

Growth factors in myocardial ischemia : focus on FGF-1 and IGF-1

Citation for published version (APA):

Palmen, M. (2003). *Growth factors in myocardial ischemia : focus on FGF-1 and IGF-1*. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20030207mp>

Document status and date:

Published: 01/01/2003

DOI:

[10.26481/dis.20030207mp](https://doi.org/10.26481/dis.20030207mp)

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 diseases are the leading cause of mortality and morbidity in the Western society. With the advent of different reperfusion techniques (thrombolytic therapy, PTCA, rescue-CABG), damage due to thrombotic coronary artery occlusion can be attenuated. Therefore, mortality numbers decrease, but on the expense of morbidity.

Myocardial infarction results in necrosis of cardiomyocytes and scar formation in the tissue area at risk. To compensate for the loss of contractile units, the cardiomyocyte population has to increase in size (hypertrophy), to be able to live up to the bodily requirements. Because cardiomyocytes lost the ability to divide (hyperplasia) shortly after birth, they have to rely on growth (hypertrophy). In order to provide enough oxygen supply for these hypertrophied cardiomyocytes, the formation of new capillaries is required (angiogenesis). This is often associated with the formation of epicardial collaterals (arteriogenesis). If reperfusion is accomplished within several hours after thrombotic coronary artery occlusion, necrotic cell death and therefore infarct size can be diminished. However, the process of reperfusion can also be harmful for the myocardium. While ischemia mainly induces necrotic cell death, reperfusion results in apoptosis, or programmed cell death, of cardiomyocytes located in the area at risk.

Growth factors are peptides that play a pivotal role in development and growth of the organism as a whole, but also on the level of the individual organs. Several growth factor families (like IGF-1 and 2, and the VEGF and FGF family of growth factors) are indispensable for the formation of the cardiovascular system. Some growth factors are produced systemically. For instance IGF-1 is produced in the liver in response to growth hormone (GH) stimulation. In addition, growth factors are produced locally in the target tissues in response to certain (pathogenic) stimuli. In the myocardium, growth factors (like IGF-1, FGF-1 and 2 and several VEGF isoforms) are produced in response to increased workload or myocardial ischemia. These growth factors play a crucial role in the evolution of a myocardial infarction and response to ischemia. The processes that have been described above (cardiomyocyte hypertrophy, scar formation, angiogenesis and arteriogenesis) are largely controlled and modulated by a complex interplay of several growth factors. These growth factors display effects during both acute ischemia and reperfusion, and in chronic myocardial ischemia and infarction. In this thesis, attention is focused on FGF-1 and IGF-1 and their role in acute and chronic myocardial ischemia and myocardial infarction.

Chapter 1 is an introduction and gives an elaborate overview of current literature, while *chapter 2* reviews the role of growth factors in myocardial angiogenesis. The first part of the experimental work focuses on IGF-1 (or Insulin-like growth factor-1). In *chapter 3*, we induced an experimental myocardial infarction by coronary artery ligation in heterozygous IGF-1 deficient mice, displaying 60% of the normal IGF-1 plasma levels. One week after induction of a myocardial infarction (MI), cardiac function was measured, using a left ventricular pressure catheter. Afterwards, the heart was excised for morphological and (immuno-) histochemical analysis. IGF-1 deficient mice had lower body and organs weights. Cardiomyocytes of IGF-1 deficient mice were smaller, underlining the general growth promoting role of this growth factor. In addition, these mice had fewer capillaries per cardiomyocyte (C/F ratio was decreased), when compared to WT littermates. Induction of MI resulted in decreased cardiac function. However, no differences in cardiac function were found between IGF-1 deficient mice and WT littermates and infarct size was similar in both genotypes. When cellular composition and general ventricular architecture was investigated, several differences between both genotypes were found. IGF-1 deficiency was associated with increased apoptosis rates and diminished cellular division in the infarcted area of the myocardium. In addition, the hypertrophic response of the remote myocardium was blunted in IGF-1 deficient mice. We conclude that although IGF-1 deficiency is associated with altered remodelling of the infarcted ventricle, cardiac function was not altered when compared to infarcted WT animals.

To investigate the role of IGF-1 in acute myocardial ischemia and reperfusion, we mounted the hearts of IGF-1 deficient mice and their WT littermates in an *ex vivo* murine heart model of ischemia and reperfusion (*chapter 4*). After a 20 minute period of ischemia, the hearts were reperfused for one hour. Throughout the complete duration of the experiment several parameters of cardiac function were measured. In addition, coronary effluent was sampled for determination of lactate and LDH, parameters for anaerobic metabolism and necrotic cell death, respectively. We found that partial (heterozygous) IGF-1 deficiency did not result in enhanced tolerance to ischemia, since cardiac functional recovery and cell death were similar in IGF-1 deficient mice and their WT littermates. However, coronary flow was significantly lowered during reperfusion in IGF-1 deficient mice, without functional consequences. Pre-ischemic administration of IGF-1 resulted in augmentation of cardiac functional recovery during the complete reperfusion phase, in both IGF-1 deficient mice and WT littermates. Furthermore, in IGF-1 deficient mice, IGF-1 administration was associated with a normalisation of coronary flow to

the level of (un)treated WT hearts. In addition, ischemia-induced necrotic cell death was decreased in both genotypes after pre-ischemic IGF-1 administration. To unravel the intracellular signalling pathways associated with IGF-1 mediated cardioprotection, we selectively inhibited two intracellular signalling proteins, namely PKC (protein kinase C) and PI-3K (phosphatidylinositol-triphosphate kinase), using pharmacological inhibitors. Simultaneous IGF-1 administration in combination with selective inhibition of either PKC or PI-3K resulted in an attenuation of the IGF-1 mediated cardioprotective effects. Cardiac functional recovery and myocardial cell death were similar in non-treated hearts and hearts treated with the combination of IGF-1 and an inhibitor of either PKC or PI-3K. We conclude that IGF-1 enhances myocardial tolerance to ischemia, resulting in augmentation of cardiac functional recovery and attenuation of myocardial necrotic cell death following ischemia and reperfusion. IGF-1 mediated protection was proven to be PI-3K and partially PKC dependent.

In the second part of the experimental work, the attention switched to another cardiac growth factor, FGF-1 (Fibroblast growth factor-1). For these experiments, transgenic mice with a cardiac-specific FGF-1 overexpression were used. By using a heart-specific promoter, (human) FGF-1 is produced, but only in the myocardium. One week after induction of a myocardial infarction, cardiac function was measured using a flow probe, positioned around the ascending aorta (*chapter 5*). After these function measurements had been completed, the heart was excised for morphological and immunohistochemical analysis. Despite the fact that these mice had more epicardial vessels (arteriogenesis), which could lead to enhanced collateral flow, myocardial infarct size was similar in FGF-1 transgenic mice and their WT littermates. In addition, no difference was found in capillary to fiber ratios. However, induction of MI resulted in decreased collagen formation in the infarcted left ventricular free wall and enhanced apoptosis rates in this area, when compared to WT littermates. Surprisingly, cardiac function was decreased in FGF-1 transgenic mice following myocardial infarction. We conclude that FGF-1 overexpression leads to alterations in the cardiac remodelling response and attenuation of cardiac function, following myocardial infarction.

To study the role of FGF-1 during acute ischemia and reperfusion, we mounted FGF-1 transgenic hearts and WT hearts in the *ex vivo*, isolated mouse-heart model of ischemia and reperfusion (*chapter 6*). Cardiac function and lactate/LDH release were continuously monitored throughout the experimental protocol. FGF-1 overexpression resulted in a spectacular augmentation of car-

diac functional recovery following a 25 min. period of ischemia, compared to WT littermates. In addition, ischemia and reperfusion-induced necrotic cell death was significantly attenuated in FGF-1 transgenic hearts. To unravel the intracellular signalling pathways involved in FGF-1 mediated cardioprotection, we selectively inhibited several intracellular signalling molecules that were hypothesized to play a role in FGF-1 mediated protection. Inhibition of the FGF receptor-1 (FGF-R1), protein kinase C (PKC), and tyrosine kinases (TK) resulted in a complete abrogation of FGF-1 mediated augmentation of cardiac functional recovery. Recovery of cardiac function in inhibitor-treated FGF-1 transgenic hearts was similar when compared to non-treated WT hearts. However, the protective effects of FGF-1 on necrotic cell death could not be abrogated by inhibiting FGF-R1 and TK and could only be partially abrogated by PKC inhibition. We conclude that FGF-1 overexpression enhances myocardial tolerance to ischemia and that these effects are FGF-R1, PKC and TK mediated. FGF-1 mediated protection of myocardial necrotic cell death is partially PKC dependent and completely FGF-R1 and TK independent.

In the final chapter of this thesis (*chapter 7*), results from this experimental work are discussed in the light of current literature on this subject. Furthermore, the clinical implications of these results for future growth factor therapy are discussed.

Samenvatting

Hart- en vaatziekten zijn verantwoordelijk voor een groot deel van de mortaliteit en morbiditeit in de westerse maatschappij. Sinds de opkomst van verschillende reperfusie technieken (thrombolytica, PTCA, rescue-CABG), kan de schade van een myocardinfarct vaak ten dele worden beperkt. Hierdoor neemt de mortaliteit van hart- en vaatziekten af, terwijl de morbiditeit stijgt. Indien een hartinfarct optreedt, gaat dit gepaard met het verlies van hartspiercellen (cardiomyocyten) en de vorming van littekenweefsel in het stroomgebied van de afgesloten coronair arterie. Om te compenseren voor het verlies van contractiel weefsel zal de rest van de hartspiercellen in omvang moeten toenemen om aan de zuurstof-behoeften van het lichaam te kunnen voldoen. Omdat hartspiercellen het vermogen tot celdeling hebben verloren, nemen de hartspiercellen in cel-grootte toe (hypertrofie). Om deze hypertrofische cardiomyocyten van voldoende bloed te kunnen voorzien is het verder noodzakelijk dat het capillair netwerk zich proportioneel uitbreidt (angiogenese). Deze uitbreiding van het capillaire netwerk, gaat soms gepaard met de vorming van arteriolen (arteriogenese).

Indien reperfusie binnen enkele uren optreedt na thrombotische occlusie van een coronair arterie, al dan niet iatrogeen, kan de ischemische schade worden beperkt. Echter, reperfusie alleen heeft ook al schadelijke effecten (reperfusion damage). Terwijl ischaemie met name tot necrose van cardiomyocyten leidt, induceert reperfusie van de area at risk apoptose van cardiomyocyten, ook wel geprogrammeerde celdood genoemd.

Groefactoren zijn eiwitten die een belangrijke rol spelen in de groei en ontwikkeling, zowel op het niveau van het organisme, als ook op orgaanniveau. Zo hebben deze groefactoren een belangrijke rol bij de ontwikkeling van het cardiovasculaire systeem. Sommige groefactoren, zoals IGF-1, worden in de lever geproduceerd na stimulatie met groeihormoon (GH). Daarnaast worden groefactoren geproduceerd in de verschillende doelwit-organen (target tissues), na het optreden van verschillende (pathologische) stimuli. In het hart wordt de productie van groefactoren (zoals IGF-1, FGF-1 en 2, en verschillende VEGF-isoformen) gestimuleerd door bijvoorbeeld een toename in "work-load" of myocardiale ischaemie. Deze groefactoren spelen een cruciale rol bij de evolutie van een infarct. Bovengenoemde processen (cardiomyocythyypertrofie, littekenvorming, angiogenese, arteriogenese, apoptose) worden in belangrijke mate gereguleerd door deze groefactoren. Deze groefactoren spelen een rol zowel bij acute ischaemie (en reperfusie), als tijdens de remodelering van de ventrikels (remodeling) na een doorgemaakt infarct.

In dit proefschrift wordt de rol van twee van deze groeifactoren, FGF-1 en IGF-1, in acute en chronische myocardischaemie en myocardinfarct belicht.

In dit proefschrift wordt het experimentele werk voorafgegaan door een uitgebreid overzicht van de bestaande literatuur (*hoofdstuk 1*), gevolgd door een review over de rol van groeifactoren in angiogenese (*hoofdstuk 2*). Het eerste gedeelte van het experimentele werk concentreert zich op IGF-1 (of Insulinlike growth factor-1). In *hoofdstuk 3* hebben we in myocardinfarct geïnduceerd bij genetisch gemodificeerde muizen met een partiële (heterozygote) IGF-1 deficiëntie. Deze muizen hebben 60% van de normale plasmaspiegels van IGF-1. Na een week werd de hartspierfunctie gemeten met gebruikmaking van een druk-catheter in de linker ventrikel. Vervolgens werd het hart uitgenomen voor histologische en immunohistochemische analyse. IGF-1 deficiënte muizen wogen minder dan hun WT soortgenoten en hadden kleinere hartspiercellen, hetgeen de algemene groei-bevorderende eigenschappen van IGF-1 onderstreept. Daarnaast hadden deze muizen minder capillairen per hartspiercel. Na vergelijking met niet-transgene muizen (wild-type littermates) bleek dat de hartspierfunctie voor een na infarct niet beïnvloed werd door IGF-1 deficiëntie. Daarnaast bleek de grootte van het infarct identiek bij de twee genotypen. De architectuur en celcompositie van het geïnfarceerde hart was echter duidelijk verschillend bij IGF-1 deficiënte muizen. IGF-1 deficiëntie was geassocieerd met een significante toename van apoptose en een afname van celdeling in het geïnfarceerde gebied. Daarnaast bleek de hypertrofe respons van het resterende levende myocard afgenomen in IGF-1 deficiënte muizen. Concluderend kunnen we dus stellen dat wel de structuur en celcompositie van het (geïnfarceerde) hart verandert ten gevolge van IGF-1 deficiëntie, maar dat dit niet leidt tot een verandering in hartspierfunctie.

Om de rol van IGF-1 bij acute myocardiale ischaemie en reperfusie te kunnen bestuderen hebben we de harten van IGF-1 deficiënte muizen en hun WT littermates in een *ex vivo*, geïsoleerd muizenhart-perfusie opstelling geprepareerd (*hoofdstuk 4*). Na een periode van 20 minuten ischaemie werd gereperfundeed gedurende een uur. Gedurende het gehele experiment werden verschillende parameters voor hartspierfunctie gemeten en werd het coronair perfusaat gesampeled voor bepaling van LDH en lactaat, parameters voor necrotische celdood en anaeroob metabolisme, respectievelijk. Het bleek dat een partiële IGF-1 deficiëntie niet resulteerde in een afgenomen tolerantie voor myocardischaemie. Herstel van hartspierfunctie en celdood gedurende de reperfusie perioden waren niet wezenlijk verschillend, indien IGF-1 deficiënte muizen werden vergeleken met WT littermates. Wel bleek dat de coronaire flow na ischaemie lager was in IGF-1 deficiënte muizen, echter zonder functi-

onele consequenties. Pre-ischemische toediening van IGF-1 leidde tot een verbetering van het herstel van hartspierfunctie gedurende de reperfusie fase, zowel in IGF-1 deficiënte muizen als in hun WT littermates. Ook de necrotische celdood ten gevolge van ischaemie en reperfusie (I/R) nam af ten gevolge van pre-ischaemische IGF-1 toediening. Om nu te kunnen bepalen welke signaaltransductie eiwitten in het hart betrokken zijn bij deze IGF-1 gemedieerde inductie van tolerantie voor ischaemie, hebben we enkele van deze signaaltransductie moleculen farmacologisch geïnhibeerd. Inhibitie van ofwel PI-3K (phosphatidyl-inositol-triphosphate kinase), ofwel PKC (proteïn kinase C) samen met IGF-1 toediening resulteerde in een afname van de IGF-1 gemedieerde protectie. Zowel het herstel van hartspierfunctie als de hoeveelheid necrotische celdood was vergelijkbaar met de harten die geen IGF-1 voorbehandeling ontvingen. Wij concluderen dat IGF-1 de tolerantie voor myocardischaemie verhoogt en resulteert in een verbetering van hartspierfunctie en een afname van (necrotische) celdood na ischaemie en reperfusie. Deze effecten blijken (partieel) afhankelijk te zijn van intracellulaire signaaltransductie eiwitten PI-3K en PKC.

In het tweede deel van het experimentele werk werd de aandacht verlegd naar een andere groeifactor, namelijk FGF-1 (Fibroblast Growth Factor-1). We gebruikten voor deze experimenten transgene muizen met een hart-specifieke overexpressie van FGF-1. Door deze hart-specifieke promotor, wordt in de muis humaan FGF-1 aangemaakt, echter alleen in het myocard. Wederom werd een myocardinfarct geïnduceerd, na een week gevolgd door functiemetingen (*hoofdstuk 5*). Hiertoe werd een flow-probe aangebracht om de aorta ascendens. Vervolgens werd het hart uitgenomen voor morfologische en (immuno-) histochemische analyse. Ondanks een toename van epicardiale arteriolen (arteriogenese), hetgeen zou kunnen leiden tot een toegenomen collaterale flow, hadden deze muizen geen afname van infarctgrootte, indien vergeleken met WT littermates. Ook was er geen verschil in het aantal capillairen per hartspiercel (C/F ratio). Echter, inductie van een myocardinfarct in FGF-1 transgene muizen leidde tot een afname van de hoeveelheid collageen in het geïnfarceerde myocardium, gepaard gaande met een toename van apoptose, vergeleken met WT muizen. Verrassend genoeg was de hartspierfunctie na infarct verslechterd ten gevolge van chronische FGF-1 overexpressie. Wij concluderen dat FGF-1 overexpressie leidt tot een verandering in remodeling na een infarct en gepaard gaat met een afname van hartspierfunctie.

Om de rol van FGF-1 overexpressie bij ischaemie en reperfusie te onderzoeken, werden harten van FGF-1 transgene muizen en hun WT littermates

geprepareerd in het *ex vivo*, geïsoleerd muizenhart-model voor ischaemie en reperfusie (*hoofdstuk 6*). Ook hier werd continu hartspierfunctie gemeten en coronair effluent opgevangen voor biochemische bepalingen. FGF-1 overexpressie induceerde een spectaculaire verbetering in het herstel van hartspierfunctie tijdens reperfusie na een ischaemische periode (25 minuten). Ook was ischaemie-geïnduceerde necrotische celdood sterk gereduceerd ten gevolge van FGF-1 overexpressie. Om het intracellulaire mechanisme van FGF-1 gemedieerde cardioprotectie te kunnen determineren, werden wederom enkele signaaltransductie eiwitten selectief farmacologisch geïnhibeerd. Inhibitie van de FGF-receptor (FGF-R1), PKC en tyrosine kinases (TK) resulteerde in een complete verdwijning van de FGF-1 gemedieerde protectie. Het herstel van hartspierfunctie na ischaemie van inhibitor-behandelde FGF-1 transgene muizen was vergelijkbaar met (on)behandelde WT littermates. Echter, alleen inhibitie van PKC kon het protectieve effect van FGF-1 op necrotische celdood gedeeltelijk ongedaan maken. Concluderend kunnen wij stellen dat FGF-1 de tolerantie voor schadelijke effecten van ischaemie op hartspierfunctie verhoogt, en dat deze bescherming gemedieerd wordt via de FGF-receptor, PKC en tyrosine kinases. FGF-1 gemedieerde bescherming tegen I/R geïnduceerde celdood is gedeeltelijk afhankelijk van PKC, echter FGF-R1 en TK-onafhankelijk.

In het laatste hoofdstuk van dit proefschrift (*hoofdstuk 7*) worden de resultaten van het experimentele werk in het licht geplaatst van de hedendaagse literatuur, en worden de klinische implicaties van deze resultaten voor toekomstige groeifactor therapie bediscussieerd.