

Structural changes in chronic hibernating myocardium: aspects of dedifferentiation

Citation for published version (APA):

Ausma, J. (1997). *Structural changes in chronic hibernating myocardium: aspects of dedifferentiation*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19970425ja>

Document status and date:

Published: 01/01/1997

DOI:

[10.26481/dis.19970425ja](https://doi.org/10.26481/dis.19970425ja)

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

Hibernating myocardium is a state of persistently impaired myocardial dysfunction at rest, due to reduced coronary blood flow that can be partially or completely restored to normal either by having the blood flow improved or the oxygen demand reduced. In **Chapter 1** we document the morphologic changes underlying this chronic ischemic state of the myocardium. Studies on the ultrastructure of chronic hibernating myocardium have shown that cardiomyocytes undergo the following typical structural alterations: 1) Loss of contractile material (sarcomeres). The depletion of sarcomeres is seen initially in the perinuclear region and often extends towards the periphery of the cell; 2) Accumulation of glycogen in the myolytic cytosol; 3) Presence of numerous small doughnut-like mitochondria in the areas adjacent to the glycogen-rich perinuclear zones; 4) Redistribution of heterochromatin in nuclei of hibernating cells; 5) Depletion of organized sarcoplasmic reticulum. 6) Fragments of rough endoplasmic reticulum are frequently found; 7) Virtual absence of T-tubules. These morphological aspects are reminiscent of embryonic/fetal cells. Typical degenerative changes, such as cytoplasmic vacuolization, cytosolic edema, mitochondrial swelling, membrane disruption, accumulation of secondary lysosomes, membrane whorls, and lipid droplets are virtually absent. To find support for the hypothesis that cardiomyocytes dedifferentiate in chronic hibernating myocardium, we studied the expression and organization patterns of some markers of cardiomyocyte differentiation. The staining of titin in an embryonic-like punctated pattern, the disappearance of cardiotin, a late marker of heart muscle development, and the re-expression of α -smooth muscle actin all supported the view that cardiomyocytes in chronic hibernating myocardium have acquired aspects of dedifferentiation (**Chapter 2**). The changes in the molecular organization of titin were determined by monoclonal antibodies recognizing epitopes over the whole length of the titin molecule. The epitopes close to the Z-disc and those in the center of the A-band remained detectable at all stages of hibernation, while epitopes in the A-I junctional part and the first part of the A-band are lost. These changes resemble, at least in part, the changes occurring during muscle cell differentiation, although in reverse order (**Chapter 3**). Also molecular changes at the nuclear level support the dedifferentiation hypothesis. The disappearance of A-type lamins (lamin A and C), while lamin B2 remained present in the affected cardiomyocytes, shows the resemblance with cardiomyocytes during embryonic development (**Chapter 4**).

Apart from changes to cardiomyocytes, an increase in extracellular matrix components such as collagen types I and III and fibronectin is often seen in hibernating segments. An increase in the number of vimentin-positive cells (endothelial cells and fibroblasts) is seen throughout the extended extracellular matrix of chronic hibernating myocardium. It is proposed that a close relationship exists between the ability of the myocardium to recover function and the amount of connective tissue (**Chapter 5**).

The question of reversibility of the changes will remain unanswered until an animal model becomes available in which these structural changes can be reproduced. Interestingly, the structural changes in atrial cardiomyocytes after chronic atrial fibrillation in the goat correspond to changes seen in chronic hibernating myocardium in man. The cardiomyocytes displayed loss of myofibrils, accumulation of glycogen, changes in mitochondrial shape and size, fragmentation of sarcoplasmic reticulum and dispersion of nuclear chromatin. These changes are accompanied by an increase in the size of the cardiomyocytes. Cellular degeneration is absent and, in contrast to hibernating myocardium, the interstitial space apparently remains unaltered (**Chapter 6**). These morphological changes in the atrial myocytes were verified as to their "dedifferentiation" characteristics. Studies on the expression and organisation of contractile and cytoskeletal proteins were performed as previously described for human samples (**Chapter 7**). The striking resemblance of the phenotype of these affected cardiomyocytes from goat and man indicate that sustained atrial fibrillation in goats provides a model which may also be used to study dedifferentiation phenomena occurring in patients with chronic hibernating myocardium. This model provides an opportunity to obtain a better insight into the cascade of events leading to cardiomyocyte dedifferentiation and to study the reversibility of the structural changes. The possible effects of the structural remodelling on myocardial function described above are discussed in **Chapter 8**. The observed *morphological changes indicate that the chronic hibernating myocardium is the result of dedifferentiation rather than degeneration*. Segments in which the dedifferentiated cardiomyocytes predominate, will show a delayed recovery of function, since structural remodelling to rebuild a normal amount of contractile material requires time. It may be obvious that the degree of dedifferentiation and accompanying extracellular matrix remodelling contribute to the abnormal contractile functioning and determine the ability and speed of functional recovery after revascularization.

Samenvatting

Hibernatie van het myocard is een toestand van een dysfunctioneel linkerventrikel, als reactie op een sterk verminderde hartspierdoorbloeding. De dysfunctie komt neer op een verminderde tot afwezige contractie in het slecht doorbloede deel van de hartspier. De onderliggende structuur van het hibernerend myocard was tot op heden niet of nauwelijks gekend. In **hoofdstuk 1** zijn de morfologische veranderingen die ten grondslag liggen aan de chronische hibernatie beschreven. De myocardcellen tonen een sterk veranderde structuur, gekenmerkt door: 1) Het verlies van contractiele elementen (sarcomeren); 2) De stapeling van glycogeen in het myolytische cytosol; 3) De aanwezigheid van vele kleine, ronde mitochondria aan de rand van de glycogeen-rijke zones; 4) De herverdeling van heterochromatine in de kern; 5) De vermindering van de hoeveelheid georganiseerd sarcoplasmatisch reticulum; 6) Het frequent voorkomen van fragmenten van ruw endoplasmatisch reticulum; 7) Vrijwel volledige afwezigheid van T-tubulaire instulpingen. Dit zijn tevens morfologische kenmerken van embryonale/foetale cellen. Typische degeneratieve veranderingen, zoals de vorming van cytoplasmatische vacuoles, het zwellen van de mitochondria, de aanwezigheid van membraanschade, ophoping van secundaire lysosomen, de aanwezigheid van membraanresten en lipidedruppels, worden zelden of nooit aangetroffen in het hibernerend myocard. Op basis van het bovenstaande wordt in dit proefschrift de hypothese gesteld dat cardiomyocyten in het chronisch hibernerende hart een gedifferentieerd fenotype tonen in plaats van te degenereren. Om deze theorie te ondersteunen zijn de expressie- en organisatie patronen van enkele differentiatie markers bestudeerd, zoals de typische embryonale aankleuring van titine, het verdwijnen van cardiotine, het opnieuw tot expressie komen van α -glad spiercel actine. Deze moleculaire marker studies ondersteunen de vooropgestelde hypothese dat cardiomyocyten in het chronisch hibernerend hart dedifferentiatie karakteristieken aannemen (**hoofdstuk 2**). De veranderingen in de moleculaire organisatie van titine werden vastgesteld met monoklonale antilichamen tegen epitopen gelegen over de gehele lengte van het titine molecuul. De epitopen dicht bij de Z-lijn en dicht bij het centrum van de A-band gekregen bleven aantoonbaar tijdens de verschillende stadia van hibernatie, terwijl epitopen in het A-I overgangsgebied en het eerste deel van de A-band verloren gingen. Deze veranderingen vertonen tenminste gedeeltelijk overeenkomsten met de veranderingen die optreden tijdens normale embryonale spierceldifferentiatie, zij het in omgekeerde volgorde (**hoofdstuk 3**). Ook de moleculaire veranderingen die waar te nemen zijn in de celkern ondersteunen de dedifferentiatie hypothese. Het verdwijnen van de A-type lamines (lamine A en C) tijdens hibernatie, terwijl lamine B2 aanwezig blijft in de aangedane cardiomyocyten, toont de overeenkomst met bepaalde stadia van de embryonale hart ontwikkeling (**hoofdstuk 4**).

Naast de veranderingen in de cardiomyocyten, wordt vaak een toename van de extracellulaire matrix-componenten, zoals collageen (type I en III) en fibronectine,

gezien in de hibernerende hart segmenten. Tevens wordt een toename van het aantal vimentine-positieve cellen (endotheel cellen en fibroblasten) gezien in de toegenomen extracellulaire matrix van het hibernerende hart. Een belangrijke vraag die uit deze studie naar voren komt is of er een directe relatie bestaat tussen het vermogen om de functie te herstellen en de hoeveelheid bindweefsel (**hoofdstuk 5**). De vraag omtrent de reversibiliteit van de structurele veranderingen zal slechts beantwoord kunnen worden door middel van een diermodel, waarin de morfologische veranderingen gereproduceerd kunnen worden. In **hoofdstuk 6** wordt aangetoond dat de veranderingen in cardiomyocyten van het atrium van geiten met chronisch boezemfibrilleren overeenkomen met de veranderingen gezien in het chronische hibernerende hart van de mens. De cardiomyocyten tonen verlies van myofibrillen, ophoping van glycogeen, veranderingen in de vorm en grootte van de mitochondria, disruptie van het sarcoplasmatisch reticulum en de egale verspreiding van chromatine over de celkern. Deze veranderingen gaan gepaard met een toename van de grootte van de cardiomyocyten, terwijl cellulaire degeneratie niet wordt waargenomen. In tegenstelling tot het hibernerende hart is de interstitiële ruimte niet veranderd. De cellulaire veranderingen in atriale cardiomyocyten worden gezien als kenmerken van "dedifferentiatie". Studies naar de expressie en organisatie van contractiele en cytoskeletaire eiwitten, op vergelijkbare wijze uitgevoerd als tijdens de eerdere studies met de humane bipten (**hoofdstuk 7**), tonen grote overeenkomsten. Chronisch boezemfibrilleren in geiten verschaft een model om dedifferentiatie fenomenen te bestuderen die optreden in patiënten met een chronisch hibernerend hart. Dit model biedt de mogelijkheid om een beter inzicht te verkrijgen in de reeks gebeurtenissen die leiden tot cardiomyocyte-dedifferentiatie. Het geeft bovendien de mogelijkheid om het herstel van de structurele veranderingen na cardioversie te bestuderen. De mogelijke effecten van de als boven omschreven structurele aanpassing op de hartspier functie worden bediscussieerd in **hoofdstuk 8**. De waargenomen morfologische en immunofenotypische veranderingen ondersteunen een hypothese voor dedifferentiatie in plaats van een degeneratie. Concluderend mogen we stellen dat dedifferentiatie en de veranderingen in de extracellulaire matrix bijdragen tot de abnormale contractiele functie in de aangedane segmenten. Deze structurele veranderingen bepalen in belangrijke mate het vermogen en snelheid van functioneel herstel na revascularisatie.