



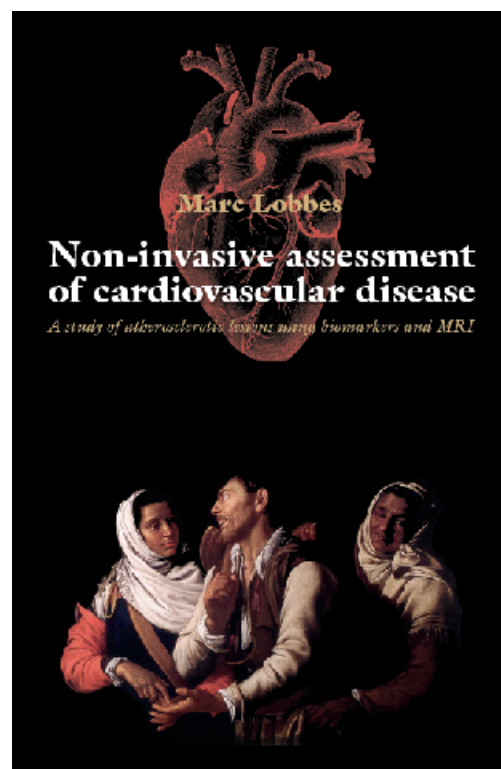
**Marc Lobbes**

CARIM	CARDiovascular Research Institute Maastricht
CRP	C-reactive protein
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Gd-DTPA	gadolinium diethylenetriamina penta-acetic acid
IL	interleukne
LDL	low-density lipoprotein
MBP	major basic protein
MPO	myeloperoxidase
MRI	magnetic resonance imaging
MONICA	multinational MONitoring of trends and determinants in CARdiovascular disease
MUMC	Maastricht Universitair Medisch Centrum
PAPP-A	pregnancy-associated plasma protein A
PIXE	proton-induced x-ray emission

## **Non-invasive assessment of cardiovascular disease: a study of atherosclerotic lesions using biomarkers and MR**

Atherosclerose is een 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 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.

Verschillende risicomodellen, zoals die bijvoorbeeld in de MONICA- of Framingham-studie beschreven zijn, werden in het verleden ontwikkeld om individuen met een groot risico van 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 schatten, maar zij zeggen niets over het kortetermijnrisico van 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 van 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 screeningmethoden. 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 contrastversterkte magnetische-resonantiebeeldvorming van atherosclerotische plaques.

### **Validatie van bekende biomarkers voor hart- en vaatziekten**

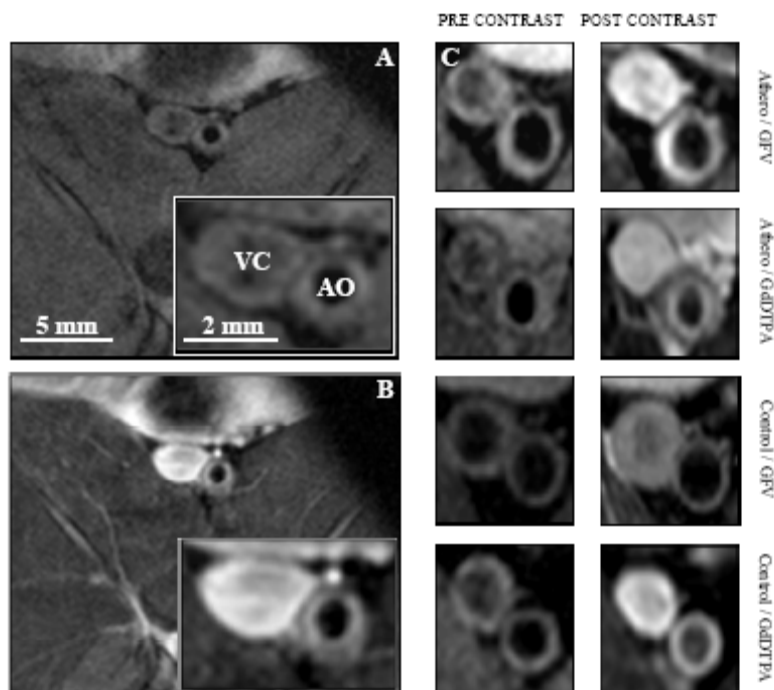
In hoofdstuk 2 wordt een systematisch overzicht gegeven van de voorspellende waarde van soluble CD40 ligand (sCD40L), interleukine-6 (IL-6) en geoxideerd low-density lipoproteïne (oxLDL) met betrekking tot hart- en vaatziekten. Deze biomarkers worden vergeleken met reeds uitgebreid onderzochte biomarkers zoals C-reactive proteïne (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 tonen wij bovendien aan dat sCD40L, IL-6 en oxLDL een vergelijkbare relatieve risico-inschatting hebben 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, stellen wij voor dat toekomstige studies een meer homogene opzet dienen te hebben om bundeling van data wel mogelijk te maken. We benadrukken 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 myeloperoxidase (MPO) en pregnancy-associated plasma proteïne A (PAPP-A) in een cohort 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 wordt in deze studie vergeleken met reeds gevestigde biomarkers zoals leukocyten, CRP en fibrinogeen. De concentraties van deze biomarkers werden ook gemeten na zes 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. Een recent ontwikkelde nieuwe aanpassing in de methode om PAPP-A te bepalen, meet specifiek het PAPP-A dat geen complex vormt met proMBP. 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).

## Contrastversterkte MRI van atherosclerose in konijnaorta's met behulp van gadofosveset

In hoofdstuk 4 onderzochten wij het potentieel van het albuminebindende 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 lichaamsslagader (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-resonantieafbeeldingen. 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 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 (*Figuur 1*).



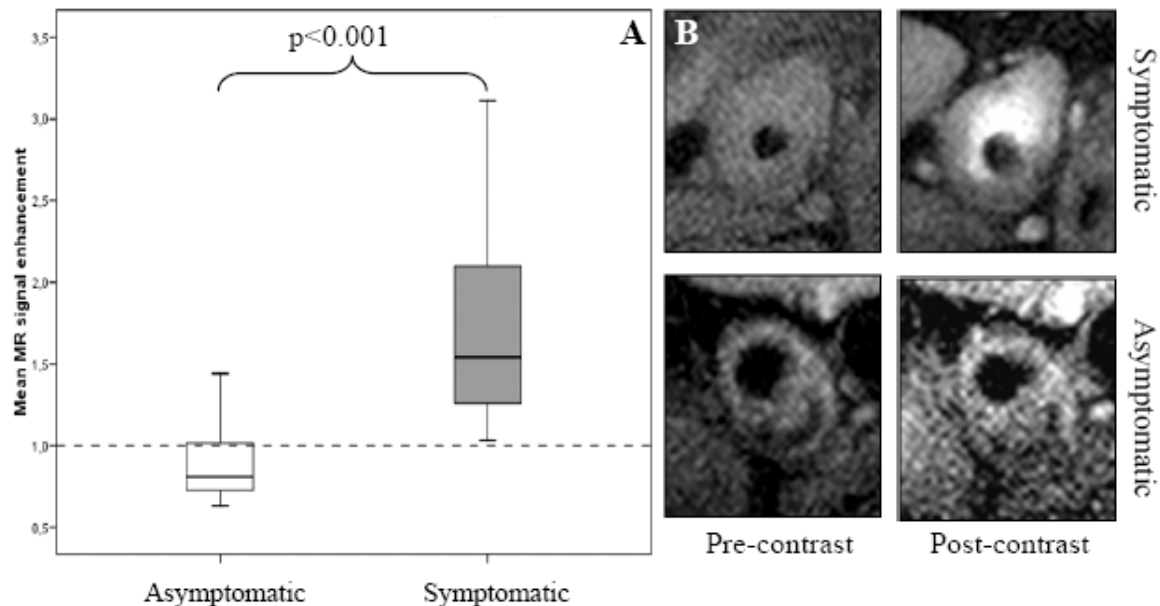
Figuur 1. Overzicht van typische voorbeelden van pre- (A) en postcontrast (B) -afbeeldingen. (C) Gedetailleerde afbeeldingen van alle studiegroepen tonen signaalversterking na toediening van contrast m.u.v. van controledieren die gadofosveset kregen. AO=aorta; VC=vena cava inferior; GFV=gadofosveset

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 waren 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 voor 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- resonantiebeeldvorming van atherosclerose veelbelovend is bij het afbeelden van humane atherosclerotische vaatwanden.

### Contrastversterkte MRI van humane atherosclerose van de a. carotis communis met behulp van het albuminebindende contrastmiddel gadofosveset

In hoofdstuk 5 laten 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 a. 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; *Figuur 2*).



Figuur 2. (A) Box plots van verschillen in signaalversterking tussen asymptomatische (wit) en symptomatische (grijs) patiënten. (B) Voorbeelden van MR-afbeeldingen van symptomatische en asymptomatische patiënten.

Histologische analyse van de plaques van de halsslagader (verwijderd tijdens de operatie) liet geen correlatie zien tussen MR-signaalversterking en de verschillende weefselcomponenten in de plaque. Bovendien werd er geen correlatie aangetoond tussen MR-signaalversterking en de dichtheid van de microvaatjes in de plaque. Toch 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.

### Conclusie en beschouwing

In dit proefschrift tonen 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 multimarker-benadering voor de voorspelling van hart- en vaatziekten aan.

Dit proefschrift toont ook aan dat het albuminebindende contrastmiddel gadofosveset een groot potentieel heeft bij de magnetische-resonantiebeeldvorming van atherosclerose. Initiële resultaten laten zien dat gadofosveset in staat is onderscheid te maken tussen atherosclerotische en gezonde bloedvatwanden van konijnaorta's, en tussen symptomatische en asymptomatische patiënten met significante vernauwing van de halsslagader. Wij zijn van mening dat toepassing van gadofosveset bij de beeldvorming van plaques veelbelovend is. Toekomstige studies zouden de mogelijkheid moeten onderzoeken om patiënten met een hoog risico van cardiovasculaire complicaties (zoals beroerte) te identificeren aan de hand van gadofosveset-versterkte magnetische-resonantiebeeldvorming, 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-resonantiebeeldvorming 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.

Maastricht, 23 september 2009

**Dr. M. Lobbes**

*Promotoren:*

Prof.dr. J.M.A. van Engelshoven,

emeritus hoogleraar radiologie MUMC

Prof.dr. M.J.A.P. Daemen,

patholoog (CARIM Maastricht)

*Copromotoren:*

Mw. dr. S. Heeneman

Mw. dr. M.E. Kooi

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.