

Cytomegalovirus as a possible risk factor for atherosclerosis : a study in the mouse

Citation for published version (APA):

Vliegen, I. (2003). *Cytomegalovirus as a possible risk factor for atherosclerosis : a study in the mouse*. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20031210iv>

Document status and date:

Published: 01/01/2003

DOI:

[10.26481/dis.20031210iv](https://doi.org/10.26481/dis.20031210iv)

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.

Samenvatting

Infecties met cytomegalovirus (CMV) komen wijdverspreid voor. Hoewel infecties met dit virus meestal zonder klinische symptomen verlopen, kunnen ze ernstige problemen veroorzaken (o.a. retinitis, hepatitis en colitis) in immuungecompromiteerde patiënten zoals pasgeborenen en transplantatiepatiënten. Recent is ook gesuggereerd dat CMV een rol speelt in de ontwikkeling van atherosclerose (aderverkalking). Atherosclerose is een chronische ziekte van de middelgrote en grote vaten waarvan de klinische symptomen (hartinfarct, beroerte, gangreen) zich uiten na partiële of totale afsluiting van het vaatlumen. Aangezien atherosclerose nog steeds één van de belangrijkste doodsoorzaken in de Westerse Wereld is, is de identificatie en eliminatie van alle mogelijke risicofactoren voor atherosclerose uitermate relevant. In dit proefschrift is daarom de bijdrage van CMV aan het atherosclerotische proces nader onderzocht.

Bij aanvang van deze promotiestudie was slechts weinig bekend over de bijdrage van CMV aan atherosclerose. Hoewel een associatie van het virus met de ziekte was aangetoond in sero-epidemiologische, in *in vitro* en in enkele *in vivo* experimenten, ontbraken eenduidige data over een bijdrage van het virus aan het atherosclerotische proces. Om deze bijdrage in detail te onderzoeken werd in dit proefschrift gebruik gemaakt van een diermodel nl. de atherosclerose-gevoelige apolipoproteïne E knockout ($apoE^{-/-}$) muis. Door het ontbreken van het apoE gen, betrokken bij het vetmetabolisme, krijgen deze muizen hoge bloedcholesterol niveaus en ontwikkelen ze atherosclerose op een manier vergelijkbaar met de manier waarop mensen de ziekte ontwikkelen. Om het effect van CMV op de ontwikkeling van atherosclerose in deze muizen te bestuderen, werden jong volwassen (8-weken-oude) $apoE^{-/-}$ muizen geïnfecteerd met muis CMV (MCMV).

In een eerste experimenteel hoofdstuk (hoofdstuk 2) werd het effect van CMV infectie op het atherosclerotische proces beschreven. Hiertoe werden zowel tijdens de acute fase (2 weken) als tijdens de chronische fase (20 weken) van de infectie de vaten van $apoE^{-/-}$ muizen geanalyseerd op de aanwezigheid van atherosclerose. Ook werd de grootte van atherosclerotische lesies gemeten en vergeleken met vaten van niet-geïnfecteerde muizen. Hoewel in de acute fase van de infectie geen effect van MCMV op het atherosclerotische proces gezien werd, was op 20 weken na infectie de atherosclerotische lesiegrootte significant toegenomen. Met andere woorden, CMV infectie van de muis resulteerde in een versnelde progressie van atherosclerose. Op de arteriën van deze muizen werden eveneens immunohistochemische kleuringen uitgevoerd teneinde de influx van T cellen en macrofagen te meten. Hoewel MCMV infectie niet resulteerde in een effect op het aantal macrofagen, was het aantal T cellen in de vaatwand in de acute fase van de infectie (2 weken) significant verhoogd ten opzichte van de vaten van niet-geïnfecteerde dieren. Deze resultaten toonden dus aan dat MCMV het atherosclerotische proces

versterkt in apoE^{-/-} muizen tijdens de chronische fase van de infectie en dat de T lymfocyt hier wellicht een bijdrage in levert.

In de volgende hoofdstukken is vervolgens getracht meer inzicht te krijgen in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de geobserveerde stimulatie van atherosclerose door CMV. De experimentele opzet werd zo gekozen dat zowel indirecte effecten (door ontstekingsreacties) als directe effecten (door de aanwezigheid van CMV in de vaatwand) van het virus op atherosclerose onderzocht konden worden.

Omdat we wilden nagaan of het waargenomen effect (uit hoofdstuk 2) enkel en alleen veroorzaakt werd door infectieus virus of dat ook niet-infectieus virus dit effect teweeg kon brengen, werd een experiment opgezet waarbij apoE^{-/-} muizen geïnjecteerd werden met geïnactiveerd virus (hoofdstuk 4). Het virus dat hiervoor gebruikt werd, was replicatie-deficiënt gemaakt door middel van UV bestraling. Uit deze studie bleek dat zowel infectieus als UV-geïnactiveerd MCMV een invloed hadden op het atherosclerotische proces in de acute fase van de infectie en dat beiden een toename in T cellen in de vaatwand induceerden. Zoals verwacht, konden er geen virale componenten in de vaatwand gedetecteerd worden na UV-MCMV injectie. De resultaten van dit experiment zijn in overeenstemming met bevindingen van andere groepen. Deze suggereren dat infecties, ook degene die niet leiden tot infectie van de vaatwand, het reeds op gang zijnde atherosclerotische proces kunnen stimuleren. Dit is een belangwekkende bevinding omdat ze aangeeft dat stimulatie van het immuunsysteem door een "willekeurige" infectie wellicht het atherosclerotische proces versnelt.

Naast T cellen spelen macrofagen ook een belangrijke rol in het atherosclerotische proces. Ook is bekend dat virussen macrofagen kunnen activeren. Om te onderzoeken of MCMV via macrofaag gemedieerde immuunreacties op indirecte wijze het atherosclerotische proces kan verergeren, werd in hoofdstuk 5 het effect van MCMV op macrofaag-differentiatie bestudeerd. In het bijzonder werd aandacht besteed aan het pro-inflammatoire/pro-atherogene fenotype. Hiertoe werd het effect van MCMV infectie op de productie van pro-inflammatoire/pro-atherogene cytokines zoals interferon- γ (IFN γ) en interleukine-18 (IL-18) door peritoneaal macrofagen bepaald. Tevens werd met behulp van de FACS (fluorescent activated cell sorting) techniek de expressie van het celmembraan molecule MHC (Major histocompatibility complex) klasse II en de co-stimulatoire celmembraan moleculen CD40, CD80 en CD86, die allen betrokken zijn bij T cel activatie, bestudeerd. Uit deze studie bleek dat MCMV infectie macrofagen stimuleert tot IL-18 secretie en dat MCMV infectie een verhoogde IFN γ productie door macrofagen veroorzaakt. Eveneens resulteerde MCMV infectie in een verhoogde expressie van de hierboven beschreven celmembraan markers. Hieruit kan geconcludeerd worden dat MCMV een pro-inflammatoir/pro-atherogeen macrofaag fenotype induceert hetgeen impliceert dat het virus ook via deze weg een effect kan hebben op het atherosclerotische proces.

Eerdere studies hebben aangetoond dat cytokines een bijdrage kunnen leveren aan het atherosclerotische proces. Op basis hiervan werd een volgend experiment uitgevoerd waarbij gekeken werd of CMV een invloed heeft op de hoeveelheid cytokines in het bloed en in de vaatwand (hoofdstuk 6). Hiertoe werden $\text{IFN}\gamma$ en tumor necrosis factor α ($\text{TNF}\alpha$) concentraties gemeten in het bloed met behulp van de ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) en werd de expressie van deze cytokines gemeten in de arteriële vaatboom met behulp van de real-time RT-PCR. Uit dit onderzoek bleek dat MCMV leidt tot een verhoogde concentratie van zowel $\text{TNF}\alpha$ als van $\text{IFN}\gamma$ in het bloed op 2 à 4 dagen na infectie. Aangezien verhoogde systemische niveaus van deze cytokines atherosclerose kunnen verergeren, suggereren deze resultaten dat CMV via een indirect mechanisme (i.e. systemische expressie van cytokines) het atherosclerotisch proces kan verergeren. Naast een verhoogde systemische productie bleken deze cytokines ook lokaal in de vaatwand van $\text{apoE}^{-/-}$ muizen aanwezig te zijn, waarbij het percentage vaten positief voor deze cytokines hoger lag in de MCMV-geïnfecteerde muizen dan in mock-geïnjecteerde muizen. Het feit dat ook MCMV in de vaatwand van deze muizen kon gedetecteerd worden, suggereert dat infectieus virus lokale/directe effecten op de vaatwand kan hebben die resulteren in een verhoogde lokale cytokine expressie met als gevolg een verdere stimulatie van het atherosclerotische proces.

Om een direct effect op de vaatwand te kunnen hebben moet het virus van de plaats van infectie naar de vaatwand getransporteerd worden. Hoewel in het vorige experiment reeds aangetoond werd dat het virus in de vaatwand gedetecteerd kan worden, was de tijdsafhankelijke verspreiding van het virus in $\text{apoE}^{-/-}$ muizen nog niet volledig bekend. Om dit te onderzoeken werd op diverse tijdstippen (1, 2, 4, 6, 14 en 28 dagen) na infectie de hoeveelheid MCMV DNA in verschillende organen bepaald (hoofdstuk 7). MCMV DNA kon reeds op 1 dag na infectie in de vaatwand gedetecteerd worden. Piek niveaus werden gedetecteerd op dag 4 à 6 na infectie, waarna er een geleidelijke afname kon worden waargenomen op 14 en 28 dagen na infectie. Een analoog patroon werd gezien in het hart en in de longen. In de milt, in het bloed en in de lever werden piek niveaus gedetecteerd op 2 dagen na infectie opgevolgd door een geleidelijke afname op latere tijdstippen. In de beenmergcellen werden continu lage niveaus aan MCMV gedetecteerd en in de speekselklier werden piek niveaus pas op de latere tijdstippen gedetecteerd. De resultaten van dit experiment tonen dus aan dat CMV zich reeds vroeg na infectie verspreidt in het lichaam en dat het virus aanwezig is in de vaatboom vanaf dag 1. In dit experimentele hoofdstuk werd eveneens een vergelijking gemaakt tussen $\text{apoE}^{-/-}$ en normale apoE -bevattende C57BL/6J muizen met betrekking tot MCMV gevoeligheid. Specifieke overlevingskarakteristieken van de muizen werden vergeleken naast de hoeveelheid van MCMV DNA in de verschillende organen. Een opmerkelijke bevinding was dat $\text{apoE}^{-/-}$ muizen beduidend minder gevoelig bleken te zijn voor MCMV infecties dan de C57BL/6J muis. Mogelijk is dit te wijten aan de verhoogde basale activiteit van het immuunsysteem die gedetecteerd werd in de $\text{apoE}^{-/-}$ muis.

Concluderend kan gesteld worden dat de data, gepresenteerd in dit proefschrift, aanleiding geven om te veronderstellen dat CMV het atherosclerotische proces daadwerkelijk beïnvloedt. Mogelijk gebeurt deze beïnvloeding via 2 mechanismen i) via een direct/lokaal effect of ii) via een indirect/gegeneraliseerd effect. Welke van de mechanismen het belangrijkste is en hoe ze precies werken is nog grotendeels onbekend. Verder onderzoek is hiervoor noodzakelijk.