

Membrane-bound angiotensin-I-converting enzyme : associated with cardiac contractility and vascular elasticity

Citation for published version (APA):

Aartsen, W. M. (2003). *Membrane-bound angiotensin-I-converting enzyme : associated with cardiac contractility and vascular elasticity*. Universiteit Maastricht.

Document status and date:

Published: 01/01/2003

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

The angiotensin-I-converting enzyme (ACE) is an essential component of the renin-angiotensin system (RAS) and the target of therapy during cardiovascular diseases such as hypertension, myocardial infarction and heart failure. ACE is present in two forms, bound to the cell membrane as a component of the local RAS or circulating in plasma as a component of the circulating RAS. In cardiovascular diseases, beneficial effects of ACE-inhibition on cardiovascular structure and function are often assigned to inhibition of the local RAS. However, before targeting ACE inhibition to the locally expressed ACE, more insight in the exact function of cell membrane-bound ACE (t-ACE) is necessary. Enhanced expression of the local RAS is often observed during cellular growth and angiotensin II is known to exhibit growth factor characteristics. Thus, the role of t-ACE might be related to cardiovascular growth, observed during maturation and after myocardial infarction (MI). Apart from refining the conventional therapy by unravelling the exact role of t-ACE, the therapy after MI could also be improved by combining the conventional RAS inhibition with factors able to increase the cardiac contractility. In this thesis, we investigated the involvement of t-ACE in maturation of the cardiovascular system and its involvement in functional and structural remodelling of the heart after MI. Moreover, the effects of combined administration with the AT₁ antagonist, losartan and the insulin-like growth factor (IGF-I) on cardiac contractility and structural remodelling were investigated.

Chapters 2, 3 and 7

The function of local ACE in cardiovascular maturation was investigated by comparing cardiac performance and structure of adult t-ACE *-/-* and t-ACE *+/+* mice on the one hand and vascular reactivity and structure of adult t-ACE *-/-* and t-ACE *+/+* mice, on the other. A transit-time flow probe was placed around the aorta to determine the cardiac output in conscious mice at rest and after maximal stimulation. The maximal cardiac output was not

increased in t-ACE $-/-$ mice despite their reduced afterload, which suggests an impaired cardiac contractility. The impaired cardiac contractility in t-ACE $-/-$ mice was confirmed in wild-type mice treated with captopril for nine weeks. Structural analysis of large and small vessels in t-ACE $-/-$ mice in an arteriograph revealed that the vascular elasticity is reduced in both vessel types compared to vessels from wild-type mice. Moreover, vascular reactivity, tested in a wire-myograph, was blunted by the lack of t-ACE. After prolonged treatment with captopril similar vascular alterations were observed. Since captopril treatment was started at 3 weeks after birth, it is evident that the reduced cardiac contractility, arterial elasticity and reactivity do not originate from an altered foetal development in the absence of t-ACE. Since the cardiovascular alterations observed in t-ACE $-/-$ mice are similar or even more pronounced after prolonged captopril treatment in wild-type mice, it can be concluded that the loss of t-ACE activity can be replaced by ACE activity from a distinct source, such as the circulation. Thus, normal maturation of the cardiovascular system is influenced by the total ACE activity, independent of its source.

Chapters 4, 5 and 6

After myocardial infarction (MI), stratification of the experimental groups would be very useful and economic. In chapter 3, a method to estimate cardiac damage after experimental MI via blood sampling was tested. Both heart fatty acid binding protein (H-FABP) and cardiac troponin T (cTnT) were proven to be successful plasma markers for the presence of MI and can even provide information about infarct size.

The question whether targeted ACE inhibition is a therapeutic goal after MI was investigated by comparing cardiac performance and cardiac structural remodelling in t-ACE $-/-$ and t-ACE $+/+$ mice at 14 days and 3 months after experimentally induced MI. An electromagnetic flow probe was placed around the aorta to determine cardiac output at rest and after volume loading. Cardiac geometry and cardiac collagen content were used as parameters for structural remodelling. Early and targeted inhibition of ACE after MI does not improve the cardiac function or the structural remodelling in mice. On the contrary, functional recovery of the heart after MI is impaired in the absence of t-ACE despite the reduced afterload. Moreover, targeted inhibition of ACE does not cause alterations in the structural remodelling after MI.

The second therapeutic option investigated was the combined therapy with the AT₁ receptor antagonist, losartan and IGF-I. At 14 days after MI, no beneficial effects of the combined treatment on cardiac contractility or structural remodelling were observed. Early after MI, both ACE inhibition and AT₁ receptor antagonism led to adverse effects on the cardiac function, these data strongly suggest that increased angiotensin II levels in the early phase after MI are important for the functional compensatory response after MI.

Chapters 7 and 8

T-ACE deficiency resulted in a reduced arterial reactivity and elasticity. The latter originates from stimulation of the bradykinin type 2 receptor (BK₂ receptor), since inhibition of this receptor by administration of the antagonist Hoe 140 for 14 days, restored the vascular elasticity in t-ACE deficient mice. These data demonstrate the close relationship between the renin-angiotensin system (RAS) and the kallikrein-kinin system (KKS), and the contribution of both systems to the maturation of the cardiovascular system. Especially maturation is a critical phase, in which environmental factors, interacting with a (predisposed) genetic background, can determine the adult cardiovascular phenotype. Research on the genetic predisposition of the balance between RAS and KKS, and the related eventual cardiovascular risk, could help to estimate the individual risk of the patient and optimise the patient's therapy.

Nederlandse Samenvatting

Hoge bloeddruk, aderverkalking, een hartinfarct en hartfalen, zijn aandoeningen van het hart- en vaatstelsel, die in onze westerse samenleving veel voorkomen en een grote bedreiging vormen voor ons welzijn. In ons lichaam wordt de bloeddruk en de waterhuishouding gereguleerd door onder andere het renine-angiotensine systeem (RAS). Dit systeem bestaat uit een aantal eiwitten en enzymen die verantwoordelijk zijn voor de productie van het zeer potente hormoon angiotensine II. De laatste stap in het vormingsproces van angiotensine II, wordt gereguleerd door het angiotensine-converterende enzym (ACE), dat centraal staat in dit proefschrift. ACE knipt de laatste twee aminozuren af van het inactieve angiotensine I, waardoor het angiotensine II ontstaat. Angiotensine II heeft een hele reeks effecten, die beginnen met het activeren van de angiotensine receptoren, angiotensine receptor type 1 en 2 (AT₁ en AT₂). De meest bekende effecten van angiotensine II, zoals bloedvatvernauwing, afgifte van het watervasthoudend hormoon aldosteron en celgroei, beginnen met het binden van angiotensine II aan de AT₁ receptor.

Het ACE bezit, naast twee enzymatische plaatsen om angiotensin II te vormen, ook een membraan-anker, waarmee het in staat is te hechten aan de buitenmembraan van cellen. De meest gebruikelijke plaats voor het hechten van ACE is het endotheel, de binnenste laag cellen van hart en vaten waarlangs het bloed stroomt. Het membraan-anker dat het ACE verbindt aan de cellen kan ook losgeknipt worden, waardoor het ACE de mogelijkheid om te hechten verliest en in het bloed terecht komt. Gebonden aan de celmembraan behoort het ACE tot het lokaal RAS en in de bloedbaan maakt het ACE deel uit van het circulerend RAS. Het circulerend RAS is betrokken bij de regulatie van de bloeddruk en de waterhuishouding. De functie van het lokaal RAS is onderdeel van de vraagstelling in dit proefschrift.

De functie van t-ACE in de volgroeiing van het hart- en vaatstelsel

Het lokaal RAS is aanwezig in veel verschillende organen, waaronder het hart en de vaatwand. Opmerkelijk is dat een extra hoge expressie van de meeste RAS eiwitten, waaronder het ACE, is waargenomen tijdens de embryonale ontwikkeling. Tijdens de embryonale ontwikkeling wordt de groei van hart en vaten gelijktijdig waargenomen met een verhoogde expressie van lokale RAS eiwitten. Hogere expressie van RAS eiwitten leidt tot meer angiotensine II, dat voor veel verschillende celtypes een groei stimulerende factor is. De functie van het lokaal RAS zou dus betrekking kunnen hebben op de regulatie van de celgroei. Om deze vraagstelling te kunnen onderzoeken hebben we gebruik gemaakt van een diermodel. Met behulp van genetische modificatie is er een muis ontwikkeld die het ACE bezit zonder membraan-anker (t-ACE -/-). Hierdoor kan het ACE alleen circuleren en is de lokale vorming van angiotensine II verminderd. De vraag of de functie en de structuur van een volgroeid hart- en vaatstelsel verandert wanneer het ACE niet kan hechten aan de celmembraan is onderzocht in dit proefschrift.

Om te kunnen bepalen hoe belangrijk het membraan-gebonden ACE (t-ACE) is voor de volgroeiing van het hart- en vaatstelsel, is de functie en structuur van het hart in een volwassen t-ACE -/- muis vergeleken met de functie en structuur van het hart in een volwassen muis met beide vormen van ACE (t-ACE +/- ; hoofdstukken 2 en 5). Deze vergelijking is ook gemaakt voor de reactiviteit en structuur van grote en kleine slagaders (hoofdstuk 7). Uit de resultaten blijkt dat de afwezigheid van het t-ACE leidt tot een verminderde contractiliteit (de kracht tijdens samentrekken) van het hart, een verminderde reactiviteit (het kunnen vernauwen of verwijden) van de grote slagaders en een verhoogde stijfheid van alle slagaders. Hieruit blijkt dat de aanwezigheid van het t-ACE van belang is voor de volgroeiing van het hart- en vaatstelsel. De vraag blijft of deze veranderingen ontstaan tijdens de aanleg van het hart- en vaatstelsel in de foetus, of daarna. Uit de hoofdstukken 3 en 7 blijkt dat farmacologische remming van het ACE in de periode na aanleg van het hart- en vaatstelsel (3 tot 12 weken oud) leidt tot dezelfde veranderingen in het hart- en vaatstelsel. De effecten van farmacologische ACE remming zijn zelfs groter dan het weghalen van alleen het t-ACE. Hieruit kan men concluderen dat de totale ACE-activiteit van invloed is op de volgroeiing van het hart- en vaatstelsel. Daarnaast is het ontbreken van t-ACE tijdens de foetale ontwikkeling niet de oorzaak van de veranderingen waargenomen in het hart- en vaatstelsel van t-ACE -/- muizen.

In het laatste hoofdstuk van dit proefschrift is het mogelijk mechanisme verantwoordelijk voor de verhoogde stijfheid van de slagaders, die ontstaat in afwezigheid van het t-ACE, onderzocht. Het produceren van angiotensine II is niet de enige functie van het ACE. Het ACE is ook verantwoordelijk voor de afbraak van het hormoon bradykinine. Bradykinine is een component van het kallikreine-kinine systeem en de tegenspeler van angiotensine II. Het zorgt voor vaatverwijding en remt de celgroei. Op het moment dat de ACE-activiteit

wordt geremd, wordt er dus niet alleen minder angiotensine II aangemaakt, maar ook minder bradykinine afgebroken. Een tekort aan angiotensine II of een teveel aan bradykinine zou kunnen leiden tot de veranderingen in het hart- en vaatstelsel. Door in t-ACE $-/-$ en t-ACE $+/+$ muizen de bradykinine receptor type 2 (BK₂ receptor) gedurende 14 dagen te blokkeren, was het verschil in arteriële stijfheid tussen t-ACE $-/-$ vaten en t-ACE $+/+$ vaten verdwenen. Dit doet vermoeden dat de BK₂ receptor een rol speelt in het ontstaan van arteriële stijfheid tijdens ACE remming.

De rol van t-ACE tijdens de functionele en structurele veranderingen van het hart na een hartinfarct

Verhoogde expressie van de lokale RAS eiwitten, inclusief het t-ACE, wordt ook gezien in het hart na een hartinfarct. Het is bekend dat patiënten met een hartinfarct beter functioneren en een grotere overlevingskans hebben als de ACE-activiteit wordt geremd. De vraag of het t-ACE betrokken is bij de functionele en structurele veranderingen van het hart na een hartinfarct, is ook onderzocht in t-ACE $+/+$ en t-ACE $-/-$ muizen. Door operatief één van de kransslagaders van het muizenhart af te binden ontstaat er een hartinfarct. Dit is gedaan in t-ACE $-/-$ en t-ACE $+/+$ muizen (hoofdstuk 5). Op 14 dagen en 3 maanden na het hartinfarct is de hartfunctie en hartstructuur bepaald, om te kunnen zien hoe het hart zich herstelt. Zonder de aanwezigheid van t-ACE is het functioneel herstel van het hart slechter dan in aanwezigheid van het t-ACE. De structurele veranderingen na het hartinfarct zijn echter gelijk in aan- of afwezigheid van t-ACE. Het t-ACE is dus van belang voor een goed functioneel herstel van het hart na een hartinfarct, terwijl het geen grote rol speelt bij het ontstaan van bijvoorbeeld littekenweefsel. Uit deze resultaten blijkt dat therapie na een hartinfarct, die alleen gericht is op het verminderen van de lokale ACE activiteit in plaats van remming van de totale ACE activiteit, hoogstwaarschijnlijk niet effectiever is.

Therapie met AT₁ blokker en IGF-I na een hartinfarct

De derde vraagstelling die we ons stelden tenaanzien van het RAS heeft een iets andere strekking. Na een hartinfarct is gebleken dat ook het blokkeren van de AT₁ receptor, de gezondheid en overlevingskansen van de patiënt verbetert. Om de hartfunctie nog verder te verbeteren kan de bestaande therapie met AT₁ blokkers uitgebreid worden met een hormoon dat de contractiliteit van het hart verder vergroot. Een potentiële kandidaat hiervoor is de "insulin-like" groeifactor-I (IGF-I). Tijdens intensief en langdurig sporten zijn hoge IGF-I spiegels waargenomen bij de groei van het hart. Het zogenaamde sporthart is groter en kan een hogere capaciteit leveren zonder direct schadelijk te zijn voor de gezondheid. In dit proefschrift is ook onderzocht of de combinatie-therapie, bestaande uit een AT₁ blokker en IGF-I van positieve invloed is op de hartfunctie na een hartinfarct.

Muizen met een hartinfarct werden verdeeld in drie groepen. De eerste groep is niet behandeld gedurende de eerste 14 dagen na het hartinfarct. De tweede groep is gedurende de eerste 14 dagen behandeld met de AT₁ blokker, losartan en in de derde groep is losartan behandeling gecombineerd met IGF-I toediening. Ondanks dat IGF-I toediening inderdaad de contractiliteit van het hart vergroot is de gecombineerde toediening van losartan en IGF-I gedurende de eerste 14 dagen na een hartinfarct niet beter voor de hartfunctie.

Klinische relevantie

In dit proefschrift is aangetoond dat de totale ACE-activiteit belangrijk is voor een goede ontwikkeling van het hart- en vaatstelsel. Daarnaast is gebleken dat het ontstaan van arteriële stijfheid, een vaatwand eigenschap die bijdraagt aan een verhoogd risico op hart- en vaatziekten, niet alleen gerelateerd is aan veranderingen in het renine-angiotensine systeem, maar ook aan veranderingen in het kallikreine-kinine systeem.

Gezien de verslechterde hartfunctie na een hartinfarct, waargenomen bij t-ACE -/- muizen ten opzichte van t-ACE +/+ muizen en het gegeven dat een deel van de t-ACE functie overgenomen kan worden door actief ACE afkomstig uit de bloedbaan, maakt de gedachte om met name het lokaal ACE te remmen na een hartinfarct geen aantrekkelijke optie ter verbetering van de huidige therapie na een hartinfarct. Dat laatste geldt ook voor de combinatie-therapie met een AT₁ blokker en IGF-I. De data beschreven in dit proefschrift tesamen met in de literatuur beschreven experimenten laten zien dat de toepassingsmogelijkheden van een dergelijke therapie, ter verbetering van de hartfunctie na een hartinfarct, zeer gering zijn.