

Non-invasive assessment of cardiovascular disease : a study of atherosclerotic lesions using biomarkers and MRI

Citation for published version (APA):

Lobbes, M. B. I. (2009). *Non-invasive assessment of cardiovascular disease : a study of atherosclerotic lesions using biomarkers and MRI*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. University Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20090923ml>

Document status and date:

Published: 01/01/2009

DOI:

[10.26481/dis.20090923ml](https://doi.org/10.26481/dis.20090923ml)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Atherosclerosis remains one of the leading causes of death in industrialized countries. It is characterized by the accumulation of lipid and inflammatory components in the vessel wall which results in the formation of atherosclerotic plaques. Clinical events, such as myocardial infarction, angina pectoris, and stroke, are mainly the result of either progressive stenosis or rupture of these plaques.

In order to identify patients at high risk for future cardiovascular events, several risk models, such as MONICA or Framingham, have been developed. These models are based on well-known cardiovascular risk factors. However, they do not include new and emerging risk factors of cardiovascular disease (e.g. biomarkers) and they do not assess the risk of plaque rupture. Therefore, these models are able to assess long-term outcome of a certain population, but fail to assess the individual's near-future risk of developing cardiovascular complications.

A panel of experts lead by Naghavi devised a speculative roadmap, in which patients with high risk of developing near-future cardiovascular events (the 'vulnerable' patients) can be identified. This roadmap emphasized the need for the development of non-invasive, inexpensive and accurate screening tools. In the present thesis, we focused mainly on two aspects of this roadmap, namely non-invasive risk assessment (i.e. validation of (potential) biomarkers) and contrast-enhanced magnetic resonance imaging of atherosclerotic plaques.

Validation of established biomarkers for cardiovascular disease

In chapter 2, a systematic review of available literature was performed to assess the predictive value of sCD40L, IL-6, and oxLDL compared to more established biomarkers such as CRP and fibrinogen. SCD40L, IL-6, and oxLDL have all proven to be major players in atherogenesis and recent publications demonstrated their potential as biomarkers for predicting future cardiovascular events. In this review, we demonstrated that sCD40L, IL-6, and oxLDL had comparable relative risk estimates for cardiovascular disease when compared with CRP and fibrinogen (relative risk estimates in the order of 1.4). One of the drawbacks were the heterogeneous study designs of the evaluated literature, which hampered data pooling of the different studies. Finally, we suggested that future studies should have more homogenous study designs in order to enable data pooling and we emphasized the need of a multi-marker approach (in which a certain 'panel' of biomarkers is investigated for its predictive value in cardiovascular disease) in order to combine the strength of multiple biomarkers.

Validation of new and emerging biomarkers for cardiovascular disease

In chapter 3, we evaluated the new cardiovascular biomarkers MPO and PAPP-A in a cohort of 120 patients divided in patients with acute myocardial infarction, stable angina pectoris, unstable angina pectoris, and healthy controls. The prognostic value of these new markers was compared with the well-validated biomarkers leukocyte counts, fibrinogen, and CRP. Additional analysis of these biomarkers was performed after 6 months of follow-up. Compared to controls, leukocyte counts and serum concentrations of fibrinogen, CRP, PAPP-A (tested with an ultrasensitive research kit), and MPO were significantly increased in patients with acute myocardial infarction. Leukocyte counts and serum concentrations of MPO were also significantly increased in patients with unstable angina pectoris compared with controls. Serum concentrations of PAPP-A did not differ between study groups when the regular PAPP-A ELISA kit was used. The commercially available kits used to determine PAPP-A concentrations do not assess the serum concentrations of PAPP-A uncomplexed with proMBP, which is the subform of PAPP-A that is specific for atherosclerotic disease. They only assess the total amount of PAPP-A. The research ELISA kit for the detection of PAPP-A uses a monoclonal antibody specific for the PAPP-A uncomplexed with proMBP, whereas the regular PAPP-A kit uses a polyclonal, non-specific antibody. An additional discriminant analysis showed that leukocyte counts, MPO, and PAPP-A discriminated best between study groups. After six months, leukocyte counts and MPO were still increased in patient with acute myocardial infarction compared with controls.

Contrast-enhanced magnetic resonance imaging of rabbit aortic atherosclerosis with the albumin-binding contrast agent gadofosveset

In chapter 4, we demonstrated the potential of the albumin-binding contrast agent gadofosveset for the depiction of atherosclerotic vessels with MRI. In this study, gadofosveset (0.05 mmol/kg) was compared with (the clinically widely available) Gd-DTPA (0.5 mmol/kg) in both atherosclerotic and normal rabbit aortas. The dose was adjusted for the higher r_1 relaxivity of gadofosveset. After the final MRI experiments, rabbits were sacrificed and the aorta was harvested. The acquired samples were subsequently HE stained, and immunohistochemically stained for the presence of microvessels and albumin. In addition, PIXE analysis was performed to analyze the concentration and distribution of gadolinium within the vessel walls. In this study, we demonstrated that gadofosveset resulted in a significantly higher signal enhancement in the MR images of the atherosclerotic vessel wall when compared with controls. There was no significant difference in vessel wall signal enhancement of atherosclerotic and normal rabbits receiving Gd-DTPA. Immunohistochemical staining for microvessels and albumin showed increased amount of micro-vessels and albumin content in atherosclerotic rabbits when compared with control animals. PIXE analysis showed that equal amounts of gadolinium were present in atherosclerotic and control rabbits receiving gadofosveset. We hypothesized that binding of gadofosveset to intraplaque albumin resulted in more signal enhancement of atherosclerotic vessels. An equal amount of gadolinium was found in atherosclerotic and control rabbits receiving Gd-DTPA. In addition, when corrected for the higher dose of Gd-DTPA, the gadolinium content of the vessel walls were comparable to the gadofosveset groups. Furthermore, we found a significant positive correlation between MR signal enhancement and both increased microvessel density and intraplaque albumin content. These findings suggested that gadofosveset-enhanced MR imaging of atherosclerosis might have potential for imaging of human atherosclerotic vessel walls.

Contrast-enhanced magnetic resonance imaging of human carotid atherosclerosis with the albumin-binding contrast agent gadofosveset

In chapter 5, we demonstrated that patients scheduled for carotid endarterectomy (CEA) showed variable signal enhancement of the carotid artery plaque 24 hours after administration of

gadofosveset. A subanalysis performed on these data revealed a significantly larger MR signal enhancement in symptomatic patients when compared with asymptomatic patients. Histological analysis of carotid artery plaques removed during subsequent CEA showed no correlation between MR signal enhancement and various plaque components. In addition, no correlation between MR signal enhancement and intraplaque microvessel density was observed. Since the adventitia is not removed during CEA the adventitial microvessel density could not be assessed. Nonetheless, there was a significant correlation between MR signal enhancement and intraplaque albumin content, suggesting that the increased amount of intraplaque albumin, probably resulting from influx via (leaky) adventitial or intraplaque microvessels can possibly explain these findings.

General discussion

In chapter 6, the results of this thesis are discussed with respect to the current available literature on biomarkers of cardiovascular disease and non-invasive imaging of atherosclerotic lesions. Future applications and developments in these fields of research are additionally discussed.

Conclusion and outlook

In this thesis, we demonstrated that established biomarkers for cardiovascular disease (such as CRP, fibrinogen, sCD40L, IL-6, and oxLDL) have low to moderate relative risk estimates for predicting future cardiovascular events. Of the biomarkers tested in this thesis, we demonstrated that MPO, PAPP-A, and leukocyte counts have the most potential in predicting future cardiovascular complications. In future studies, there is a clear need for comparable study designs in order to pool available data on biomarkers in large meta-analyses, and we recommend a multi-marker approach for predicting cardiovascular disease.

In addition, this thesis showed that the albumin-binding contrast agent gadofosveset has high potential in MRI of atherosclerosis, since initial results showed that it was able to distinguish between atherosclerotic and normal rabbit vessel wall, and symptomatic and asymptomatic patients with significant carotid artery stenosis. We believe that plaque imaging applications of gadofosveset hold great potential. Future studies should investigate the possibility to identify patients at risk for future cardiovascular events (such as stroke) by using gadofosveset-enhanced MR imaging, especially in patients with 30-69% carotid stenosis who are not scheduled for carotid surgery.

The clinical values of biomarkers of cardiovascular disease still need to be investigated in large clinical trials. Both research on these biomarkers and non-invasive magnetic resonance imaging of atherosclerosis are still in their formative years. New technological improvements are continuously introduced, leading to more biomarkers becoming available and more sophisticated methods of imaging the atherosclerotic disease process. Hopefully, in the future this will lead to improved assessment of the individual's risk of developing cardiovascular complications and will aid in the identification of individuals at risk in the general population.

Nederlandse samenvatting (Dutch summary)

Atherosclerose ('aderverkalking') is één van de belangrijkste doodsoorzaken in geïndustrialiseerde landen. De aandoening wordt gekenmerkt door een opeenhoping van vetten en ontstekingscellen in de wanden van slagaders, wat na verloop van tijd resulteert in de ontwikkeling van een zogenaamde atherosclerotische plaque. Klinische complicaties van atherosclerose, zoals bijvoorbeeld een hartinfarct, angina pectoris (pijn op de borst in rust of bij inspanning) of een beroerte, zijn voornamelijk het gevolg van een toenemende vernauwing van de bloedvaten en/of het scheuren van de plaques.

Verscheidene risicomodellen, zoals die bijvoorbeeld in de MONICA of Framingham studie beschreven zijn, werden in het verleden ontwikkeld om individuen met een groot risico op het krijgen van hart- en vaatziekten te kunnen identificeren. Deze modellen zijn voornamelijk gebaseerd op reeds bekende risicofactoren. Zij maken echter geen gebruik van recent ontdekte risicofactoren voor hart- en vaatziekten (bijvoorbeeld op basis van bloedmonsters door meting van bepaalde moleculen, zogenaamde biomarkers, waarmee men progressie van een bepaalde ziekte of het effect van behandeling ervan kan evalueren) en zij geven geen inschatting van het risico van het scheuren van een individuele plaque. Deze modellen kunnen daarom de uitkomst van een bepaalde groep mensen op de lange termijn inschatten, maar zij zeggen niets over het korte-termijn risico op hart- en vaatziekten van een bepaald individu.

Een aantal experts onder leiding van Naghavi stelde daarom een speculatieve beslisboom op, waarmee patiënten met een hoog risico op het ontwikkelen van hart- en vaatziekten in de nabije toekomst kunnen worden geïdentificeerd. Zij benadrukten de noodzaak voor de ontwikkeling van niet-invasieve, goedkope en nauwkeurige screeningsmethoden. In dit proefschrift wordt ingegaan op twee aspecten van deze beslisboom, namelijk de validiteit van potentiële biomarkers ten behoeve van niet-invasieve risico-inschatting en contrast-versterkte magnetische resonantie beeldvorming van atherosclerotische plaques.

Validatie van bekende biomarkers voor hart- en vaatziekten

In hoofdstuk 2 werd een systematisch overzicht gegeven van de voorspellende waarde van verschillende biomarkers (sCD40L, IL-6 en oxLDL) met betrekking tot hart- en vaatziekten. Deze biomarkers werden vergeleken met reeds uitgebreid onderzochte biomarkers zoals CRP en fibrinogeen. Van sCD40L, IL-6 en oxLDL is bekend dat zij een belangrijke rol spelen in de ontwikkeling van atherosclerotische plaques en de bijbehorende complicaties. Recente publicaties met betrekking tot deze biomarkers toonden hun potentieel als biomarker voor de voorspelling van het optreden van hart- en vaatziekten reeds aan. In dit hoofdstuk toonden wij bovendien aan dat

sCD40L, IL-6 en oxLDL een vergelijkbare relatieve risico-inschatting hadden voor hart- en vaatziekten als CRP en fibrinogeen (relatieve risico-inschatting in de grootte van 1.4). Omdat één van de tekortkomingen van de beschreven publicaties de diversiteit van de studieopzet was, wat de bundeling van data van de verschillende studies verhinderde, stelden wij voor dat toekomstige studies een meer homogene opzet dienden te hebben om bundeling van data wel mogelijk te maken. We benadrukten ook de noodzaak van een ‘multimarker’ benadering (waarin de voorspellende waarde voor hart- en vaatziekten van een bepaalde combinatie van biomarkers wordt onderzocht) om zodoende de kracht van meerdere biomarkers te kunnen bundelen.

Validatie van nieuwe biomarkers voor hart- en vaatziekten

In hoofdstuk 3 onderzochten wij de nieuwe cardiovasculaire biomarkers MPO en PAPP-A in een groep van 120 personen, onderverdeeld in patiënten met een acuut hartinfarct, stabiele angina pectoris, instabiele angina pectoris en gezonde vrijwilligers. Het potentieel als biomarker voor hart- en vaatziekten van deze nieuwe biomarkers werd in deze studie vergeleken met reeds gevestigde biomarkers zoals leukocyten, CRP en fibrinogeen. De concentraties van deze biomarkers werden ook gemeten na 6 maanden follow-up. In vergelijking tot de gezonde controlepersonen, hadden patiënten met een acuut hartinfarct significant hogere concentraties leukocyten, fibrinogeen, CRP, PAPP-A en MPO in hun bloed. De concentraties leukocyten en MPO waren tevens significant verhoogd bij patiënten met instabiele angina pectoris (vergeleken met de gezonde vrijwilligers). Wanneer de reguliere PAPP-A ELISA meetmethode werd gebruikt voor de analyses, kon geen verschil in PAPP-A-concentraties worden aangetoond tussen de verschillende groepen. De commercieel verkrijgbare meetmethoden voor het bepalen van PAPP-A-concentraties bepalen de totale concentratie PAPP-A, niet alleen de concentratie van PAPP-A die geen complex vormt met een eiwit in het bloed, het proMBP. Deze laatste vorm is juist de subvorm van PAPP-A die specifiek is voor atherosclerose. De meeste gangbare commerciële meetmethoden bepalen enkel de totale concentratie van PAPP-A in het bloed. Een recent ontwikkelde nieuwe aanpassing in de methode om PAPP-A te bepalen, meet specifiek het PAPP-A dat geen complex vormt met proMBP. Dit in tegenstelling tot de reguliere PAPP-A meetmethoden, die de *totale* concentratie PAPP-A bepalen. Een aanvullende statistische analyse toonde verder aan dat het onderscheid tussen de verschillende studiegroepen het best gemaakt werd met behulp van concentraties van leukocyten, MPO en PAPP-A. Na zes maanden waren de concentraties van leukocyten en MPO nog steeds verhoogd bij patiënten met een acuut hartinfarct (vergeleken met gezonde controlepersonen).

Contrast-versterkte mri van atherosclerose in konijnaorta's met behulp van gadofosveset

In hoofdstuk 4 onderzochten wij het potentieel van het albumine-bindende contrastmiddel gadofosveset voor de analyse van atherosclerotische bloedvaten met behulp van magnetische resonantie beeldvorming (MRI). In deze studie maakten wij gebruik van konijnen die atherosclerotische plaques ontwikkelden in hun lichaamslagader (aorta) en konijnen die geen atherosclerose ontwikkelden. Na binding van gadofosveset aan albumine, het meest voorkomende eiwit in de bloedbaan, neemt de relaxiviteit van dit contrastmiddel toe, resulterend in een hogere signaalintensiteit op magnetische resonantie afbeeldingen. In deze studie werd gadofosveset (0.05 mmol/kg) vergeleken met (het in de kliniek veel gebruikte contrastmiddel) Gd-DTPA (0.5 mmol/kg) in zowel atherosclerotische als gezonde konijnaorta's. De dosis van gadofosveset was aanzienlijk lager om te corrigeren voor de hogere relaxiviteit van gadofosveset. Na de laatste MRI-experimenten werden de konijnen opgeofferd en werden de aorta's verzameld. De verkregen monsters werden vervolgens hematoxyline/eosine gekleurd om de verschillende plaquecomponenten te kunnen onderscheiden. Aanvullend werd zij de aanwezigheid van microvaten en albumine vastgesteld. Bovendien werd er een ‘proton induced x-ray emission’ (PIXE) analyse uitgevoerd om de concentratie en distributie van gadolinium (wat zowel in gadofosveset als in Gd-DTPA voorkomt) in de bloedvatwanden te kunnen vaststellen. Na toediening van gadofosveset werd in deze studie een

significant hogere signaalversterking gezien op de MR-afbeeldingen van atherosclerotische vaatwanden vergeleken met de gezonde vaatwanden. Er was geen verschil tussen de signaalversterking van atherosclerotische en gezonde vaatwanden na toediening van Gd-DTPA. Het bleek dat het aantal microvaatjes en de hoeveelheid albumine in de plaque groter was in de vaatwanden van atherosclerotische konijnen vergeleken met gezonde dieren. PIXE-analyse toonde aan dat vergelijkbare hoeveelheden gadolinium aanwezig waren in atherosclerotische en gezonde dieren die gadofosveset kregen. Daarom concludeerden wij dat binding van gadofosveset aan albumine in de plaque waarschijnlijk de oorzaak is van de hogere signaalversterking van de atherosclerotische vaatwanden. Ook de hoeveelheid in de vaatwand aanwezig gadolinium in dieren die Gd-DTPA kregen, verschilde niet tussen de atherosclerotische en gezonde dieren. De hoeveelheden gadolinium in deze groepen waren bovendien vergelijkbaar met de hoeveelheden die waargenomen werden in de groepen die gadofosveset kregen (na correctie van de hogere dosering van Gd-DTPA). In deze studie vonden wij bovendien een significant positieve correlatie tussen de MR-signaalversterking in de vaatwanden en zowel de dichtheid van de microvaatjes als de hoeveelheid albumine in de plaque. Deze bevindingen suggereren dat gadofosveset-versterkte magnetische resonantie beeldvorming van atherosclerose veelbelovend is bij het afbeelden van humane atherosclerotische vaatwanden.

Contrast-versterkte mri van humane atherosclerose van de arteria carotis communis met behulp van het albumine-bindende contrastmiddel gadofosveset

In hoofdstuk 5 lieten wij zien dat 24 uur na toediening van gadofosveset patiënten die gepland stonden voor een endarterectomie (chirurgische verwijdering van de plaque in de halsslagader) van de arteria carotis communis (de halsslagader) een variabele MR-signaalversterking vertoonden van de plaque. Een subanalyse toonde aan dat symptomatische patiënten (patiënten die recent kortdurende neurologische uitval of een beroerte hebben ondervonden) een significant hogere MR-signaalversterking van de plaque lieten zien dan asymptomatische patiënten (patiënten die geen neurologische uitval hebben ondervonden in hun voorgeschiedenis). Histologische analyse van de plaques van de halsslagader (verwijderd tijdens de operatie) lieten geen correlatie zien tussen MR-signaalversterking en de verschillende weefselcomponenten in de plaque. Bovendien werd er geen correlatie aangetoond tussen MR-signaalversterking en dichtheid van de microvaatjes in de plaque. Desalniettemin werd er een significante correlatie aangetoond tussen MR-signaalversterking en de hoeveelheid albumine in de plaque. Dit suggereerde dat de toegenomen hoeveelheid albumine in de plaque (waarschijnlijk als gevolg van een verhoogde instroming via (lekkende) adventitiële microvaatjes) deze bevindingen mogelijk zou kunnen verklaren. De adventitia is het buitenste deel van de halsslagader dat niet verwijderd wordt tijdens de operatie. De correlatie tussen MR-signaalversterking en de dichtheid van de adventitiële microvaatjes kon daarom niet worden onderzocht.

Algemene discussie

In hoofdstuk 6 werden de resultaten van dit proefschrift besproken in relatie tot de huidige beschikbare literatuur over biomarkers van cardiovasculaire aandoeningen en niet-invasieve beeldvorming van atherosclerotische plaques. Toekomstige toepassingen en ontwikkelingen in deze onderzoeksgebieden werden besproken in dit hoofdstuk.

Conclusie en beschouwing

In dit proefschrift toonden wij aan dat de gevalideerde biomarkers voor hart- en vaatziekten (zoals CRP, fibrinogeen, sCD40L, IL-6 en oxLDL) een lage tot gemiddelde relatieve risico-inschatting geven bij de voorspelling van toekomstige cardiovasculaire complicaties. Van alle biomarkers die getest

werden in het kader van dit proefschrift, hadden MPO, PAPP-A en leukocyten de grootste potentie om toekomstige cardiovasculaire complicaties te voorspellen. Er is een duidelijke noodzaak om in toekomstige studies een homogene studieopzet te gebruiken, zodat de beschikbare data uit deze studies gebundeld kunnen worden in grote meta-analyses. Bovendien bevelen wij een multimarkerbenadering voor de voorspelling van hart- en vaatziekten aan.

Dit proefschrift toonde ook aan dat het albumine-bindende contrastmiddel gadofosveset een groot potentieel heeft bij de magnetische resonantie beeldvorming van atherosclerose. Initiële resultaten laten zien dat gadofosveset in staat was om onderscheid te maken tussen atherosclerotische en gezonde bloedvatwanden van konijnenaorta's, en tussen symptomatische en asymptomatische patiënten met significante vernauwing van de halsslagader. Wij zijn van mening dat toepassing van gadofosveset in beeldvorming van plaques veelbelovend is. Toekomstige studies zouden de mogelijkheid om patiënten met een hoog risico op cardiovasculaire complicaties (zoals beroerte) te identificeren aan de hand van gadofosveset-versterkte magnetische resonantie beeldvorming moeten onderzoeken, met name in de groep patiënten met 30-69% vernauwing die volgens de huidige richtlijnen niet profiteren van een chirurgische ingreep.

De klinische waarde van biomarkers voor hart- en vaatziekten moet nog onderzocht worden in grote klinische trials. Zowel het onderzoek naar deze biomarkers als het onderzoek naar non-invasieve magnetische resonantie beeldvorming van atherosclerose staat nog in de kinderschoenen. Nieuwe technologische verbeteringen worden continu geïntroduceerd, wat leidt tot de beschikbaarheid van meer biomarkers en beter ontwikkelde methoden om het atherosclerotisch proces af te beelden. Hopelijk zullen deze ontwikkelingen in de toekomst leiden tot een verbeterde inschatting van het individuele risico voor de ontwikkeling van cardiovasculaire complicaties en zal het helpen bij de identificatie van individuen in de algemene populatie die een groot risico lopen op het krijgen van hart- en vaatziekten en die dan vervolgens preventief behandeld kunnen worden.