

Angiotensin II and vascular growth in vivo : the role of the alpha1-adrenoreceptor

Citation for published version (APA):

van Kleef, E. M. (1993). *Angiotensin II and vascular growth in vivo : the role of the alpha1-adrenoreceptor*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19931210ek>

Document status and date:

Published: 01/01/1993

DOI:

[10.26481/dis.19931210ek](https://doi.org/10.26481/dis.19931210ek)

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

Restenosis following PTCA is a major clinical problem and seriously limits the efficacy of the procedure. Although SMC proliferation and ECM production are considered characteristics of the restenotic lesion, the regulation of SMC proliferation and ECM production are just beginning to be elucidated. The balloon injury model of the rat carotid artery is a common model to simulate PTCA procedures and study the regulation of SMC proliferation after angioplasty. At least in this rat model, there is now accumulating evidence that AngII is an important regulator of SMC growth. In this thesis the mechanism of AngII induced SMC DNA synthesis is studied, with special attention for the role of α_1 -adrenoreceptors herein. We investigated the effects of AngII infusion and the interaction with the α_1 -adrenoreceptor in non-balloon injured WKY rats (chapters 4, 5 and 7) and in balloon-injured WKY rats. In the latter case, the left carotid artery was balloon injured and 14 days later, when a neointima had been formed, drugs were infused. This so called "restimulation model" enables us to dissociate the effects of the drugs on medial and neointimal SMC DNA synthesis.

In our studies we used the thymidine analogue BrdUrd to measure SMC DNA synthesis. Since most studies in the rat balloon injury model use [3 H]TdR to label SMC DNA synthesis, we validated the BrdUrd labeling method (chapter 3). Dual labeling by continuous infusion during 4 days with both [3 H]TdR and BrdUrd immediately after balloon injury of the rat thoracic aorta showed that more than 80% of all labeled cells were labeled with both [3 H]TdR and BrdUrd, suggesting that BrdUrd labeling is a good alternative for [3 H]TdR labeling.

Continuous AngII infusion during 14 days induces SMC DNA synthesis in the media of the thoracic aorta (chapter 4). The α_1 -adrenoreceptor is involved in the induction of medial SMC DNA synthesis by AngII and this effect seems to be blood pressure independent, since coinfusion with the α_1 -adrenoreceptor antagonist prazosin reduces the AngII induced increase in SMC DNA synthesis, while the systolic blood pressure remains elevated. AngII also induces SMC DNA synthesis in main branches of the aorta (chapter 5). We investigated the carotid, the renal, the femoral artery and the superior mesenteric artery. Intervascular heterogeneity was observed in the amount of SMC DNA synthesis induced by AngII. The renal artery was the most sensitive to stimulation with AngII. Also in these arteries a role for the α_1 -adrenoreceptor is implicated since coinfusion with prazosin reduced SMC DNA synthesis in all but one artery, the superior mesenteric artery.

In the balloon injured rat carotid artery AngII infusion induces a significant rise in SMC DNA synthesis in both media and neointima (chapter 6). The effect is much more pronounced in the neointima than in the media, implicating intravascular heterogeneity in growth response. To investigate the possible involvement of the α_1 -adrenoreceptor in neointimal SMC DNA synthesis induced by AngII, another

α_1 -adrenoreceptor antagonist doxazosin was coinfused with AngII. In the non-injured right carotid media, doxazosin reduced the AngII induced SMC DNA synthesis, supporting our previous findings (chapter 4 and 5) and showing that this effect is class specific and not substance specific. However, α_1 -adrenoreceptor blockade with doxazosin did not reduce the AngII induced SMC DNA synthesis in the neointima.

To investigate whether stimulation of the α_1 -adrenoreceptor alone could stimulate SMC DNA synthesis in the media of the thoracic aorta and its main branches (carotid, renal, femoral and superior mesenteric artery) we infused the α_1 -adrenoreceptor agonist phenylephrine and compared it with the effects of AngII infusion (chapter 7). We used young, 6 week old WKY rats, since significant differences in SMC DNA synthesis in the media of large arteries were demonstrated between normotensive WKY rats and spontaneously hypertensive rats at this age. Phenylephrine induced an increase in SMC DNA synthesis in the media of the thoracic aorta, but had no effects in other arteries investigated. AngII infusion did not increase SMC DNA synthesis in these arteries. Stimulation of the α_1 -adrenoreceptor with phenylephrine in adult WKY rats of which the left carotid artery was previously balloon injured, did only increase SMC DNA synthesis in the non-injured right carotid media. No increase in SMC DNA synthesis was found in the media or neointima of the injured left carotid artery (chapter 8). The data in chapters 6-8 suggest that the α_1 -adrenoreceptor is involved in the regulation of SMC DNA synthesis in the non-injured media, but not in the medial and neointimal SMC after balloon injury of the left carotid artery. Since phenylephrine infusion has been suggested to stimulate the release of NO, the lack of effect of phenylephrine on SMC DNA synthesis might be due to antiproliferative effects of NO. NO synthesis inhibition with N^g-nitro L-arginine methylester (L-NAME) did however not increase the SMC DNA synthesis by phenylephrine, suggesting that NO is not involved in the phenylephrine induced SMC DNA synthesis.

In order to extend our view to other vessel "compartments" that might play a role in structure, we also studied the effects of AngII infusion on the extracellular matrix components elastin and collagen, that compromise a large part of the vessel volume (chapter 9). AngII infusion increased the synthesis of both elastin and collagen type I and III mRNA but only in the carotid neointima, whereas no effects of AngII were found in the media. AngII infusion did not change the relative amounts of elastin and collagen protein. An increase in the absolute collagen protein amount was demonstrated in the carotid neointima, but only by morphometric analysis. The data suggest that the effects of AngII on the extracellular matrix components elastin and collagen have a different time span than the effects of AngII on vascular SMC DNA synthesis, and that the effects of AngII may be different between media and neointima.

Altogether, the results in this thesis show that AngII stimulates SMC DNA synthesis and indicate that one pathway involves the α_1 -adrenoreceptor. The involvement of the α_1 -adrenoreceptor in the regulation of AngII induced SMC DNA synthesis are, however, heterogeneous not only within the vessel (media vs. neointima, SMC vs. extracellular matrix), but also in between vessels (different arteries, e.g. the thoracic aorta and its main branches), and in time (young vs. adult rats).

SAMENVATTING

Restenose na percutane transluminale coronaire angioplastie (PTCA, ook wel ballondilatatie of "dotteren" genoemd) vormt een groot klinisch probleem en beperkt in ernstige mate de efficiëntie van de behandeling. Hoewel verondersteld wordt dat proliferatie van gladde spiercellen en productie van extracellulaire matrix (ECM) belangrijke kenmerken zijn van de restenotische lesie, zijn de regulatiemechanismen nog niet opgehelderd. Een veel gebruikt diermodel om het restenose proces te simuleren en de regulatie van de proliferatie van gladde spiercellen te bestuderen is het ballondenudatie model in de arteria carotis communis (halsslagader) van de rat. Uit andere studies is gebleken dat in dit experimentele rattenmodel het eiwit angiotensine II (AngII) een belangrijke regulerende stof vormt in de groei van gladde spiercellen. In dit proefschrift wordt het mechanisme onderzocht waarop AngII de proliferatie van gladde spiercellen stimuleert met speciale aandacht voor de rol van de α_1 -adrenoreceptoren in dit proces. We hebben de effecten van AngII infusie en de rol van de α_1 -adrenoreceptor bestudeerd in de vaatwand van niet-ballongedenudeerde Wistar Kyoto (WKY) ratten (hoofdstukken 4, 5 en 7) en in ballongedenudeerde WKY ratten (hoofdstukken 6 en 8). Bij de laatste groep werd de linker a. carotis van de rat ballongedilateerd en 14 dagen later, wanneer een nieuwgevormde gladde spierlaag, de zgn. "neointima" zich had gevormd, werden farmaca toegediend. Dit zgn. "restimulatie model" maakt het ons mogelijk om onderscheid te maken tussen de effecten van de farmaca op de DNA synthese in de mediale en neointimale gladde spiercel.

In de experimenten gebruikten we de thymidine analogoog 5'-bromo-2'-deoxyuridine (BrdUrd) om de DNA synthese in de gladde spiercel te meten. In het algemeen wordt echter gebruik gemaakt van radioactief gelabeld tritium thymidine ($[^3\text{H}]\text{TdR}$) om de DNA synthese in de gladde spiercel te bepalen en daarom hebben we de betrouwbaarheid van de BrdUrd labelings methode onderzocht (hoofdstuk 3). Gelijktijdige toediening van beide labels, BrdUrd en $[^3\text{H}]\text{TdR}$, door continue infusie gedurende 4 dagen direct na ballondilatatie van de thoracale aorta van de rat toonde aan dat meer dan 80% van alle gelabelde cellen met zowel $[^3\text{H}]\text{TdR}$ als BrdUrd gelabeld waren. Dit suggereert dat de BrdUrd labeling methode een goed alternatief vormt voor de radioactieve methode, die veel tijd kost en duur is.

Continue infusie met AngII gedurende 14 dagen stimuleert de DNA synthese in de gladde spiercel in de media van de thoracale aorta (hoofdstuk 4). De α_1 -adrenoreceptor is betrokken bij de inductie van de DNA synthese in de mediale gladde spiercel en dit effect lijkt onafhankelijk te zijn van de bloeddruk, aangezien coïnfusie met de α_1 -adrenoreceptor antagonist prazosine de AngII geïnduceerde DNA synthese in de gladde spiercel reduceert, terwijl de bloeddruk verhoogd blijft. Behalve in de media van de thoracale aorta, induceert AngII ook DNA synthese in de gladde spiercel in de hoofdtakken van de aorta (hoofdstuk 5). Wij bestudeerden

de arteria carotis, a. renalis (nierarterie), a. femoralis (dijbeenarterie) en de a. superior mesenterica (darmarterie). De mate van DNA synthese in de gladde spiercel verschilde per arterie, hetgeen duidt op intervasculaire heterogeniteit. De a. renalis was het meest gevoelig voor stimulatie met AngII. In de bestudeerde arteriën bleek ook de α_1 -adrenoreceptor een rol te spelen, aangezien de coinfusie met prazosine de DNA synthese in de gladde spiercel in alle vaten reduceerde, behalve in de a. superior mesenterica.

In de ballongedilateerde a. carotis induceerde AngII een significante toename in DNA synthese in de gladde spiercel in zowel de media als in de neointima (hoofdstuk 6). Het effect op de neointima was veel groter dan op de media, hetgeen duidt op een intravasculaire heterogeniteit in de groeirespons. Om de mogelijke betrokkenheid van de α_1 -adrenoreceptor in de neointimale DNA synthese in de gladde spiercel te onderzoeken werd een andere α_1 -adrenoreceptor antagonist doxazosine (i.p.v. prazosine) tesamen met AngII toegediend. In de niet beschadigde rechter a. carotis, reduceerde doxazosine de DNA synthese in de gladde spiercel in de media, hetgeen onze voorgaande bevindingen uit hoofdstuk 4 en 5 bevestigt. De α_1 -adrenoreceptor blokkade met doxazosine reduceerde echter niet de door AngII geïnduceerde DNA synthese in de gladde spiercel in de neointima.

Om te onderzoeken of directe stimulatie van de α_1 -adrenoreceptor de DNA synthese in de gladde spiercel kan induceren in de media van de thoracale aorta en zijn hoofdtakken (a. carotis, a. renalis, a. femoralis en a. mesenterica superior) werd de α_1 -adrenoreceptor agonist fenylephrine toegediend (continu infuus) en vergeleken met de effecten van AngII (hoofdstuk 7). Voor deze studie werden 6 weken oude WKY ratten gebruikt, aangezien significante verschillen in de DNA synthese in de gladde spiercel zijn aangetoond tussen WKY ratten en spontaan hypertensieve ratten op deze leeftijd. Fenylephrine induceerde een significante toename in de DNA synthese in de gladde spiercel in de media van de thoracale aorta, maar had geen effect op de DNA synthese in de andere bestudeerde arteriën. Stimulatie van de α_1 -adrenoreceptor met fenylephrine in volwassen WKY ratten waarvan de linker a. carotis 14 dagen tevoren was ballongedilateerd, had alleen effect op de DNA synthese in de mediale gladde spiercel in de onbeschadigde rechter a. carotis. Fenylephrine induceerde geen DNA synthese in de gladde spiercel in de media of neointima van de beschadigde linker a. carotis (hoofdstuk 8). De resultaten van hoofdstuk 6-8 suggereren dat de α_1 -adrenoreceptor betrokken is bij de regulatie van de DNA synthese in de gladde spiercel in de onbeschadigde media, maar niet in de mediale en neointimale gladde spiercel na ballondilatatie van de linker a. carotis. Aangezien verondersteld wordt dat fenylephrine de afgifte van stikstofdioxide (NO) kan stimuleren, zou het onvermogen van fenylephrine om de DNA synthese in de gladde spiercel te kunnen stimuleren, misschien te wijten zijn aan de proliferatie-remmende eigenschappen van NO. NO synthase inhibitie met de N^g-nitro L-arginine methylester (L-NAME) stimuleerde de DNA synthese

in de gladde spiercel met fenylephrine echter niet, zodat NO waarschijnlijk niet betrokken is bij de DNA synthese onder invloed van fenylephrine.

De effecten van AngII op de extracellulaire matrix componenten elastine en collageen, die een belangrijk deel van het vaatwand volume in beslag nemen en van belang zijn voor de vaatwandstructuur, zijn in hoofdstuk 9 bestudeerd. AngII infusie stimuleerde de synthese van elastine en collageen type I en type III mRNA in de neointima, terwijl geen effecten van AngII werden gevonden in de media. AngII infusie veranderde de relatieve hoeveelheid elastine en collageen eiwit niet. Uit morphometrische analyse bleek een toename in de absolute hoeveelheid collageen eiwit in de neointima. De resultaten suggereren dat de effecten van AngII op de extracellulaire matrix componenten elastine en collageen op een ander tijdstip optreden dan de effecten van AngII op de DNA synthese in de gladde spiercel, en dat de effecten verschillen tussen de media en de neointima.

Samenvattend geven de resultaten in dit proefschrift aan dat AngII de DNA synthese in de gladde spiercel stimuleert en dat de α_1 -adrenoreceptor hierbij betrokken is. De betrokkenheid van de α_1 -adrenoreceptor in de regulatie van de door AngII geïnduceerde DNA synthese in de gladde spiercel is echter heterogeen, niet alleen in de vaatwand (media vs. neointima, gladde spiercel vs. extracellulaire matrix), maar ook tussen verschillende vaten (de thoracale aorta vs. zijn hoofdtakken), en in de tijd (jonge vs. volwassen ratten).