

# Stretch-mediated cardiac hypertrophy and extracellular matrix remodelling

## Citation for published version (APA):

Blaauw, E. (2013). *Stretch-mediated cardiac hypertrophy and extracellular matrix remodelling*. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht.

## Document status and date:

Published: 01/01/2013

## 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

Overload of the heart due to systemic hypertension or valvular defects often results in enlargement of cardiomyocytes (hypertrophy) and increase in connective tissue (fibrosis) of the cardiac muscle. Chapter 1 provides a summary of the goals of the research presented in this thesis. One of the main objectives of this thesis was to investigate which trigger is primarily responsible for the development of cardiac hypertrophy and fibrosis *in vitro* and *in vivo*: mechanical strain (physical load) and / or growth factors (biochemical compounds).

In **Chapter 2**, the current scientific literature on the effects of mechanical stress (strain) and growth factors on the processes of cardiac hypertrophy and fibrosis is summarized. Specifically the possible involvement of angiotensin II (AngII), Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) and Transforming Growth Factor-beta (TGF $\beta$ ) therein is described. These three factors can be produced as both autocrine (produced by the same cell type, whereon it also exerts a biological effect) as paracrine produced by cell type A, but with a biological effect on cell type B, which is situated in the vicinity of the producing cell) factor. Furthermore, a description was given how cardiomyocytes and fibroblasts possibly detect changes in hemodynamic loading, and how they convert mechanical signals in intracellular biochemical signals. The conclusion of chapter 2 is that it is still unclear which activator (mechanical or biochemical) is primarily responsible for initiation of the hypertrophic process. This uncertainty seems partly be caused by the fact that most research has been done on neonatal cardiac cells and hearts of small rodents. There are, however, strong indications that hearts and cardiac muscle cells of humans and rodents differ considerably and so do neonatal and adult cells. In contrast, the adult rabbit heart has more similarities with the human heart. Therefore, hearts and cardiac cells of adult rabbits were used in all experiments described in this thesis.

**Chapter 3** describes an improved technique how to isolate and culture adult rabbit cardiomyocytes (heart muscle cells) and fibroblasts (connective tissue cells). The improved technique has led to a standardized protocol in which rod-shaped rabbit cardiomyocytes can be cultured for up to 4 days, and subjected to 10% cyclic equibiaxial strain (1 Hz) for 48 hours on silicone membranes. Using these *in vitro* culture and strain settings, it is possible to mimic overload-mediated cardiac hypertrophy and fibrosis *in vivo*.

**Chapter 4** describes the hypertrophic effect of cyclic stretch on rabbit cardiomyocytes. Cyclic stretch results in a hypertrophic response, characterized by a significant increase in cell surface, protein synthesis and transcription of hypertrophy marker Brain Natriuretic Peptide (BNP). Interestingly, pharmacological inhibition of the AngII type-1

receptor has no influence on the stretch-induced hypertrophy response. The effect of AngII and other autocrine or paracrine factors on cardiac hypertrophy was investigated in unstretched rabbit cardiomyocytes, which were exposed to in the literature described hypertrophic growth factors AngII, TGF $\beta$ 1 and IGF-1. These factors appeared to have no influence on the BNP mRNA expression. In addition, there are indications that stretched fibroblasts produce as yet unidentified growth factors that affect the transcription of hypertrophy marker BNP in cardiomyocytes. In summary, the findings in Chapter 4 show that cyclic stretch plays a crucial role in cardiomyocyte hypertrophy and that this stretch-mediated response is independent from autocrine and paracrine factors, such as AngII, TGF $\beta$ 1 and IGF-1.

In the overloaded heart, hypertrophic growth is often associated with increased deposition of fibrotic material. Fibrosis of the heart muscle is characterized by excessive production and incorporation of collagens and matricellular proteins in the interstitial space of the heart muscle, such as collagen-1, collagen-3, Connective Tissue Growth Factor (CTGF) and fibronectin. Mainly fibroblasts are responsible for the production and deposition of these extracellular matrix (ECM) proteins. However, it is still unclear which stimulus is primarily responsible for the activation of fibroblasts to excrete these ECM proteins. **Chapter 5** describes how rabbit fibroblasts respond to cyclic stretch and exposure to growth factors, such as AngII, TGF $\beta$ 1 and IGF-1. Cyclic stretch of fibroblasts appears to have a direct impact on the transcription of ECM proteins, such as fibronectin and CTGF. In addition, cyclic stretch also increases the transcription of the growth factors TGF $\beta$ 1 and IGF-1. Direct exposure of fibroblasts to TGF $\beta$ 1 or IGF-1 results in activation of a regulating system, wherein (autocrine) TGF $\beta$ 1 and IGF-1 increase their own expression via a positive feedback loop. On the other hand, AngII induces both ECM proteins (collagen-1, collagen and fibronectin) and growth factors (TGF $\beta$ 1 and IGF-1). Furthermore, Chapter 5 describes that cardiomyocytes and fibroblasts can communicate via as yet unidentified factors released during stretching of these cells.

**Chapter 6** shows that cardiomyocytes from adult hearts might contribute to changes in the ECM, since cyclic stretch increases the expression of CTGF. In addition, there are indications that TGF $\beta$ 1 is involved in the induction of CTGF in rabbit cardiomyocytes. As described in Chapter 5 for fibroblasts, also rabbit cardiomyocytes possess a positive feedback system for the expression of TGF $\beta$ 1. In contrast, AngII has an inhibitory effect on the transcription of TGF $\beta$ 1. Remarkably, stretched fibroblasts also produce substances that stimulate cardiomyocyte transcription of CTGF. On basis of these data, it can be stated that TGF $\beta$ 1 probably plays an important role as autocrine and paracrine factor in cardiomyocytes and fibroblasts in the adult rabbit heart. After the description of the stretch-mediated hypertrophy and fibrosis response of rabbit cardiomyocytes and fibroblasts *in vitro*, the translation to an intact animal model is made.

**Chapter 7** describes a rabbit model in which asymmetric hypertrophy (i.e., regionally different) is induced by electrical stimulation (pacing) of the left ventricle. From literature it is known that pacing results in regional differences in stretch and in me-

chanical stresses. This *in vivo* model is therefore closely related to the *in vitro* model of stretching cardiac cells. The finding that pacing induces hypertrophy *in vivo*, supports the *in vitro* finding that stretch is a stimulus for hypertrophy. In contrast to the *in vitro* results, systemic administration of a specific AngII type-1 receptor (AT-1) blocker prevented the pacing induced asymmetric left ventricular hypertrophy *in vivo*. The complexity of the *in vivo* model was further underlined by the fact that the asymmetric hypertrophy was not accompanied by regional differences in the transcription of BNP, CTGF and TGF $\beta$ 1, and that their expression levels was not affected in AT-1 blocker-treated animals. These results point to the presence of a complex relationship between still unknown systemic circulating and locally in the heart produced autocrine and paracrine factors, which are involved in the process of asymmetric hypertrophy. It cannot be ruled out that the hypertrophy markers under investigation describe the initiation of tissue growth, but are not representative of long-term hypertrophy as assessed in this *in vivo* animal model.

In **Chapter 8** the results described in this thesis were placed in the light of the existing literature. In addition, new research questions were formulated and recommendations for future studies were done. In summary, this thesis shows new insights into the underlying mechanisms that may be involved in the process of stretch-mediated cardiac hypertrophy and fibrosis. These findings may ultimately help to identify new therapeutic targets and improving existing therapies for the treatment of cardiac diseases.



# Samenvatting

Overbelasting van het hart door bijvoorbeeld hoge bloeddruk of klepgebreken leidt veelal tot vergroting (hypertrofie) en verbindweefseling (fibrose) van de hartspier. Hoofdstuk 1 geeft een opsomming van de doelen van het onderzoek dat in dit proefschrift beschreven wordt. Een van de belangrijkste doelstellingen van dit proefschrift was om te onderzoeken wat de primaire oorzaak is voor het ontstaan van cardiale hypertrofie en fibrose *in vitro* en *in vivo*: mechanische rek (belasting) of groeifactoren.

In **Hoofdstuk 2** wordt de bestaande wetenschappelijke literatuur samengevat inzake de effecten van mechanische overbelasting (rek) en groeifactoren op cardiale hypertrofie en fibrose. Er wordt specifiek ingegaan op de mogelijke betrokkenheid van angiotensine II (AngII), Insulin-like Growth factor-1 (IGF-1) en Transforming Growth factor-beta (TGF $\beta$ ) in deze processen. Deze drie biochemische verbindingen kunnen zowel autocrien (geproduceerd door hetzelfde celtype waar het ook een biologische werking op heeft) als paracrien (geproduceerd door celtype A, maar met een biologische effect op celtype B dat gelegen is in de nabijheid van de producerende cel) van aard zijn. Daarnaast wordt een beschrijving gegeven hoe cardiomyocyten en fibroblasten mogelijk de veranderingen in hemodynamische belasting waarnemen en deze omzetten in biochemische signalen. De conclusie van hoofdstuk 2 is dat het op grond van bestaande literatuur nog steeds onduidelijk is welke factor (mechanisch of biochemisch) primair verantwoordelijk is voor initiatie van het hypertrofisch proces. Deze onduidelijkheid lijkt mede veroorzaakt te worden doordat veel onderzoek gedaan is met cellen en harten van ratten en muizen, veelal zelfs uit pas geboren dieren. Er zijn evenwel sterke aanwijzingen dat harten en hartspiercellen van mensen en die van kleine knaagdieren aanzienlijk van elkaar verschillen. Het konijnhart vertoont meer overeenkomsten met het menselijk hart. Daarom is in dit onderzoek gekozen om gebruik te maken van harten en hartcellen van volwassen konijnen.

**Hoofdstuk 3** beschrijft een verbeterde isolatie en optimale kweekmethode van volwassen konijnen- cardiomyocyten (hartspiercellen) en fibroblasten (bindweefselcellen). De verbeterde methode heeft ertoe geleid dat volwassen cardiomyocyten en fibroblasten 4 dagen te kweken zijn op een flexibele siliconenondergrond en 48 uur lang cyclisch kunnen worden opgerekt met 10% lengte verandering bij een frequentie van 1Hz. Door gebruik te maken van deze *in vitro* kweek- en rekmethoden is het mogelijk om veranderingen in mechanisch belaste volwassen konijnencardiomyocyten en fibroblasten te bestuderen.

In **hoofdstuk 4** wordt beschreven dat het cyclisch oprekken van volwassen konijnencardiomyocyten leidt tot een hypertrofische reactie, gekarakteriseerd door een

significante toename in celoppervlak, eiwitsynthese en transcriptie van de hypertrofie-marker Brain Natriuretic Peptide (BNP). Opvallend was dat farmacologische blokkering van de AngII type-1 receptor geen invloed heeft op de rek-geïnduceerde hypertrofie van volwassen konijnencardiomyocyten. Om de rol van AngII en andere autocriene dan wel paracriene factoren uit te sluiten, zijn ongerekte cardiomyocyten blootgesteld aan, in de literatuur beschreven, hypertrofie stimulerende groeifactoren zoals AngII, TGF $\beta$ 1 en IGF-1. Deze bleken geen invloed te hebben op de BNP mRNA expressie. Daarnaast zijn er wel aanwijzingen gevonden dat gerekte fibroblasten niet nader geïdentificeerde groei factoren produceren die de transcriptie van de hypertrofie marker BNP in cardiomyocyten verhogen. Kortom, de bevindingen in hoofdstuk 4 laten zien dat cyclische rek een cruciale rol speelt in cardiomyocyt hypertrofie en dat deze rek-gemedieerde respons in volwassen cardiomyocyten onafhankelijk is van autocriene en paracriene factoren zoals AngII, TGF $\beta$ 1 en IGF-1.

In het overbelaste hart gaat hypertrofische groei vaak samen met fibrose. Het fibrotiseren van de hartspier wordt gekenmerkt door overmatige productie en inbouw van collagenen en matricellulaire eiwitten in de interstitiële ruimte van de hartspier, zoals collageen-1, collageen-3, Connective Tissue Growth factor (CTGF) en fibronectine. Voornamelijk fibroblasten zijn verantwoordelijk voor de productie en depositie van deze extracellulaire matrix (ECM) eiwitten. Het is echter onduidelijk welke stimulus primair verantwoordelijk is voor de activatie van fibroblasten om deze eiwitten aan te maken. In **hoofdstuk 5** wordt beschreven hoe volwassen konijnenfibroblasten reageren op cyclische rek en blootstelling aan groeifactoren, zoals AngII, TGF $\beta$ 1 en IGF-1. Het cyclisch oprekken van fibroblasten blijkt directe invloed te hebben op de transcriptie van ECM eiwitten, zoals CTGF en fibronectine. Naast de beïnvloeding van de expressie van deze eiwitten door rek, blijkt dat rek de transcriptie beïnvloedt van de groeifactoren TGF $\beta$ 1 en IGF-1. Directe blootstelling van fibroblasten aan TGF $\beta$ 1 dan wel IGF-1 resulteert in activatie van een regulerend systeem, waarbij TGF $\beta$ 1 en IGF-1 door positieve feedback langs autocriene weg hun eigen expressie verhogen. Aan de andere kant induceert AngII zowel ECM eiwitten (collageen-1, collageen-3 en fibronectine) als groeifactoren (TGF $\beta$ 1 en IGF-1). Verder wordt in hoofdstuk 5 beschreven dat fibroblasten en cardiomyocyten kunnen communiceren via vooralsnog onbekende factoren die vrijkomen bij het oprekken van deze cellen.

**Hoofdstuk 6** beschrijft dat volwassen cardiomyocyten mogelijk kunnen bijdragen aan veranderingen in de ECM ten gevolge van rek, omdat cyclische rek de expressie van CTGF in de cardiomyocyte verhoogt. Daarnaast zijn er aanwijzingen gevonden dat TGF $\beta$ 1 een belangrijke transcriptie activator is voor de inductie van CTGF in dit celtype. Zoals in hoofdstuk 5 beschreven voor fibroblasten, bevatten ook volwassen cardiomyocyten een positief feedback systeem voor de expressie van TGF $\beta$ 1. Daarentegen heeft AngII een remmende werking op de transcriptie van TGF $\beta$ 1. Opmerkelijk is dat gerekte fibroblasten ook stoffen produceren die de cardiomyocyten aanzetten tot transcriptie van CTGF. Op grond van deze gegevens kan gesteld worden dat TGF $\beta$ 1 waarschijnlijk

een belangrijke rol speelt als autocriene en paracriene factor voor cardiomyocyten en fibroblasten in het volwassen konijnenhart.

Na het beschrijven van de rek-gemedieerde hypertrofie en de fibrose response van volwassen konijnencardiomyocyten en fibroblasten *in vitro*, is de vertaalslag naar een intact diermodel gemaakt. In **hoofdstuk 7** wordt een konijnenmodel beschreven waarin asymmetrische (dwz regionaal verschillende) hypertrofie wordt opgewekt door elektrisch stimuleren (pacen) van de linker ventrikel. Uit de literatuur is bekend dat door het pacen regionale verschillen in rek en mechanische belasting ontstaan. Dit *in vivo* model is dus nauw verwant aan het *in vitro* model van gerekte cellen. De bevinding dat *in vivo* pacen lokale hypertrofie opwekt ondersteunt daarmee de bevinding in het *in vitro* model dat rek een prikkel voor hypertrofie is. Echter, in tegenstelling tot wat *in vitro* gevonden werd, bleek dat *in vivo* systemische toediening van een specifieke AngII type-1 receptor (AT-1) blokker de pacing geïnduceerde asymmetrische linker ventrikel hypertrofie voorkwam. De complexiteit van het *in vitro* model bleek verder uit het feit dat de asymmetrische hypertrofie niet gepaard ging met regionale verschillen in de expressie van BNP, CTGF en TGF $\beta$ 1, en dat in de met AT-1 blokker behandelde dieren de expressieniveaus niet significant veranderden. Hieruit blijkt dat er vermoedelijk een gecompliceerde relatie bestaat tussen nog steeds onbekende systemische circulerende en lokaal in het hart geproduceerde autocriene en paracriene factoren die betrokken zijn in het proces van asymmetrische hypertrofie. Ook kan niet uitgesloten worden dat de beschreven hypertrofie markers de initiatie van weefsel toename beschrijven en niet representatief zijn voor langdurige hypertrofie zoals onderzocht in dit *in vivo* diermodel.

In **Hoofdstuk 8** worden de resultaten in de verschillende experimentele hoofdstukken besproken, onderling en in het licht van de bestaande literatuur. Daarnaast worden nieuwe onderzoeksvragen geformuleerd en aanbevelingen gedaan voor vervolgstudies. Samenvattend heeft dit proefschrift nieuwe inzichten gegeven in de onderliggende mechanismen die mogelijk betrokken zijn bij het ontstaan van rek-gemedieerde cardiale hypertrofie en fibrose. Deze bevindingen kunnen uiteindelijk bijdragen aan het vinden van nieuwe therapeutische aangrijpingspunten of verbeteren van bestaande therapieën voor de behandeling van cardiale ziekten.