Microbellen zijn kleine gasbelletjes die oorspronkelijk zijn ontwikkeld als contrastmiddel voor echocardiografie. De microbellen werden in dit onderzoek gelabeld met een antilichaam dat ervoor zorgt dat ze hechten aan CD90 marker op de stamcellen. Daarnaast werden de microbellen gelabeld met een ICAM-1 antilichaam. ICAM-1 komt tot expressie in het infarctgebied, waardoor de StemBells theoretisch gestuurd kunnen worden

naar het infarctgebied. Om het therapeutische effect van StemBells te onderzoeken zijn ratten 7 dagen na een MI geïnjecteerd met StemBells. Het bleek mogelijk om StemBells veilig te injecteren. Bovendien werden ze in kleine hoeveelheden teruggevonden in het infarctgebied. Met behulp van echocardiografie zagen wij dat StemBell therapie op langere termijn (5 weken na therapie) een betere hartfunctie induceerde. StemBell therapie had geen effect op de infarctgrootte noch op het aantal pro- en anti-inflammatoire macrofagen in het infarctgebied. Deze studie toont aan dat de StemBell techniek een nieuwe methode is om de hartfunctie na MI te verbeteren.

### **Hoofdstuk 8: Analyse van het effect van toediening van StemBells op verschillende tijdstippen in een rat model met een acuut hartinfarct**

StemBell therapie is een nieuwe therapie om de hartfunctie na MI te verbeteren (zie hoofdstuk 7). Als gevolg van een MI ontstaat in het hart celdood en ontsteking. Deze ontstekingsreactie is gunstig aangezien ontstekingscellen de dode cellen verwijderen uit het infarctgebied zodat het hart kan herstellen. Dit zou echter ongunstig kunnen zijn voor de overlevingskans van stamcellen die het infarctgebied binnentreden. Daarom is in eerste instantie gekozen om StemBell therapie te geven 7 dagen na MI. Echter aangezien er binnen 7 dagen na MI al veel schade is opgetreden, is er eventueel nog meer ruimte voor verbetering. Daarom hebben wij onderzocht wat het verschil in effect is van StemBell therapie 1 en 7 dagen na MI in ratten. Met behulp van echocardiografie zagen wij dat StemBell therapie 1 dag na MI zorgde voor een verbeterde hartfunctie één week na MI. Echter, was 6 weken na MI geen verschil in hartfunctie tussen de twee tijdstippen van StemBell toediening. Ook was er geen verschil in infarctgrootte en het aantal ontstekingsremmende en -stimulerende macrofagen in het infarctgebied tussen de verschillende tijdstippen van StemBell therapie. StemBell therapie leidt dus onafhankelijk van het tijdstip van toediening tot langdurige verbetering van de hartfunctie en kan worden toegepast op zowel 1 of 7 dagen na MI.

### **Hoofdstuk 9: StemBell therapie verbetert atherosclerose na een hartinfarct**

Het is bekend dat na een MI de atherosclerotische plaque sneller groeit en de hoeveelheid ontsteking (voornamelijk bestaande uit macrofagen) in de plaque toeneemt, hetgeen kan resulteren in een destabilisatie van de plaque. Theoretisch is stamceltherapie een therapeutische optie bij atherosclerose. In dit hoofdstuk hebben wij onderzocht of StemBell therapie na MI effect heeft op atherosclerose. Hiervoor kregen muizen met atherosclerose StemBell of placebo therapie 6 dagen na MI. Vergeleken met de placebo groep had StemBell therapie vier weken na MI gezorgd voor een dikkere (stevigere) buiten laag van de plaque en er bevonden zich minder macrofagen in de plaque. Daarnaast bevonden zich in de atherosclerotische plaque, maar ook in het infarctgebied en zelfs in de bloedbaan in verhouding meer ontstekingsremmende dan -stimulerende macrofagen/monocyten, wat kan wijzen op een versnelde genezing na MI. Bovendien vonden wij dat het effect van StemBells op atherosclerose onafhankelijk was van cholesterol en triglyceriden, aangezien deze spiegels gelijk waren in het bloed. Daarnaast had StemBell therapie geen invloed op infarctgrootte en hartfunctie, maar aangezien StemBell therapie wel zorgde voor meer ontstekingsremmende macrofagen in het weefsel en een trend naar meer monocyten in het bloed wat kan wijzen op een systemisch effect. StemBell therapie na MI in

atherosclerotische muizen heeft dus niet alleen een positief resultaat op de ontwikkeling van de atherosclerotische plaque, maar ook op de ontsteking in het infarctgebied.

### **Hoofdstuk 10: Conclusies**

In dit proefschrift hebben wij de rol van ontsteking in LM en MI bestudeerd om zowel diagnostische als therapeutische opties te verbeteren.

In LM hebben wij gevonden dat de verhoogde ontsteking zich niet beperkt tot het hart, maar ook kan worden teruggevonden in de atherosclerotische plaques van kransslagaders en zelfs in de bovenbeen dijspier. De verhoogde ontsteking in de bovenbeen dijspier is derhalve een potentiële nieuwe diagnostische optie voor het aantonen van LM. Bovendien kan de immunohistologische diagnose van LM worden verbeterd door het aantal CD45 positieve cellen te kwantificeren in het hart, aangezien wij hebben ontdekt dat het ontstekingsinfiltraat van het hart vooral bestaat uit CD45 lymfocyten in plaats van CD3 positieve lymfocyten. Daarnaast hebben we aangetoond dat LM gelijktijdig kan optreden met MI en dat LM, via destabilisatie van de atherosclerotische plaque, de ontwikkeling van MI kan vergemakkelijken.

Na een hartinfarct ontstaat een ontstekingsreactie in het hart en in de atherosclerotische plaque van de kransslagaders. Wij hebben een zogenaamde StemBell techniek ontwikkeld die niet alleen de ontsteking verbetert in de atherosclerotische plaque en in het infarctgebied, maar die ook de hartfunctie verbetert. Derhalve is StemBell therapie een veelbelovende therapie na een hartinfarct.