

The intracardiac renin-angiotensin-system : new insights in its role in cardiac hypertrophy and wound healing

Citation for published version (APA):

Passier, P. C. J. J. (1995). *The intracardiac renin-angiotensin-system : new insights in its role in cardiac hypertrophy and wound healing*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19951123pp>

Document status and date:

Published: 01/01/1995

DOI:

[10.26481/dis.19951123pp](https://doi.org/10.26481/dis.19951123pp)

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

Cardiac hypertrophy is a risk factor for cardiovascular complications and results in a higher morbidity and mortality. Myocardial infarction (MI) or hypertension are important determinants for the development of cardiac hypertrophy. The intracardiac renin-angiotensin-system (RAS) is thought to play a role in the development of cardiac hypertrophy. In this thesis, experiments were performed to study the intracardiac RAS in the development of cardiac hypertrophy. Furthermore the regulation of the RAS was studied in physiological and pathophysiological conditions.

In **chapter 3** the regulation of the mRNA of angiotensinogen (AO) and renin, two components of the RAS, was studied in different tissues, following aorta coarctation (7 days), bilateral nephrectomy (24 hours) and captopril treatment (24 hours) in Wistar Kyoto (WKY) rats. These different experimental groups were chosen, because of their different effects on the systemic RAS. Each experiment resulted in different plasma levels of renin and angiotensin II (ANG II), two important modulators in the regulation of AO and renin production. Furthermore, aorta coarctation results in cardiac hypertrophy and therefore the role of intracardiac AO and renin in the development of cardiac hypertrophy following aorta coarctation could be studied. Nephrectomy significantly increased AO mRNA in the liver and the brain, whereas it had no effect on other tissues examined. Renin mRNA expression following nephrectomy was not affected in any of the tissues examined. Both aorta coarctation and captopril treatment resulted in a downregulation of atrial AO mRNA. However, no difference of AO mRNA expression was observed in the other tissues following aorta coarctation or captopril treatment. Again renin mRNA expression was not affected in any of the tissues examined following aorta coarctation. In addition, renal renin mRNA expression was increased after captopril treatment. From these data, we concluded that AO and renin mRNA are differently regulated in the tissues examined. AO mRNA in the liver and brain appears to be tonically inhibited by renin, whereas AO mRNA in the atria is not. A negative feedback of renin mRNA expression by ANG II was observed in the kidney, but not in other tissues. Additionally we concluded that myocardial hypertrophy is not necessarily associated with increased AO and renin mRNA expression.

In **chapter 4** Wistar rats underwent sham-surgery or an induction of MI, a model for studying the development of cardiac hypertrophy and wound healing. At different times (1-90 days) after surgery the heart was removed and divided into the left ventricle (LV), septum (SE) and right ventricle (RV). Cardiac angiotensin I-converting-enzyme (ACE) mRNA expression was quantified and localized in the infarcted rat heart. Furthermore, ACE-activity and ACE-immunoreactivity was studied following experimental MI. Since cardiac ACE mRNA levels are low, we used a sensitive competitive reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) for quantifying ACE mRNA levels. We demonstrated a 3-fold increase of ACE mRNA expression in the infarcted LV at 4 and 7 days after MI. However, in the non-

infarcted myocardium ACE mRNA levels were not different from those in sham animals. At 4 days after MI, ACE mRNA and ACE-immunoreactivity were localized by in situ hybridization (ISH) and immunohistochemistry, respectively. High density of ACE mRNA as well as ACE-immunoreactivity were observed in the border zone of the infarct area, predominantly in endothelial cells, lining capillaries. In the non-infarcted and sham animals ACE mRNA and ACE-immunoreactivity were observed in the endothelial cells of larger vessels. Cardiac ACE-activity, measured at 7 and 90 days after MI, was increased 3-fold at these times in the infarcted LV, but not in the SE and RV, when compared to sham animals. From these data we concluded that intracardiac ACE does not play a dominant role in the development of cardiac hypertrophy following MI in the rat. Furthermore, we suggested that intracardiac ACE may play a role in wound healing following MI.

In **chapter 5** we studied the expression and localization of renin mRNA in the rat heart at different times (1-90 days) after MI. WKY rats underwent sham- or MI-surgery. By competitive RT-PCR cardiac renin mRNA levels were quantified. Atrial natriuretic factor (ANF), a marker for cardiac hypertrophy, was determined by Northern hybridization analysis, in the different compartments of the heart at 1, 7 and 90 days following surgery. In sham animals cardiac renin mRNA levels were extremely low and could only be quantified in some of the animals. However, renin mRNA levels were higher in the infarcted LV. At 2, 4 and 7 days after MI, renin mRNA levels were respectively 4, 17 and 8-fold higher in the infarcted LV. In the non-infarcted hypertrophied myocardium renin mRNA expression was extremely low and indistinguishable from renin mRNA levels in sham animals. At other times after MI there was no difference in renin mRNA expression when compared to sham animals. Renin mRNA was localized in the heart by ISH at 4 days after MI, the time with the highest renin mRNA levels (*vide supra*). A high density of renin mRNA was observed in the border zone of the infarct area. In this area renin mRNA was most probably localized in (myo)fibroblasts, but not in cardiomyocytes nor in endothelial cells. In the non-infarcted myocardium renin mRNA expression was very low and indistinguishable from the background labeling. ANF mRNA expression increased 2-fold in all compartments of the heart at 1, 7 and 90 days after MI. The low amounts of renin mRNA in the non-infarcted hypertrophied myocardium indicate that the intracardiac synthesis of renin does not play a important role in the development of cardiac hypertrophy in the rat heart following MI. However, the increased renin mRNA expression in the border zone of the infarct area suggests a role for intracardiac synthesized renin in wound healing.

In **chapter 6** the expression and localization of AO mRNA was studied in WKY rats in the infarcted rat heart. As ACE and renin, AO mRNA was quantified and localized at different times in the different compartments of the heart after sham- or MI-surgery. Since these were the same animals as in chapter 5, ANF mRNA expression was increased in the different compartments of the heart, following MI (*vide supra*) By competitive RT-PCR we demonstrated that AO mRNA levels were

extremely low and that those were not changed following MI in the different compartments of the heart at any time after surgery. ISH revealed an overall low density of AO mRNA in the myocardium, with a somewhat higher density of AO mRNA labeling in the epicardium. These data demonstrate that intracardiac AO gene is not activated after MI in the rat heart, suggesting that intracardiac synthesis of AO does not play a dominant role in the development of cardiac hypertrophy or infarct healing in the rat heart after MI.

In **chapter 7** we investigated the feedback regulation of the expression of the components of the intracardiac and systemic RAS by interference with the RAS in WKY rats following MI, with or without treatment with the ACE-inhibitor captopril. At 7 days after surgery rats were sacrificed and the different compartments of the heart, lungs, liver and kidneys were removed. Cardiac AO, renin and ACE mRNA, and renal renin mRNA were quantified by the competitive RT-PCR. Hepatic angiotensinogen, pulmonary ACE and cardiac ANF mRNA expression were quantified by Northern hybridization analysis. At 7 days after MI, we found an 8-fold increase of renin mRNA expression and a 3-fold increase of ACE mRNA expression in the infarcted LV. However, as discussed in chapter 6 we did not find a difference in cardiac angiotensinogen mRNA expression between infarcted and sham animals. Hepatic AO mRNA levels were not changed following MI. Renal renin and pulmonary ACE mRNA expression increased respectively 3 and 1.7 fold following MI. Seven days of captopril treatment had no effect on the intracardiac expression of the components of the RAS. In sham animals captopril treatment resulted in an increase of renal renin mRNA, whereas it had no effect on hepatic AO and pulmonary ACE mRNA levels. The increase of pulmonary ACE in infarcted animals was suppressed after treatment with captopril. ANF mRNA expression was increased in all compartments of the heart after MI. However, captopril treatment of the MI-animals resulted did not completely suppress ANF mRNA expression in the different compartments. These data indicate an activation of the intracardiac and the systemic renin and ACE genes, but not of AO following MI. Furthermore these data suggest a differential feedback regulation of the intracardiac and systemic RAS in infarcted and sham animals.

In summary, the data presented in this thesis show that activation of the components of the intracardiac RAS does not occur in the non-infarcted hypertrophied myocardium, indicating that the intracardiac RAS does not play a dominant role in the development of cardiac hypertrophy following MI in the rat. However, the intracardiac activation of the renin and ACE genes in the border zone of the infarct area suggests a role for the intracardiac RAS in wound healing. Furthermore, the differential effects of captopril treatment on the intracardiac and systemic RAS in infarcted rats, suggests that the intracardiac RAS in the infarcted rat is less sensitive for ACE-inhibition than the systemic RAS.

SAMENVATTING

Cardiale hypertrofie (het toenemen van de massa van de hartspier) leidt tot een verhoogde morbiditeit en mortaliteit. Hypertensie en myocard infarct (MI) zijn bijvoorbeeld belangrijke oorzaken van cardiale hypertrofie. Er zijn aanwijzingen dat het renine-angiotensine-systeem (RAS) in het hart (intracardiaal) een belangrijke rol speelt in de ontwikkeling van cardiale hypertrofie. In dit proefschrift zijn experimenten gedaan om het belang van het intracardiale RAS in de ontwikkeling van cardiale hypertrofie te bestuderen. Verder zijn experimenten uitgevoerd om het RAS te bestuderen in fysiologische en pathofysiologische omstandigheden.

In **hoofdstuk 3** is de regulatie van angiotensinogeen (AO) en renine, twee componenten van het RAS, bestudeerd in verschillende weefsels, 7 dagen na het afbinden van de aorta (aorta coarctatie), 24 uur na het verwijderen van de 2 nieren (bilaterale nefrectomie) en 24 uur na behandeling met een angiotensin I-convertering-enzyme (ACE)-remmer (captopril) in Wistar Kyoto (WKY) ratten. De opzet van deze experimenten is zo gekozen, omdat ze een verschillend effect hebben op het systemische (circulerende) RAS. Elk afzonderlijk experiment resulteerde in verschillende plasma angiotensine II (ANG II) en plasma renine spiegels, twee belangrijke modulatoren in de regulatie van AO en renine productie. Verder leidt aorta coarctatie tot cardiale hypertrofie, waardoor het mogelijk is om de rol van AO en renine in de ontwikkeling van cardiale hypertrofie te bestuderen. Nefrectomie leidde tot een significante verhoging van AO mRNA hoeveelheden in de lever en in de hersenen, terwijl AO mRNA hoeveelheden in de andere onderzochte weefsels niet beïnvloed werden. Renine mRNA expressie werd niet beïnvloed na nefrectomie in de onderzochte weefsels. Zowel aorta coarctatie als captopril behandeling resulteerden in een verlaagde AO mRNA expressie in de atria van het hart. Geen verschil in AO mRNA expressie werd waargenomen in de andere onderzochte weefsels noch na aorta coarctatie noch na captopril behandeling. Opnieuw was ook na aorta coarctatie geen verschil waarneembaar in renine mRNA expressie in de verschillende weefsels. Renale renine mRNA expressie was verhoogd na captopril behandeling. We concludeerden dat er een verschillende regulatie van AO en renine mRNA bestaat in de verscheidene bestudeerde weefsels. AO mRNA in de hersenen en de lever blijkt tonisch geremd te worden door renine, terwijl dat niet het geval is in de atria. In de nier werd een negatieve feedback van renine mRNA expressie door ANG II waargenomen, maar niet in de andere bestudeerde weefsels. Verder concludeerden we dat cardiale hypertrofie, zoals waargenomen na aorta coarctatie, niet noodzakelijk geassocieerd is met een verhoogde AO en renine mRNA expressie.

In **hoofdstuk 4** ondergingen Wistar ratten een sham- of een MI-operatie, een model geschikt voor het bestuderen van cardiale hypertrofie en wondgenezing. Op verschillende tijdstippen na de operatie werd het hart verwijderd en onderverdeeld in linker ventrikel (LV), septum (SE) en rechter ventrikel (RV). We bestudeerden de activatie van het angiotensin I-convertering-enzyme (ACE) gen (ACE mRNA) en eiwit

(ACE-activiteit) in het geïnfarceerde rattehart. Verder werd ook de lokalisatie van ACE mRNA en het eiwit (ACE-immunoreactiviteit) bestudeerd. Vanwege het feit dat cardiale ACE mRNA hoeveelheden laag zijn, hebben we gebruik gemaakt van een zeer gevoelige competitieve reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) voor het kwantificeren van ACE mRNA hoeveelheden. Een 3-voudig verhoging van ACE mRNA werd gevonden in de geïnfarceerde LV, 4 en 7 dagen na een MI. In het niet-geïnfarceerde myocard was er geen verschil in ACE mRNA hoeveelheden, vergeleken met de sham dieren. ACE mRNA en ACE-immunoreactiviteit werd op 4 dagen na sham of MI-operatie gelokaliseerd door middel van respectievelijk in situ hybridisatie (ISH) en immunohistochemie. Een hoge ACE mRNA densiteit en een hoge ACE-immunoreactiviteit werd voornamelijk in endotheelcellen waargenomen in het randgebied van het infarct. In het niet-geïnfarceerde hart en het sham hart werd ACE mRNA en ACE-immunoreactiviteit waargenomen in endotheelcellen van grotere vaten. De ACE-activiteit in het hart, gemeten op 7 en 90 dagen na de operatie, was 3-voudig verhoogd op beide tijdstippen in de geïnfarceerde LV, maar was onveranderd in het SE en RV, vergeleken met de sham dieren. Hieruit concludeerden we dat het intracardiale ACE geen belangrijke rol speelt in de ontwikkeling van hypertrofie na een myocard infarct. Daarentegen suggereerden we dat het intracardiale ACE een rol zou kunnen spelen in de wondgenezing na een MI.

In **hoofdstuk 5** bestudeerden we de expressie en lokalisatie van renine mRNA in het rattehart na een MI op verschillende tijdstippen. WKY ratten ondergingen een sham- of een MI-operatie. Door middel van competitieve RT-PCR werden renine mRNA hoeveelheden in het hart gekwantificeerd. Atrial natriuretic factor (ANF), een indicator voor cardiale hypertrofie, werd bepaald door middel van Northern hybridisatie analyse, in de verschillende compartimenten van het hart op 1, 7 en 90 dagen na operatie. In sham dieren waren cardiale renine mRNA hoeveelheden zeer laag. Echter, renine mRNA hoeveelheden in de geïnfarceerde LV waren aanzienlijk hoger. Op 2, 4, en 7 dagen na een MI werd respectievelijk een 4, 17 en 8-voudig verhoging van renine mRNA hoeveelheden gevonden in de geïnfarceerde LV. Renine mRNA hoeveelheden in het niet geïnfarceerde hypertrofe hart waren zeer laag en niet te onderscheiden van renine mRNA hoeveelheden in het hart van sham dieren. ANF mRNA expressie was 2-voudig verhoogd in alle compartimenten op 1, 7 en 90 dagen na MI. Renine mRNA werd gelokaliseerd in het hart door middel van ISH op 4 dagen na MI, het tijdstip met de hoogste renine mRNA hoeveelheden (*vide supra*). Een hoge renine mRNA densiteit werd waargenomen in het randgebied van het infarct. In dit gebied was renine mRNA waarschijnlijk gelokaliseerd in (myo)fibroblasten maar niet in cardiomyocyten en endotheelcellen. In het niet-geïnfarceerde hypertrofe myocard was de renine mRNA densiteit zeer laag en niet te onderscheiden van die in het hart van de sham dieren. De lage hoeveelheden van renine mRNA in het hart in het niet-geïnfarceerde myocard toont aan dat de intracardiale synthese van renine geen belangrijke rol speelt in de ontwikkeling tot cardiale hypertrofie na een MI in de rat. Echter, de verhoogde renine mRNA expres-

sie in het randgebied van het infarct doet vermoeden dat het intracardiaal gesynthetiseerde renine een role speelt in de wondgenezing na een MI in de rat.

In **hoofdstuk 6** werd de expressie en lokalisatie van AO mRNA bestudeerd in WKY ratten na een sham of MI operatie. Aangezien dezelfde dieren waren gebruikt als in hoofdstuk 5, was de ANF mRNA expressie verhoogd in de compartimenten van het hart na MI (*vide supra*). Net als ACE en renine werd AO mRNA gekwantificeerd op verschillende tijdstippen na de operatie in de verschillende compartimenten van het hart door middel van competitieve RT-PCR. Er was geen verschil in AO mRNA expressie in de verschillende compartimenten van het hart tussen geinfarceerde en sham dieren op de verschillende tijdstippen na de operatie. ISH toonde een algemeen lage AO mRNA densiteit in het myocard, met een wat hogere AO mRNA densiteit in het epicard. Deze data tonen aan dat intracardiale synthese van AO geen belangrijke rol speelt in de ontwikkeling van cardiale hypertrofie of wondgenezing in het rattehart na een MI.

In **hoofdstuk 7** onderzochten we de feedback regulatie van de expressie van de componenten van het intracardiale en het systemische RAS door interventie van het RAS in WKY ratten na een MI, met of zonder behandeling met de ACE-remmer captopril. Zeven dagen na de operatie werden de dieren opgeofferd en de verschillende compartimenten van het hart, de longen, lever en nieren werden verwijderd. Cardiale AO, renine en ACE mRNA en renale renine mRNA werden gekwantificeerd door middel van de competitieve RT-PCR. Hepatische AO, pulmonaire ACE en cardiale ANF mRNA expressies werden gekwantificeerd door middel van Northern hybridisatie analyse. 7 dagen na een MI, vonden we een 8-voudige verhoging van renine mRNA expressie en een 3-voudige verhoging van ACE mRNA expressie in de geinfarceerde linker ventrikel. Echter, zoals bediscussieerd in hoofdstuk 6 vonden we geen verschil in cardiale AO mRNA expressie tussen infarct en sham dieren. Hepatische AO mRNA was eveneens niet verhoogd na een MI. Renale renine en pulmonaire ACE mRNA expressie waren respectievelijk 3 en 1.7-voudig verhoogd na een MI. Zeven dagen captopril behandeling had geen effect op de intracardiale expressie van de componenten van het RAS. In sham dieren resulteerde captopril behandeling in een verhoogde renale renine mRNA expressie, terwijl dit geen effect had op de hepatische AO en pulmonaire ACE mRNA hoeveelheden. De verhoogde pulmonaire ACE mRNA hoeveelheden werden teruggebracht naar het basale niveau na captopril behandeling. ANF mRNA expressie was verhoogd in alle compartimenten van het hart na MI. Echter, captopril behandeling van de MI-dieren resulteerde niet in een complete suppressie van de verhoogde ANF mRNA expressie in het hart. Deze data tonen de activatie van de intracardiale en systemische renine en ACE genen aan na een MI, maar niet van AO. Verder wordt er aangetoond dat er een verschillende feedback regulatie bestaat van het intracardiale en systemische RAS in geinfarceerde en sham dieren.

Samenvattend, in dit proefschrift wordt aangetoond dat er geen activatie plaats vindt van het intracardiale RAS in het hypertrofe hart, na een MI. Hieruit conclude-

ren we dat het intracardiale RAS geen belangrijke rol speelt in de ontwikkeling van cardiale hypertrofie na een MI in het rattehart. Echter intracardiale activatie van renine en ACE genen in het randgebied van het infarct in de vroege fase na een infarct, suggereren dat het intracardiale RAS betrokken is bij de wondgenezing na een MI. Verder, de verschillende effecten van captopril behandeling op het intracardiale en systemische RAS in geinfarceerde dieren, suggereert dat het intracardiale RAS in de geinfarceerde rat ongevoeliger is voor ACE-remming dan het systemische RAS.