

# On the inflammatory and infectious aspects of atherosclerosis: a serological, molecular biological & clinical treatise

## Citation for published version (APA):

Vainas, T. (2006). *On the inflammatory and infectious aspects of atherosclerosis: a serological, molecular biological & clinical treatise*. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht.

## Document status and date:

Published: 01/01/2006

## 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](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

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

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## Summary

In this thesis the inflammatory and infectious features of atherosclerosis are scrutinized. Chapter 1 lays out the theoretical background of the studies described here. A comprehensive overview of the pathogenesis and epidemiology of atherosclerotic disease is given with special emphasis on the inflammatory nature of this process and the potential involvement of infectious microbes herein. Also a short historical overview of the developments in atherosclerotic cardiovascular medicine is given, commemorating the tremendous achievements of the past in this field.

Section 2 (inflammation and atherosclerosis, chapters 2 & 3) deals with the relation between CRP and (extent of) atherosclerotic disease. In Chapter 2, serum CRP was measured highly sensitive in patients with peripheral arterial disease, showing an inverse relation to ankle-brachial pressure index. Baseline serum CRP was also related to future cardiovascular events. Furthermore, femoral plaques have shown to be able to produce CRP. Immunohistochemical analysis located the vascular CRP production on macrophages, T-cells and smooth muscle cells. Similarly, in chapter 3 it was shown that serum CRP was related to the dimension of abdominal aortic aneurysms and that aneurysmal tissue produces CRP.

In section 3 (infection and atherosclerosis, chapters 4–6) the role of *Chlamydia pneumoniae* infection in peripheral vascular disease was studied. In chapter 4, *Chlamydia pneumoniae* IgA and IgG antibodies were measured with a commercially available enzyme immunoassay and with the micro-immunofluorescence test, which has been regarded the gold standard for detection of *Chlamydia pneumoniae* antibodies. Our data showed that both tests yielded comparable results for the detection of *Chlamydia pneumoniae* IgA- and IgG-antibodies in patients with cardiovascular disease. In chapter 5, *Chlamydia pneumoniae* antibodies were related to the presence of *Chlamydia pneumoniae* DNA or proteins in atherosclerotic plaques of patients undergoing reconstructive vascular surgery of the aorta, carotid or femoropopliteal arteries. These data demonstrated a lack of association between *Chlamydia pneumoniae* serology and presence of *Chlamydia pneumoniae* particles in the vascular wall, rendering serological detection of vascular *Chlamydia pneumoniae* infection virtually impossible. In chapter 6 we were able to demonstrate that *Chlamydia pneumoniae* serology was related to hypercoagulability rather than plaque rupture per se, relating *Chlamydia pneumoniae* antibodies to micro-embolic signals in the middle cerebral artery in patients undergoing carotid endarterectomy for symptomatic carotid artery disease.

In section 4 (chapter 7), common polymorphisms of two pattern-recognition receptor genes, i.e., the *Toll-like receptor 4 (TLR4) +896 A>G* and the *CD14 -*

*260 C>T* single nucleotide polymorphism were analyzed in relation to total atherosclerosis burden in patients with peripheral arterial disease. Multivariate logistic regression analysis showed that combination of the *TLR4 +896A>G* allele carriership and *CD14 -260 TT* homozygosity was an independent predictor of extensive atherosclerotic disease. This provided an explanation for inter-individual susceptibility to atherosclerosis based on genetic variability of a combination of genes involved in innate immune regulation.

Considering the inflammatory nature of atherosclerosis and the potential modulatory role of (*Chlamydia pneumoniae*) infections in the development of cardiovascular events, new potential therapeutic (anti-inflammatory or anti-microbial) targets have evolved. In section 5 the effect of a short course of antibiotics in the progression of atherosclerosis in patients with peripheral arterial disease was studied in a randomised clinical trial (chapter 8). Although *Chlamydia pneumoniae* serology was related to future cardiovascular events, no beneficial effect of a 3-day course of azithromycine on cardiovascular events or changes in ankle-brachial pressure index were observed. In chapter 9, the main results of this thesis are discussed in relation to the literature.

In conclusion, the data presented are in concord with the inflammatory nature of atherosclerosis. It has been shown that CRP is produced by diseased vascular tissue and that serum CRP is related to the extent of atherosclerotic disease and to future cardiovascular events. Furthermore, it has been suggested that *Chlamydia pneumoniae* infection can induce a clinically relevant hypercoagulable state, as *Chlamydia pneumoniae* antibodies were associated with thrombosis related micro-embolization after carotid endarterectomy and with future cardiovascular events in patients with peripheral arterial disease. Despite these associations, a short-term antibiotic treatment had no effect on future events and changes in ankle-brachial pressure index in patients with peripheral arterial disease.

## Samenvatting

In dit proefschrift worden de inflammatoire en infectieuze aspecten van atherosclerose bestudeerd. Deel 1 (Introduction, Hoofdstuk 1) geeft een theoretische achtergrond voor de beschreven studies aan de hand van een overzicht van de pathogenese en epidemiologie van atherosclerotische ziekte. Hierbij ligt de nadruk op de inflammatoire kenmerken van atherosclerose en de mogelijke rol van infectieuze micro-organismen hierin. Tevens wordt een historisch overzicht betreffende de ontwikkelingen in cardiovasculaire geneeskunde gepresenteerd.

Deel 2 (Inflammation and atherosclerosis, hoofdstuk 2 en 3) gaat over de relatie tussen C-reactive protein (CRP) en (de uitgebreidheid van) atherosclerotische ziekte. In hoofdstuk 2 wordt een onderzoek beschreven naar CRP met hoge gevoeligheid (hsCRP) gemeten in het serum van patiënten met perifeer arterieel vaatlijden. Er bleek sprake van een omgekeerde relatie tussen de hoogte van hsCRP en de hoogte van de enkel-arm-index, dat een gevoelige maat is voor de uitgebreidheid van perifeer arterieel vaatlijden. Daarnaast bleek de hsCRP serum concentratie gerelateerd aan het optreden van toekomstige cardiovasculaire complicaties. Uit aanvullende studies bleek dat atherosclerotische plaques uit de liesslagader CRP kunnen produceren. Immunohistochemische analyses suggereerden dat deze CRP productie plaatsvindt in macrophagen, T-cellen en gladde spiercellen. Op overeenkomstige wijze toonde de studie beschreven in hoofdstuk 3 dat de hoogte van hsCRP direct gerelateerd was aan de diameter van aneurysmata van de aorta abdominalis en dat CRP geproduceerd werd door het aneurysmaweefsel zelf.

De rol van infectie met het micro-organisme *Chlamydia pneumoniae* in relatie tot perifeer vaatlijden wordt in deel 3 (Infection and atherosclerosis, hoofdstuk 4–6) beschreven. In hoofdstuk 4 wordt beschreven hoe *Chlamydia pneumoniae* IgA- en IgG-antilichamen werden gemeten met een commercieel verkrijgbare ELISA en met de micro-immunofluorescentietest, welke als gouden standaard gezien wordt voor het detecteren van *Chlamydia pneumoniae* antilichamen. Onze data toonden dat beide testen vergelijkbare resultaten opleverden met betrekking tot de detectie van *Chlamydia pneumoniae* IgA- en IgG-antilichamen in patiënten met cardiovasculaire aandoeningen. De relatie tussen *Chlamydia pneumoniae* antilichamen in het serum en de aanwezigheid van *Chlamydia pneumoniae* DNA of proteïnen in atherosclerotisch weefsel van patiënten die een vaatoperatie ondergingen aan de aorta, hals-, lies- of knieslagader wordt in hoofdstuk 5 beschreven. Er werd geen associatie gevonden tussen *Chlamydia pneumoniae* serologie en aanwezigheid van *Chlamydia pneumoniae* partikels in de vaatwand. Serologische detectie van vasculaire infectie met *Chlamydia pneumoniae* is dus waarschijnlijk niet mogelijk. In hoofdstuk 6 wordt beschreven dat

*Chlamydia pneumoniae* serologie geassocieerd bleek te zijn met hypercoagulabiliteit en niet met plaque-instabiliteit. Deze conclusie werd gebaseerd op de gevonden associatie tussen *Chlamydia pneumoniae* seropositiviteit en het aantal thrombus gerelateerde micro-embolieën in de arteria cerebri media bij patiënten die een endarteriëctomie van de halsslagader ondergingen in verband met een symptomatische a.carotis stenose.

Deel 4 (Genetic determinants of atherosclerosis susceptibility, hoofdstuk 7) beschrijft een studie waarin vaak voorkomende DNA-polymorfismen van twee receptoren die onderdeel uitmaken van het aangeboren immuunsysteem, namelijk de *Toll-like receptor 4 (TLR-4) +896 A>G* en de *CD14 -260 C>T* polymorfismen, geanalyseerd werden in relatie tot de algemene uitgebreidheid van atherosclerose in patiënten met perifeer arterieel vaatlijden. Multivariate logischistische regressie analyse toonde dat de combinatie van het TLR4 Asp299Gly G-allel dragerschap en CD14 -260 TT homozygotie een onafhankelijke voorspeller was van uitgebreide atherosclerotische ziekte. Deze uitkomst bood een verklaring voor de inter-individuele ontvankelijkheid voor atherosclerose gebaseerd op genetische variabiliteit van een gencombinatie die van belang is voor de immuunregulatie.

Het inflammatoire karakter van atherosclerose en de mogelijk modulerende rol van (*Chlamydia pneumoniae*) infecties bij cardiovasculaire ziekten, vormen de theoretische basis voor nieuwe potentiële therapeutische (anti-inflammatoire of anti-microbiële) strategieën. In een prospectief opgezet gerandomiseerde studie werd het effect van een korte antibioticakuur bestudeerd op de progressie van atherosclerose in patiënten met perifeer arterieel vaatlijden (Clinical intervention trial; deel 5, hoofdstuk 8). Hoewel in deze studie de initiële *Chlamydia pneumoniae* serologie gerelateerd was aan later optredende cardiovasculaire gebeurtenissen, werd er door het geven van een 3-daagse kuur azithromycine geen gunstig effect gemeten op toekomstige cardiovasculaire gebeurtenissen of op veranderingen in de enkel-arm-index, als maat van progressie van perifeer vaatlijden.

Tot slot worden in deel 6 (Discussion, hoofdstuk 9) de belangrijkste resultaten van dit proefschrift bediscussieerd in relatie tot bevindingen uit de literatuur. De gepresenteerde eigen data zijn in overeenstemming met het inflammatoire karakter van atherosclerose. De resultaten van dit proefschrift tonen dat CRP geproduceerd wordt door aneurysmatisch en atherosclerotisch vasculair weefsel en dat CRP, gemeten in het serum, gerelateerd is aan de uitgebreidheid van atherosclerotische ziekte en aan toekomstige cardiovasculaire complicaties. Daarnaast suggereren de hier beschreven studies dat een infectie met *Chlamydia pneumoniae* een klinisch relevante hypercoagulabele status kan induceren, daar *Chlamydia pneumoniae* antilichamen geassocieerd bleken met het optreden van micro-embolieën na

endarteriëctomie van de halsslagader en met toekomstige cardiovasculaire gebeurtenissen bij patiënten met perifeer arterieel vaatlijden. Ondanks deze associaties bleek een korte antibioticakuur, bij patiënten met perifeer arterieel vaatlijden, niet effectief in het voorkomen van toekomstige cardiovasculaire complicaties of progressie van perifeer arterieel vaatlijden zoals weergegeven door verandering van de enkel-arm index.

## Περίληψη

Στην παρούσα διατριβή εξετάζονται τα φλεγμονώδη και μολυσματικά χαρακτηριστικά της αθηροσκλήρωσης. Το πρώτο κεφάλαιο θέτει το θεωρητικό υπόβαθρο των μελετών που περιγράφονται εδώ. Δίδεται μία σφαιρική εικόνα της παθογένεσης και επιδημιολογίας της αθηροσκληρωτικής νόσου, με ειδική έμφαση στην φλεγμονώδη φύση αυτής της διαδικασίας και την πιθανή συμμετοχή σε αυτήν μολυσματικών μικροβίων. Επίσης γίνεται μια σύντομη ιστορική αναδρομή των εξελίξεων στον κλάδο της καρδιαγγειακής ιατρικής, μνημονεύοντας τα τεράστια επιτεύγματα του παρελθόντος σε αυτόν τον τομέα. Το δεύτερο τμήμα (φλεγμονή και αθηροσκλήρωση, κεφάλαια 2 & 3) πραγματεύεται τη σχέση μεταξύ της πρωτεΐνης CRP και της (έκτασης της) αθηροσκληρωτικής νόσου. Στο κεφάλαιο 2, η CRP ορού μετρήθηκε σε ασθενείς με αποφρακτική νόσο των περιφερειακών αρτηριών, παρουσιάζοντας μια αντίστροφη σχέση προς το δείκτη κνήμης-βραχίονος. Επιπλέον, η CRP ορού, συσχετίστηκε με μελλοντικά καρδιαγγειακά επεισόδια. Οι μηριαίες αθηροσκληρωτικές πλάκες έδειξαν ότι μπορούν να παράγουν CRP. Ανοσοιστοχημική ανάλυση εντόπισε την αγγειακή παραγωγή CRP σε μακροφάγα, T-λεμφοκύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα. Παρομοίως, στο κεφάλαιο 3 καταδείχτηκε ότι η CRP ορού σχετίζονταν με την έκταση των κοιλιακών αορτικών ανευρισμάτων και ότι ανευρισματικός ιστός δύνεται να παράγει CRP. Στο τρίτο τμήμα (μόλυνση και αθηροσκλήρωση, κεφάλαια 4-6) εξετάστηκε ο ρόλος της μόλυνσης από χλαμύδια (*Chlamydia pneumoniae*) στη νόσο των περιφερειακών αρτηριών. Στο κεφάλαιο 4, μετρήθηκαν αντισώματα ανοσοσφαιρίνης A και G στα *Chlamydia pneumoniae*, με ενζυμο-ανοσολογική δοκιμή και με χρήση microimmunofluorescence τεστ, που θεωρείται ο χρυσός κανόνας για την ανίχνευση των αντισωμάτων των χλαμυδίων. Τα δεδομένα μας έδειξαν ότι τα δύο τεστ έδωσαν συγκρίσιμα αποτελέσματα για την ανίχνευση των αντισωμάτων χλαμυδίων, σε ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο. Στο κεφάλαιο 5, αντισώματα χλαμυδίων σχετίστηκαν με την παρουσία DNA ή πρωτεϊνών χλαμυδίων στις αθηροσκληρωτικές πλάκες ασθενών που υπεβλήθησαν σε αγγειοχειρουργική αποκατάσταση της αορτής, καρωτίδας ή μηριαιογνυακών αρτηριών. Τα δεδομένα αυτά, έδειξαν μια έλλειψη συσχετισμού μεταξύ των αντισωμάτων χλαμυδίων και της παρουσίας σωματιδίων χλαμυδίων στο αγγειακό τοίχωμα, καθιστώντας σχεδόν αδύνατη την ανίχνευση της αγγειακής μόλυνσης από χλαμύδια με τεστ ορού. Στο κεφάλαιο 6, μπορέσαμε να καταδείξουμε ότι τα αντισώματα χλαμυδίων σχετίζονται περισσότερο με την υπερπηκτικότητα του αίματος παρά με την ρήξη της αθηροσκληρωτικής πλάκας καθεαυτής, συσχετίζοντας τα αντισώματα χλαμυδίων με σημεία μικροεμβολής στη μέση εγκεφαλική αρτηρία, σε ασθενείς που υποβάλλονταν σε επέμβαση της καρωτίδας αρτηρίας λόγω νόσου της αρτηρίας αυτής με εκδηλωση συμπτωμάτων.

Στο τέταρτο τμήμα (κεφάλαιο 7), αναλύθηκαν κοινοί πολυμορφισμοί δύο γονιδίων υποδοχέων αναγνώρισης μορφών, του Toll-like receptor 4 (TLR4)+896 A>G και του CD14-260 C>T μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού, σε σχέση με το συνολικό αθηρωματικό φόρτο σε ασθενείς με νόσο των περιφερειακών αρτηριών. Πολυπλή λογιστική ανάλυση καμπύλης έδειξε ότι ο συνδιασμός του TLR4 +896A>G αλληλόμορφου γονιδίου και ομοζυγοτισμού για CD14 -260 TT ήταν ανεξάρτητος παράγοντας εκτεταμένης αθηροσκληρωτικής νόσου. Έτσι δόθηκε μια εξήγηση για την ατομική προδιάθεση στην αθηροσκλήρωση που βασίζεται στην γενετική ποικιλία ενός συνδιασμού γονιδίων που εμπλέκονται στην εγγενή ανοσορύθμιση.

Λαμβάνοντας υπόψη την φλεγμονώδη φύση της αθηροσκλήρωσης και τον πιθανώς ρυθμιστικό ρόλο μολύνσεων (απο χλαμύδια) στην εκδήλωση καρδιαγγειακών επεισοδίων, εξελίχθηκαν νέοι πιθανώς θεραπευτικοί (αντιφλεγμονώδεις ή αντιμικροβιακοί) στόχοι. Στο πέμπτο τμήμα, μελετήθηκε η επίδραση μιας βραχείας χορήγησης αντιβιοτικών στην εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης σε ασθενείς με νόσο των περιφερειακών αρτηριών, με τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή (κεφάλαιο 8). Αν και τα αντισώματα χλαμυδίων συνδέθηκαν με μελλοντικά καρδιαγγειακά επεισόδια, δεν παρατηρήθηκε κάποια ευνοϊκή επίπτωση στα καρδιαγγειακά επεισόδια ή αλλαγές στο δείκτη πίεσης κνήμης-βραχίονος, μετά απο χορήγηση αζιθρομυκίνης για 3 ημέρες. Στο κεφάλαιο 9 παρουσιάζονται τα κύρια αποτελέσματα αυτής της διατριβής σε σχέση με τη διεθνή επιστημονική βιβλιογραφία.

Συμπερασματικά, τα δεδομένα που παρουσιάζονται σε αυτήν την διατριβή συνάδουν με την φλεγμονώδη φύση της αθηροσκλήρωσης. Καταδείχτηκε ότι η CRP παράγεται απο νοσούντα αγγειακό ιστό και ότι η CRP ορού σχετίζεται με την έκταση της αθηροσκληρωτικής νόσου και μελλοντικά καρδιαγγειακά επεισόδια. Επίσης υποστηρίζεται ότι η μόλυνση από χλαμύδια μπορεί να προκαλέσει κλινική κατάσταση υπερπηκτικότητας του αίματος, καθώς τα αντισώματα χλαμυδίων σχετίστηκαν με θρομβωτικό μικροεμβολισμό, μετά απο εκτομή αθηροσκληρωτικής πλάκας της καρωτιδας αρτηρίας, και με μελλοντικά καρδιαγγειακά επεισόδια σε ασθενείς με αποφρακτική αθηροσκληρωτική νόσο των περιφερειακών αρτηριών. Παρά τους συσχετισμούς αυτούς, μια βραχεία θεραπεία με αντιβιοτικά δεν είχε επιπτώσεις σε μελλοντικά καρδιαγγειακά συμβάντα και στον δείκτη κνήμης-βραχίονος, σε ασθενείς με αποφρακτική νόσο των περιφερειακών αρτηριών.