

Hypoxia in experimental atherosclerosis

Citation for published version (APA):

Marsch, E. (2016). *Hypoxia in experimental atherosclerosis: linking cellular oxygen sensors and cholesterol metabolism*. Maastricht University.

Document status and date:

Published: 01/01/2016

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
SAMENVATTING
ZUSAMMENFASSUNG

SUMMARY

Atherosclerosis is slowly progressing cholesterol-driven chronic inflammatory disease. It represents the underlying pathology of stroke and myocardial infarction and treatment nowadays mainly consists of surgical removal of the plaque, as well as risk factor management, e.g. serum cholesterol lowering as well as hypertension and diabetes management. A common feature of atherosclerotic plaques is hypoxia, a phenomenon that has been realized but never causally studied with respect to atherosclerotic plaque progression. In this dissertation, it was hypothesized that plaque hypoxia is causal to atherosclerotic disease progression.

First, the literature on hypoxia and inflammation in atherosclerosis was studied (**chapter 2**). Indeed, the presence of plaque hypoxia had been realized across species and hypoxia had mainly been studied with respect to macrophage function, inflammatory signaling and lipid handling *in vitro*.

In order to establish a causal relationship, two general approaches to reduce atherosclerotic plaque hypoxia were exploited in this dissertation, namely on the one hand enhancing oxygen availability and on the other hand reducing cellular oxygen consumption within the plaque.

In **chapter 3**, the onset and localization of plaque hypoxia in murine atherosclerosis was studied. Also the effect of increasing systemic oxygen availability by subjecting mice to carbogen gas (95% oxygen) breathing was investigated with respect to atherosclerosis development. Plaque hypoxia was found to be present in murine atherosclerotic plaques from plaque initiation on. Also, carbogen breathing actually reduced plaque hypoxia and decreased necrotic core expansion, likely by improving macrophage efferocytosis potential in the plaque. Thus, plaque hypoxia is reversible and affects atherosclerotic plaque development. Additionally, as even early plaques (fatty streaks) were hypoxic, oxygen consumption in the plaque rather than oxygen diffusion distance seemed to determine plaque oxygenation.

Next, the effect of reducing cellular oxygen consumption on plaque hypoxia was investigated. Dietary nitrate has been shown to improve mitochondrial respiration thus resulting in similar energy levels, with reduced oxygen consumption in skeletal muscle. Therefore, dietary nitrate supplementation was studied in atherosclerosis development and plaque hypoxia, presented in **chapter 4**. Prolonged dietary nitrate supplementation did not affect atherosclerotic disease burden or plaque hypoxia, nor did it exert obvious systemic side effects. While, short term dietary nitrate (2 weeks) increased plasma nitrate

and nitrite levels, this effect was no longer observed upon prolonged dietary nitrate supplementation (14 weeks). These data suggest a compensatory downregulation of plasma nitrate and nitrite levels upon prolonged dietary nitrate supplementation. Also, initial increases in nitrate and nitrite levels were not sufficient to affect atherosclerotic plaque burden or plaque hypoxia. No conclusions on a role of cellular oxygen consumption in plaque progression can be drawn from this model.

In **chapters 5 and 6**, cellular oxygen consumption was reduced by interfering with intracellular hypoxic signaling. Deficiency of prolyl-hydroxylases 1 (PHD1) has been shown to reduce cellular oxygen consumption, by switching cellular metabolism towards glycolysis. Indeed, PHD1 deficiency could reduce atherosclerotic plaque hypoxia (**chapter 5**). However, profound cholesterol-lowering seen in PHD1 deficient mice obscured potential effects of hypoxia on plaque progression. In turn, PHD3 did not alter atherosclerotic hypoxia (**chapter 6**) and neither of the models in **chapter 5 and 6** thus allow for solid conclusions on the causal contribution of cellular oxygen consumption to plaque progression. Overall, these data suggest a more modulatory function of plaque hypoxia, which is easily overruled by other atherogenic players.

In **chapter 5** the mechanism of plasma cholesterol-lowering by PHD1 deficiency was further investigated. Also the role of hematopoietic PHD1 deficiency as opposed to whole body PHD1 interference in atherosclerosis and cholesterol-lowering was studied. Cholesterol-lowering was mainly mediated by the stromal compartment lacking PHD1 and was shown to be mediated by enhanced cholesterol efflux in the feces by elevated trans-intestinal cholesterol efflux. The cholesterol-lowering seen seemed to be independent of downstream hypoxia-inducible factor stabilization.

In turn, whole body PHD3 deficiency slightly increased plasma cholesterol levels, as presented as initial findings in **chapter 6**. Additionally, hematopoietic PHD3 deficiency enhanced atherosclerotic disease burden and intra-plaque apoptosis, through a yet unknown mechanism. Whole body PHD3 deficiency in turn, did not alter atherogenesis. These two chapters demonstrated great diversity in PHD isoform effects on atherosclerotic plaque progression, hypoxia and lipid metabolism.

In **chapter 7**, the experimental findings of **chapters 2 to 6** and their implications were discussed. The studies presented in this dissertation suggest a modulatory role of plaque hypoxia in atherosclerotic disease progression. Other atherogenic factors, such as plasma cholesterol levels, clearly outrun potential hypoxia effects. Aside from hypoxia, the data showed PHD interference isoform- and cell type- specific effects on atherosclerosis

development, hypoxia and cholesterol metabolism. In contrast, PHD inhibition seemed to improve glucose tolerance, reduce adiposity and potentially even alleviated diabetes independent of the PHD isoform (**chapter 7**). In sight of general PHD inhibitors undergoing clinical trials, isoform-specific and cardiovascular effects need to be evaluated in those studies. Along those lines PHD1 isoform-specific inhibition might present a valuable and attractive strategy for atherosclerosis and cholesterol metabolism.

SAMENVATTING

Atherosclerose ontwikkelt zich onder invloed van verhoogde cholesterolwaarden in het bloed (hypercholesterolemie) en lokale, chronische ontstekingsreacties. Deze ziekte is de oorzaak van een beroerte of hartinfarct. De huidige behandeling bestaat uit het operatief verwijderen van de atherosclerotische plaque, en behandeling van risico factoren zoals verhoogde cholesterolwaarden, bloeddruk en suikerziekte (diabetes). Er is aangetoond dat atherosclerotische hypoxisch zijn, maar er is nog geen oorzakelijk verband aangetoond met de ontwikkeling van de atherosclerotische plaque. In dit proefschrift is de hypothese onderzocht of plaque hypoxie causaal gerelateerd is aan atherogenese.

Eerst is de literatuur over hypoxie en inflammatie bestudeerd (**hoofdstuk 2**). Deze literatuurstudie toonde aan dat de aanwezigheid van plaque hypoxie werd bevestigd in verschillende species. Hypoxie werd *in vitro* vooral bestudeerd in relatie tot macrofaag functie, de gevolgen van inflammatie en lipide metabolisme.

Om een causale relatie tussen hypoxie en atherogenese vast te stellen in dit proefschrift, werd op twee manieren plaque hypoxie verminderd. Enerzijds werd de beschikbaarheid van zuurstof verhoogd en anderzijds werd het zuurstof verbruik door cellen in de plaque verlaagd.

In **hoofdstuk 3** werd het tijdsverloop en de locatie van hypoxie in een muismodel voor atherosclerose bestudeerd. Plaque hypoxie werd gedetecteerd vanaf de eerste plaque ontwikkeling en voornamelijk aanwezig in plaque macrofagen. Aangezien zelfs vroege plaques hypoxisch waren, wordt de zuurstof status van de plaque waarschijnlijk bepaald door verhoogde zuurstofconsumptie en niet verlaagde zuurstoftoevoer. In dit hoofdstuk werd ook het effect van verhoogde systemische zuurstoftoevoer op atherogenese in de muis bestudeerd door muizen carbogeen gas met 95% zuurstof te laten inhaleren. Dit verminderde plaque hypoxie en de ontwikkeling van de necrotische kern, waarschijnlijk door de fagocytose van apoptotische cellen door plaque macrofagen te verbeteren. Plaque hypoxie is dus reversibel en oorzakelijk gerelateerd aan atherogenese in muizen.

Vervolgens werd het effect van verlaagde zuurstofverbruik op plaque hypoxie en atherosclerose bestudeerd. Er is aangetoond dat orale nitraat supplementatie de mitochondriale ademhalingsketen efficiënter maakt, wat resulteert in gelijke energie productie met een verminderde zuurstofconsumptie in skeletspieren. Het effect van orale nitraat supplementatie op atherogenese en plaque hypoxie werd dus bestudeerd in **hoofdstuk 4**. Langdurige supplementatie gedurende 14 weken leidde niet tot veranderingen in atherogenese en plaque hypoxie, noch tot systemische bijwerkingen.

Ondanks verhoogde plasma nitraat en nitrietwaarden na korte supplementatie gedurende de eerste 2 weken, waren deze waarden niet meer verhoogd na 14 weken. Deze data suggereren dat er een compensatie heeft plaatsgevonden wat leidde tot normalisatie van de verhoogde plasmawaarden tijdens langdurige supplementatie. Daarbij, was de initiële verhoging van nitraat en nitrietwaarden niet voldoende om atherogenese of plaque hypoxie te beïnvloeden. Er kan op basis van **hoofdstuk 4** dus geen conclusie getrokken worden over de rol van cellulair zuurstof verbruik in atherogenese.

In **hoofdstuk 5 en 6** werd het cellulair zuurstofverbruik verlaagd door interventies in de intracellulaire hypoxie signalering. Deficiëntie van prolyl-hydroxylase 1 (PHD1) is bewezen te leiden tot verlaagd cellulair zuurstof verbruik door energieproductie via zuurstof-besparende glycolyse te stimuleren in plaats van oxidatieve fosforylering. PHD1 deficiëntie in muizen verminderde inderdaad atherosclerotische plaque hypoxie (**hoofdstuk 5**), maar een verlaging van plasma cholesterol waarden maakte het onmogelijk om conclusie te trekken over de rol van alleen plaque hypoxie op atherogenese. PHD3 deficiëntie in muizen had geen effect op plaque hypoxie (**hoofdstuk 6**). Er kunnen dus geen betrouwbare conclusies getrokken worden over de oorzakelijke rol van cellulair zuurstofverbruik in atherogenese op basis van de modellen beschreven in **hoofdstuk 5 en 6**. Samenvattend, deze data suggereren dat plaque hypoxie een modulerende functie in atherogenese hebben, naast de causale rol van bekende primaire risicofactoren zoals hypercholesterolemie.

In **hoofdstuk 5** werd het mechanisme van de verlaagde plasma cholesterolwaarden door PHD1 deficiëntie verder bestudeerd. Ook werd de bijdrage van PHD1 deficiëntie in hematopoietische cellen aan het effect op cholesterol en atherogenese vergeleken met PHD1 in niet-hematopoietische, stromale cellen. De verlaging van cholesterol werd vooral veroorzaakt door PHD1 deficiëntie in stromale cellen en werd gemedieerd door verhoogde trans-intestinale cholesterol efflux naar de feces. De waargenomen cholesterolverlaging lijkt onafhankelijk van de bekende PHD1 effecten op stabilisatie van hypoxie-induceerbare factoren.

In tegenstelling tot effecten van PHD1 op cholesterol, resulteerde deficiëntie van PHD3 in alle lichaamscellen van de muis in licht-verhoogde plasma cholesterolwaarden, maar niet tot effecten op atherogenese (**hoofdstuk 6**). Daarentegen, leidde PHD3 deficiëntie in hematopoietische cellen tot grotere atherosclerotische plaques met grotere necrotische kern en meer intra-plaque apoptose, door een nog onbekende moleculair mechanisme. Deze twee hoofdstukken laten de grote diversiteit in de effecten van de verschillende PHD isovormen op atherogenese, hypoxie en lipide metabolisme zien.

In **hoofdstuk 7**, werden de experimentele resultaten uit **hoofdstuk 2-6** en de implicaties bediscussieerd. De studies beschreven in dit proefschrift suggereren een modulerende rol van plaque hypoxie in atherosclerose, naast een primaire rol van bekende risicofactoren zoals plasma cholesterol. Naast conclusies over plaque hypoxie, beschrijft dit proefschrift PHD isovorm- en celtype-specifieke effecten op atherogenese, hypoxie en cholesterol metabolisme. In tegenstelling tot differentiële effecten van de PHD isovormen op atherogenese en cholesterol, leidde deficiëntie van elke PHD isovorm tot verbeterde glucose tolerantie en diabetes, en verminderde groei van adipocyten (**hoofdstuk 7**). Aangezien breedspectrum PHD remmers in klinische studies bestudeerd worden, wordt aangeraden isovorm-specifieke en cardiovasculaire effecten in deze studies te evalueren. Gezien de voornamelijk positieve cardiometabole effecten van PHD1 deficiëntie in tegenstelling tot de gemengde effecten van PHD2 en PHD3, lijkt PHD1 isovorm-specifieke inhibitie de meest aantrekkelijke strategie voor de behandeling van atherosclerose en hypercholesterolemie.

ZUSAMMENFASSUNG

Aderverkalkung entwickelt sich unter Einfluss erhöhter Cholesterinwerte im Blut und lokaler, chronischer Entzündungsreaktion in der Arterie. Aderverkalkung ist die unterliegende Ursache von Schlaganfällen oder Herzinfarkten. Heutzutage behandelt man Aderverkalkungen vor allem durch operatives Entfernen der Ablagerungen (Plaque), und indem man versucht Risikofaktoren, sowie erhöhte Cholesterinwerte, Bluthochdruck und Diabetes zu minimieren. Als alternative haben wir in dieser Arbeit Sauerstoffmangel (Hypoxie) in den Ablagerungen/Plaques studiert. Es konnte schon gezeigt werden, dass die Plaques hypoxisch sind, aber ob diese Hypoxie an dem Krankheitsbild Aderverkalkung beiträgt, war noch nicht bekannt. Darum wurde in dieser Dissertation die Hypothese untersucht, dass Plaque Hypoxie ursächlich zu der Entwicklung und Verschlechterung der Aderverkalkung beiträgt.

Erst wurde eine Literaturstudie ausgeführt (**Kapitel 2**). In dieser Literaturstudie wurde deutlich, dass Plaque Hypoxie in Menschen aber auch in anderen Tiermodellen schon gezeigt werden konnte. Desweiteren, wurde bis jetzt vor allem der Effekt von Hypoxie auf „Makrofagen“ (Aufräumer-zellen in der Arterienwand) untersucht und festgestellt, dass diese Zellen in Hypoxie entzündende Eigenschaften annehmen und Fette aufnehmen.

Um einen direkten ursächlichen Verband zwischen Hypoxie und Aderverkalkung festzustellen, wurde in dieser Dissertation von zwei grundsätzlichen Methoden um Plaque Hypoxie zu verkleinern Gebrauch gemacht: Einerseits wurde die Zufuhr von Sauerstoff zur Aderverkalkungsablagerung erhöht und andererseits wurde der Gebrauch von Sauerstoff in der Plaque verkleinert.

In **Kapitel 3**, wurde der Verlauf der Plaque Hypoxie im Verband mit dem Plaque Wachstum untersucht. Zusätzlich wurde der Effekt von Sauerstoff atmen (Carbogen Gas, 95% Sauerstoff) auf Aderverkalkung Entwicklung in Mäusen untersucht. Plaque Hypoxie konnte schon in sehr frühen Stadien der Aderverkalkungsentwicklung festgestellt werden. Desweiteren, konnte erhöhte Sauerstoff Zufuhr durch Carbogen Gas zu atmen, Aderverkalkungsentwicklung und vor allem Zelltod in der Arterie leicht vermindern. Dies war zum Teil einer erhöhten Aufräum-funktion (Efferocytose) von Makrofagen in der Plaque zu schreiben. Ausserdem, da schon anfängliche Plaques hypoxisch waren, ist wahrscheinlich nicht die Sauerstoff Zufuhr aus der Blutbahn, sondern erhöhter Sauerstoff Gebrauch in den Plaques verantwortlich für die Plaque Hypoxie.

Daraufhin wurde vermindern des Sauerstoffgebrauchs in den Plaques untersucht. Es konnte schon gezeigt werden, dass zusätzlichen Zufuegen von extra Nitrat in Trinkwasser die Effizienz der mitochondrialen Atmungskette erhöht und damit mit weniger Sauerstoffverbrauch die gleiche Energie in Zellen erzeugt wird. Darum wurde der Effekt von extra Nitrat in Trinkwasser auf Aderverkalkungsentwicklung in Mäusen untersucht (**Kapitel 4**). Langzeitiges zufuegen von nitrat hatte hier keinen Einfluss auf die Aderverkalkung. Nach 2 Wochen Supplementation, wurden erhöhte Nitrat- und Nitrietwerte im Blut festgestellt, während die Blutwerte nach 14 Wochen Nitrat Supplementation wieder gesackt waren. Diese Daten deuten auf eine Kompensierung der Blut Nitrat- und Nitrietwerte hin, was erklären könnte warum es keinen Unterschied in der Entwicklung von der Aderverkalkung gab. Von diesen Daten kann darum auch keine Aussage über den Einfluss von zellulärem Sauerstoff Gebrauch auf Plaque Hypoxie und Krankheitsbildentwicklungen gemacht werden.

In **Kapitel 5 und 6**, wurde zellulärer Sauerstoff Gebrauch vermindert in genetisch-veränderten Mäusen. Es war schon bekannt, dass das Ausschalten von dem Enzym Prolyl hydroxylase 1 (PHD1) den zellulären Energiehaushalt vom Gebrauch der Sauerstoff-konsumierenden mitochondrialen Atmungskette zur anäroben Glycolyse umschaltet. In der Tat, konnte PHD1 Defizienz in der Maus sowohl die Plaque Hypoxie als auch Aderverkalkungsentwicklung verkleinern (**Kapitel 5**). Allerdings hatten PHD1 defiziente Mäuse auch niedrigere Blut Cholesterinwerte, was wahrscheinlich die kleineren Plaques erklärt. Ein verwandtes Enzym, PHD3, konnte andererseits Plaque Hypoxie nicht beeinflussen (**Kapitel 6**). Auch von diesen Studien (**Kapitel 5 und 6**), kann also keine Aussage gemacht werden ob Plaque Hypoxie ursächlich zur Aderverkalkungsentwicklung beiträgt. Die Daten suggerieren aber, dass der Einfluss von Hypoxie nicht allzu gross ist und das andere Faktoren, wie erhöhte Cholesterinwerte, die Effekte von Hypoxie überschatten.

In **Kapitel 5** wurde dann weiter untersucht, wie PHD1 Defizienz Cholesterinwerte beeinflussen kann. Desweiteren wurde der Einfluss von Immunzellen mit PHD1 Defizienz im Vergleich zur PHD1 Defizienz in allen Zellen untersucht. PHD1 Defizienz in nur den Immunzellen hatte hierbei wenig Einfluss auf Cholesterinwerte und Aderverkalkungsentwicklung. In der Tat war erhöhter Transport von Cholesterin direkt vom Blut über die Darmwand und nachfolgendes Ausscheiden im Stuhl die Ursache für niedrigere Cholesterinwerte in PHD1 defizienten Mäusen.

Interessanterweise, wurde das Gegenübergestellte gefunden in PHD3 defizienten Mäusen, die selbst erhöhte Cholesterinwerte zeigten (**Kapitel 6**). Hier sorgten vor

allein die PHD3 defizienten Immunzellen für grössere Aderverkalkungsformung und erhöhten Zelltod in der Arterienwand. Der Mechanismus, wie PHD3 dieses verursacht, ist noch nicht bekannt. Diese zwei Kapitel zeigen aber, dass die PHD Enzym Familie „Isoform“ (PHD1, PHD3)-spezifische Funktionen in Aderverkalkungsentwicklung und Cholesterin Regulierung haben.

In **Kapitel 7** wurden die experimentellen Ergebnisse der **Kapitel 2-6** diskutiert und Schlussfolgerungen gezogen. Die Studien dieser Dissertation suggerieren eine gemässigte und regulierende Rolle der Plaque Hypoxie in der Aderverkalkungsentwicklung. Andere Faktoren, sowie erhöhte Cholesterinwerte, haben einen grösseren Einfluss auf das Krankheitsbild. Die Ergebnisse zeigen spezifische Effekte von PHD Enzym Isoformen auf Plaque Hypoxie, Aderverkalkungsentwicklung und Cholesterinwerte. Gleichzeitig, scheinen alle PHD Isoformen eine ähnliche Funktion in Diabetes zu haben (untersucht in **Kapitel 7**). Hemmstoffe (Inhibitoren), die alle PHD Enzyme hemmen werden derzeit in Klinische Studien getestet. Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen, dass Herz- und Kreislauf Effekte dieser Hemmstoffe berücksichtigt und untersucht werden sollten. Desweiteren könnten PHD Isoform-spezifische Hemmstoffe eine attraktive Strategie gegen Aderverkalkung und erhöhte Cholesterinwerte darstellen.

