

Cardiovascular disease: role of immunosuppression and radiotherapy

Citation for published version (APA):

Gabriels, K. M. R. (2013). *Cardiovascular disease: role of immunosuppression and radiotherapy*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Uitgeverij BOXPress. <https://doi.org/10.26481/dis.20131220kg>

Document status and date:

Published: 01/01/2013

DOI:

[10.26481/dis.20131220kg](https://doi.org/10.26481/dis.20131220kg)

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

Cardiovascular disease (CVD) and cancer are two leading life-threatening diseases in developed countries. The main underlying pathological cause of most CVDs is atherosclerosis, characterized by a chronic inflammatory response in the arterial wall. In the first part of this thesis, we focused on two immunosuppressive strategies to protect against inflammation-driven atherosclerosis. In **chapter 2**, we explored the potential therapeutic use of immunosuppressive drug FK506 (tacrolimus), targeting the calcineurin-nuclear factor of activated T-cells (NFAT) signaling pathway, in atherosclerosis. Transcription factors of the NFAT family have crucial roles in the development and function of the immune system and are tightly regulated by calcineurin, a calmodulin-dependent calcium-activated phosphatase, and NFAT kinases. NFAT has been considered as a target for therapeutic approaches that are aimed at regulating T-cell-mediated immune responses, like in the treatment of graft transplant rejection and autoimmune diseases. Low-dose (0.05 mg/kg/day) FK506 treatment markedly reduced atherosclerotic plaque initiation and progression in apolipoprotein E-knockout (*ApoE*^{-/-}) mice, most likely by favoring anti-inflammatory M2-macrophage polarization, whereas this protective effect was not observed after high-dose treatment (1 mg/kg/day). Moreover, high-dose FK506 treatment was associated with hypercholesterolemia, an adverse side-effect that has also been reported after the long-term use of calcineurin inhibitors in transplant recipients. These data show that FK506 dosage is critical for its therapeutic application in atherosclerosis.

To circumvent the regulation of undesired targets when blocking calcineurin, we additionally investigated the role of a specific isoform of NFAT signaling in T-cells, NFATC2, in atherosclerosis (**chapter 3**). As NFAT activation is indispensable for regulatory T-cell function and NFATC2 selectively promotes T-helper (Th)₁-cell differentiation, we hypothesized that NFATC2 would be an excellent target for anti-atherogenic therapy. Although we observed a pronounced compensatory shift towards a Th₂-immune response, NFATC2 deficiency, either specific in whole-body or hematopoietic cell-lineage, aggravated rather than protected against atherosclerotic plaque formation. An augmented proliferative response and effector/memory phenotype of NFATC2-deficient T-cells, more prone to migrate to the atherosclerotic lesion, contributed to the aggravated atherogenic response.

In the next chapters, we focused on a unique interface between CVD and radiotherapy. There is a strong correlation between radiotherapy treatment and an increased long-term risk for developing CVD in breast cancer, Hodgkin's lymphoma and head and neck cancer patients. In previous experimental studies, we have shown that local radiation exposure to the carotid arteries of young hypercholesterolemic *ApoE*^{-/-} mice accelerated the progression of atherosclerotic plaques and predisposed to an inflammatory, thrombotic plaque phenotype. In **chapter 4**, we demonstrate that irradiation of pre-existing atherosclerotic lesions in the aortic arch of aged *ApoE*^{-/-} mice resulted in a macrophage-rich plaque phenotype, more specifically pro-inflammatory M1 macrophages, with increased presence of intraplaque hemorrhage and apoptotic cells. These highly-inflamed plaques can augment the risk for cardiovascular complications. As the majority of cancer patients involve the elderly suffering subclinical cardiovascular damage, stratification of patients with a higher risk for CVD to enable tailored therapeutic approaches and early preventive measures should be a major future concern in our progressively aging society.

Breast cancer is one of the most common cancers among women. Each month almost 1000 women are diagnosed in the Netherlands (Netherlands Cancer Registry). There is abundant epidemiological evidence that breast cancer patients treated with radiotherapy have an increased risk of cardiac mortality, which is higher for left-side-treated than right-side-treated patients. In **chapters 5 and 6** we addressed radiation-induced cardiac damage in wild-type C57BL/6J and hypercholesterolemic *ApoE*^{-/-} mice. Whereas mice were able to maintain cardiac function to a certain extent, progressive cardiac microvascular damage with increasing radiation dose and follow-up time, indicated by a loss of microvessels and endothelial cell injury in remaining vessels, was found. Consequently, cardiac irradiation caused vascular leakage, which was extensively observed after radiotherapy with 16 Gy as evidenced by diffuse myocardial albumin and amyloid deposition, and lead to sudden death. Although *ApoE*^{-/-} mice were protected from developing radiation-induced cardiac amyloidosis, as ApoE itself is one of the components of amyloid, hypercholesterolemia in combination with 16 Gy irradiation enhanced microvascular damage and accelerated coronary atherosclerosis development.

In **chapter 7** the major findings of this thesis and future directions are given. Potential underlying mechanisms of radiation-induced cardiovascular damage and possible targets for intervention, as well as the therapeutic potential of inhibiting calcineurin-NFAT interactions in atherosclerosis, are discussed. In conclusion, future research characterizing the roles of individual NFAT proteins in regulating immune cells, and their extent of overlap in function, is necessary for selecting the optimal target for developing NFAT-mediated immunosuppressive anti-atherogenic approaches. Novel immunosuppressive agents selectively targeting calcineurin-docking sites on NFAT can prevent unwanted side effects, thereby enhancing their therapeutic potential in the treatment of atherosclerosis. Our data further provide new insights into the pathogenesis of radiation-induced CVD, emphasizing the need to assess individual cardiovascular risk profile and to develop clinical preventive measures.

Samenvatting

Hart- en vaatziekten en kanker zijn de twee meest voorkomende doodsoorzaken in de Westerse landen. Atherosclerose (of 'aderverkalking') is de voornaamste onderliggende oorzaak van hart- en vaatziekten en wordt gekenmerkt door een chronische ontstekingsreactie in de arteriële vaatwand. In het eerste deel van mijn proefschrift hebben we twee strategieën onderzocht die beschermen tegen de ontsteking in atherosclerose.

Als eerste hebben we in **hoofdstuk 2** gekeken naar de behandeling met FK506 (tacrolimus), een medicijn dat het immuunsysteem onderdrukt door remming van calcineurine. Calcineurine controleert de werking van bepaalde transcriptiefactoren, genaamd NFAT's, die cruciaal zijn voor de activatie van een subset van belangrijke ontstekingscellen, de T-cellen. Medicijnen, zoals FK506, worden ook in andere ziekten waarbij het immuunsysteem geblokkeerd moet worden, zoals auto-immuun ziekten en bij orgaantransplantaties, gebruikt. Uit eerder onderzoek in ons laboratorium bleek dat behandeling met een lage dosis FK506 de start en verdere ontwikkeling van atherosclerose in een muismodel voor atherosclerose (*ApoE^{-/-}* muis) verminderde. In dit proefschrift is dit verder onderzocht. Daaruit bleek dat de lage dosis FK506 een effect had op de macrofagen en dat leidde tot een verhoogde aanwezigheid van anti-inflammatoire (M2) macrofagen. Dit beschermend effect werd niet geobserveerd na een hoge dosis FK506, sterker nog, de hoge dosis resulteerde in verhoogde cholesterol waarden in het bloed. Een hoge cholesterol-concentratie in het bloed is ook aangetoond na lang gebruik van calcineurine remmende medicatie door patiënten met een orgaantransplantatie. Deze resultaten geven aan dat de dosering een kritische factor is bij de effecten van FK506-behandeling van atherosclerose.

Om de neveneffecten van calcineurineremming te vermijden, hebben we vervolgens de rol van een specifiek subtype van de NFAT transcriptiefactoren, namelijk NFATC2, in atherosclerose onderzocht (**hoofdstuk 3**). Aangezien NFAT-activatie onmisbaar is voor het normaal functioneren van ontstekingsremmende T-helper (Th)₂-cellen en NFATC2 selectief de werking van ontstekingsbevorderende Th₁-cellen stimuleert, veronderstelden we dat blokkering van NFATC2 bescherming zou bieden tegen atherosclerose. Hoewel de afwezigheid van NFATC2 in atherosclerotische muizen wel de ontstekingsremmende Th₂ immuun respons veroorzaakte, werd een verergering van de atherosclerose geobserveerd. Dit was te verklaren door een

verhoogde aanwezigheid van een ander type T-cellen, de 'effector/memory' T-cellen, die een hogere reactiviteit vertoonden en meer geneigd waren zich naar de plek van atherosclerose te verplaatsen om daar de ontstekingsreactie te versterken.

In de volgende hoofdstukken van mijn proefschrift hebben we een unieke interactie tussen het ontstaan van hart- en vaatziekten en de behandeling van kanker bestudeerd. Er is een sterke correlatie tussen radiotherapiebehandeling en een verhoogd risico op hart- en vaatziekten op lange termijn bij borstkanker, Hodgkinlymfoom en hoofd/hals kankerpatiënten. Uit vorige experimentele studies van onze groep is gebleken dat lokale bestraling van de halsslagaders van jonge *ApoE*^{-/-} muizen de ontwikkeling van atherosclerose versnelt en verergert. In **hoofdstuk 4** tonen we aan dat bestraling van reeds bestaande atherosclerotische plaques in de aortaboog van oude *ApoE*^{-/-} muizen leidde tot macrofaag-rijke plaques, met name meer pro-inflammatoire (M1) macrofagen, met meer intraplaque bloedingen en meer dode cellen. Deze plaques zijn gevaarlijk, aangezien ze kunnen scheuren en er een bloedstolsel kan ontstaan. Sinds de meeste kankerpatiënten van oudere leeftijd zijn en daardoor al atherosclerose ontwikkeld hebben, ligt het risico op complicaties, namelijk een hart- of herseninfarct, bij oudere kankerpatiënten behandeld met radiotherapie mogelijk dan ook hoger. Het is daarom - in onze verouderende samenleving - van groot belang patiënten met kanker en een hoger risico op hart- en vaatziekten te selecteren om zo de kankertherapie individueel aan te passen en preventieve maatregelen te treffen.

Borstkanker is één van de meest voorkomende kankers bij vrouwen. Elke maand krijgen bijna 1000 vrouwen in Nederland de diagnose (Netherlands Cancer Registry). Er is sterk epidemiologisch bewijs dat vrouwen met borstkanker, die behandeld zijn met radiotherapie, een verhoogd risico hebben op sterfte door een hartaandoening, waarbij het risico hoger ligt bij behandeling van de linkerborst dan bij behandeling van de rechterborst. In **hoofdstukken 5 en 6** hebben we radiotherapie geïnduceerde hartschade onderzocht in normale en atherosclerotische *ApoE*^{-/-} muizen. Hoewel de hartfunctie van deze muizen redelijk goed behouden bleef, werd voortschrijdende schade aan de kleine weerstands vaatjes in het hart gezien. Deze schade was erger na een hogere stralingsdosis en naarmate meer tijd

verliep na de behandeling. De kleine vaatjes bleken ook niet meer goed te functioneren en lekten bloedbestanddelen (o.a. albumine) in het hart. Dit was waarschijnlijk de oorzaak van een verhoogde aanwezigheid van amyloid (abnormaal afgezette eiwitvezels) en de ontwikkeling van hartfalen. Hoewel we bij de *ApoE*^{-/-} muizen geen amyloid zagen (omdat ApoE zelf een component is van amyloid), zorgden de hoge cholesterolconcentraties in het bloed van deze muizen in combinatie met 16 Gy bestraling voor meer schade aan de kleine vaatjes en een versnelde ontwikkeling van atherosclerose in de kransslagaders.

In **hoofdstuk 7** worden de belangrijkste bevindingen uit dit proefschrift en verdere onderzoeksmogelijkheden aangegeven. Onderliggende mechanismen van straling geïnduceerde hart- en vaatschade en mogelijke opties voor interventie, alsook de remming van calcineurine-NFAT interacties als immuun onderdrukkende therapie voor atherosclerose worden bediscussieerd. Concluderend kan gesteld worden dat de rol van individuele NFAT-eiwitten in de ontstekingsreactie, en hun overlap in functie, verder onderzocht moet worden om het ideale eiwit te selecteren in de behandeling van atherosclerose. Nieuwe medicijnen, die selectief de binding plaatsen van calcineurine op NFAT blokkeren en als gevolg mogelijk neveneffecten kunnen voorkomen, moeten verder ontwikkeld en getest worden. Op deze manier kan hun klinisch gebruik in de behandeling van atherosclerose verbeterd worden. Ons onderzoek heeft ook nieuwe inzichten in de pathogenese van straling geïnduceerde hart- en vaatziekten opgeleverd, die de noodzaak voor het vaststellen van individuele risicoprofielen en de ontwikkeling van klinisch preventieve maatregelen bij patiënten behandeld met radiotherapie benadrukken.

