

The interstitium in myocardial infarction and hypertrophy : experimental and clinical observations

Citation for published version (APA):

Willems, I. E. M. G. (1995). *The interstitium in myocardial infarction and hypertrophy : experimental and clinical observations*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19951013iw>

Document status and date:

Published: 01/01/1995

DOI:

[10.26481/dis.19951013iw](https://doi.org/10.26481/dis.19951013iw)

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 prognosis of patient with left ventricular hypertrophy (LVH), largely depends the occurrence of congestive heart failure. The occurrence of heart failure itself is the result of the primary disease. Progression to congestive heart failure, therefore will occur more often and earlier in time in patients with LVH as a result of hypertension or a myocardial infarction compared to patients with LVH as a result of valvular regurgitation. In experimental studies it has been demonstrated that the structural alterations in the myocardium as a result of LVH are different in the different types of LVH. This diversity in structural alterations may explain the difference in prognosis. Human studies, however, are limited. In the present thesis structural alterations in human myocardium have been studied.

In chapter 2 the changes of interstitial collagen in the human non infarcted interventricular septum after a myocardial infarction as well as in hypertrophic human hearts with or without hypertension are discussed. The collagen amount was determined with the Sirius Red morphometry technique.

The collagen amount was significantly increased in the septum of both the patients with a myocardial infarction as well as the patients with systemic hypertension compared to the patients without LVH. Interesting, however, is the finding that the interstitial collagen content of patients with idiopathic LVH was comparable to the interstitial collagen content of patients without LVH.

The data suggest that the appearance of excessive collagen is not mediated by cardiac hypertrophy per se, but that the underlying cause, infarction or hypertension, is the significant factor.

After myocardial infarction not only the remodeling of the viable myocardium is present in the heart, but also ischemic myocardium with subsequent woundhealing. The woundhealing itself is also essential to the function of the heart and therefore to the prognosis of the patient. Studies detailing human myocardial woundhealing are rare, if present at all. Other tissues however have been studied. In both experimental and human dermal wounding myofibroblasts are transiently present during woundhealing. Tenascin and fibronectin are two matrix proteins known to be present in early experimental woundhealing, and are suggested to function as a meshwork essential to the organization of other matrix proteins such as collagen. TGF- β is suggested to be an important mediator in fibrosis and tissue repair. It is also the only cytokine,

presently known to induce the presence of myofibroblasts in experimental dermal woundhealing.

In chapter 3 to 5 studies detailing human myocardial woundhealing and its possible regulation are described. The presence of myofibroblasts and the matrix proteins tenascin and fibronectin are highlighted in chapter 3 and 4. The distribution of transforming growth factor- β (TGF- β) is studied in chapter 5. In these chapters the myocardium of a group of patients with a myocardial infarction with a different postinfarction time (6 hours till 17 years) was analyzed. The material was immunohistochemically treated with antibodies directed against α -smooth muscle actin (ASMA), a well known marker for myofibroblasts; anti-vimentin and desmin antibodies to further analyze the phenotype of myofibroblasts; antibodies directed against both matrix proteins tenascin and fibronectin, and anti-TGF- β antibody.

The data presented in these chapters led to the following concept of human myocardial woundhealing.

TGF- β , normally present in cardiomyocytes, disappeared 6 hours post-infarction. While fibronectin was already present in the ischemic cardiomyocytes within 1 day, tenascin was found 4 to 6 days postinfarction. The presence of tenascin coincided with that of myofibroblasts, containing TGF- β . Two weeks post myocardial infarction tenascin expression had shifted from the border of the infarction to the centre. At this time the myofibroblasts demonstrated a preferential alignment parallel to the surrounding myocardium in patchy infarctions and parallel to the epi- and endocardium in transmural infarctions. The myofibroblasts remained present parallel to the surrounding tissue, while tenascin and fibronectin expression had disappeared >4 weeks postinfarction.

Another interesting observation was the persistent presence of tenascin but not fibronectin surrounding hibernating cardiomyocytes, present in the non-infarcted subendocardium. TGF- β was present in the cytoplasm of these hibernating cardiomyocytes.

In conclusion, myofibroblasts are present in human myocardial wound healing and remain present in mature scar tissue, in a preferential alignment. This may be the result of the continuous mechanical stress caused by the ongoing contraction and relaxation of the surrounding viable myocardium. The coexpression of TGF- β and ASMA in myofibroblasts at least supports the suggestion that TGF- β is involved the regulation of myofibroblast phenotype expression. Tenascin and fibronectin are transiently present during early myocardial woundhealing.

In addition, tenascin but not fibronectin is present surrounding

hibernating cardiomyocytes, pointing to a functional difference between these proteins. The coexpression of TGF- β and tenascin in both myocardial woundhealing and hibernating myocardium might suggest a regulatory role for TGF- β in early matrix production as well.

Another potent regulatory protein is angiotensin II. In clinical studies, the beneficial effect on longevity of Angiotensin I Converting Enzyme inhibitor therapy has been demonstrated. In chapter 6 a study was described in which rat heart valves, solely consisting of interstitium, were used as a model for structural alterations in a renin-angiotensin-aldosterone-system (RAAS) dependent pressure overload. DNA synthesis, collagen mRNA and protein concentrations were measured in heart valves of Wistar Kyoto rats with acute left ventricular pressure overload, created by intra-renal aortic ligation (AL) as well as in heart valves of age-matched spontaneously hypertensive rats (SHR), a model of chronic hypertension.

The cumulative 5'Bromo-2'deoxy-Uridine labeling fraction (LF), an indication for DNA synthesis, in the mitral, aortic and tricuspid valve was evaluated. All valves of AL animals had a significant increase in LF compared to sham animals. Labeling fractions of heart valves in SHR were not increased as compared to normal WKY.

The total collagen concentration in the three heartvalves did not change. The mRNA amounts of both collagen type I and III, detected by *in situ* hybridization, were increased in the heart valves of AL and SHR animals as compared to the two control groups (SHAM and WKY). In all 3 heart valves, interstitial cells were vimentin positive, but desmin negative. A fraction of interstitial cells showed ASMA positivity. This immunophenotype did not change during pressure overload.

Thus, heart valves have the capacity to adapt to acute pressure overload, by means of DNA synthesis and increased collagen production. This structural alterations are in keeping with the alterations elsewhere in the heart. The absence of increased collagen content, however, suggests an increased collagen turnover. This difference in remodeling indicates that heartvalves are not an ideal model for the cardiac interstitium. The remodeling, however, could lead to heartvalve disease and subsequent increase the effects of pressure overload. The increase in LF in the normotensive tricuspid valve also suggests a role for an additional circulating factor.

SAMENVATTING

De prognose van patiënten met myocardhypertrofie wordt grotendeels bepaald door het al of niet ontstaan van hartfalen. Dit falen van de linker ventrikel wordt medebepaald door het onderliggende hartlijden. Zo wordt dit hartfalen frequenter en op een eerder tijdstip waargenomen bij patiënten waarbij de linker ventrikel hypertrofie ontstaan is na een langdurig bestaande systemische hypertensie of een myocardinfectie, dan bij patiënten waarbij de hypertrofie ontstaat bij een insufficiëntie van de aorta of mitralis kleppen.

De oorzaken van dit verschil in prognose zijn onduidelijk. Variaties in de opbouw en samenstelling van de hartspeer zou een van de verklaringen kunnen zijn. Deze variaties zijn in dierexperimenteel onderzoek aangetroffen en beschreven. Het betreft hier met name veranderingen in de samenstelling en hoeveelheid van het interstitium van het myocard. Over de aard van en de veranderingen die optreden in de samenstelling en bestanddelen van het interstitium van het myocard bij de mens is nog slechts weinig bekend en vormt het onderwerp van dit proefschrift.

In hoofdstuk 2 worden veranderingen in de hoeveelheid collageen in het interstitium van het humane hart beschreven. Onderzocht werd materiaal van patiënten met een linker ventrikel hypertrofie bij een myocardinfectie, een groep patiënten met myocardhypertrofie bij hypertensie, en een groep met idiopathische LVH en vergeleken met een controle groep zonder myocard hypertrofie. De hoeveelheid collageen in het myocard van het interventriculaire septum werd geanalyseerd middels de Sirius Rood morfometrie techniek.

De hoeveelheid collageen in de beide groepen patiënten met LVH op basis van een myocardinfectie en op basis van systemische hypertensie was significant hoger dan in de groep patiënten zonder hartafwijkingen. Verrassend evenwel was dat de hoeveelheid interstitieel collageen in de groep patiënten met idiopathische myocardhypertrofie niet verschilde van die waargenomen in de groep zonder hartafwijkingen.

Dit suggereert dat de aard van het onderliggende lijden en niet de aanwezigheid van LVH alleen, de toename in interstitieel collageen in het hypertrofe myocard verklaart.

Na een myocardinfectie is niet alleen het interstitiële collageen van belang in het verdere beloop, ook de wondgenezing zelf is essentieel voor de prognose van de patiënt. De wondgenezing in het hart is nauwelijks beschreven. Wel zijn er experimentele studies aangaande

ander weefsels en aspecten van wondgenezing. Zo is van de wondgenezing in de huid bekend dat myofibroblasten tijdelijk aanwezig zijn. Ook zijn extracellulaire matrix eiwitten beschreven zoals tenascine en fibronectine. Beide eiwitten worden verondersteld te dienen als tijdelijke matrix waardoor ander eiwitten zoals collageen, zich kunnen organiseren. Als regulerend eiwit, wordt TGF- β gepostuleerd. Dit cytokine induceert fibrose formatie, maar is ook bekend als regulator van de expressie van het myofibroblastaire fenotype, zoals beschreven in experimentele wondgenezing in de huid.

In de hoofdstukken 3 tot en met 5 wordt de wondgenezing in het humane hart en de mogelijke regulatie hiervan beschreven.

Hoofdstuk 3 en 4 beschrijven studies naar de aanwezigheid van myofibroblasten en matrixeiwitten zoals tenascine en fibronectine in het myocard infarct. Hoofdstuk 5 beschrijft een onderzoek naar de aanwezigheid van transforming growth factor- β (TGF- β), een cytokine van belang zo niet essentieel in de regulatie van de wondgenezing.

In al deze hoofdstukken werd het myocard van een groep patiënten bestudeerd waarbij het myocard infarct op verschillende tijdstippen voor het overlijden was ontstaan. Deze varieerden tussen de 6 uur en de 17 jaar. Het materiaal werd immunohistochemisch bewerkt met verschillend antilichamen. Ter typering van de myofibroblasten werden anti- α -gladde spier cel actine (ASMA), anti-desmine en anti-vimentine gebruikt. De overige antilichamen waren gericht tegen tenascine en fibronectine en TGF- β .

De in deze hoofdstukken beschreven bevindingen hebben geleid tot het volgende concept van wondgenezing in het humane hart.

TGF- β is normaal aanwezig in cardiomyocyten, maar kan 6 uur na het infarct niet meer worden aangetoond. 12 uur na het ontstaan van het infarct is fibronectine aanwezig, dit in tegenstelling tot tenascine dat pas na 4 tot 6 dagen wordt aangetroffen. Tegelijk met de aanwezigheid van tenascine kunnen ook myofibroblasten worden aangetoond. Deze myofibroblasten bevatten TGF- β , dat daarmee opnieuw verschijnt in de wondgenezing. Circa twee weken na het infarct kan tenascine voorheen uitsluitend gelokaliseerd aan de rand van het infarct ook in het infarct-centrum worden aangetroffen. Tegelijk vindt er een verschuiving plaats van de myofibroblasten, die nu met hun lange as parallel aan het omgevende weefsel gelokaliseerd zijn. Deze parallelle rangschikking behouden ze tot zelfs 17 jaar na het infarct. Tenascine en fibronectine zijn 4 weken na het myocardinfarct niet meer te detecteren.

Een volgend opvallend feit was de aanwezigheid van tenascine en de afwezigheid van fibronectine rond hibernerende cardiomyocyten

aanwezig in het subendocardium. Voorts werd in het cytoplasma van deze cardiomyocyten TGF- β aangetroffen.

Een van de meest opvallende bevindingen was de aanwezigheid van myofibroblasten in de wondgenezing na een myocardinfarct. Opmerkelijk was met name dat deze cellen aanwezig blijven in matuur litteken weefsel en zelfs 17 jaar na een myocardinfarct nog kunnen worden aangetoond. Een verklaring hiervoor zou kunnen zijn de voortdurend aanwezige mechanische stress in het hart zowel tijdens de contractie als de relaxatie van het hart. Dat in het cytoplasma van myofibroblasten TGF- β kan worden aangetoond steunt de veronderstelling dat het cytokine TGF- β een belangrijke rol speelt in de regulatie van de expressie van het myofibroblastaire fenotype.

De aanwezigheid van tenascine en fibronectine in de wondgenezing na een myocardinfarct is van voorbijgaande aard. De aanwezigheid van tenascine en niet fibronectine rond hibernerende cardiomyocyten kan een aanwijzing zijn voor een mogelijk functioneel verschil tussen beide eiwitten. Het vrijwel gelijktijdig verschijnen van het cytokine TGF- β en het matrixeiwit tenascine in de wondgenezing en de coexpressie van beide in en rond het hibernerend myocard suggereert dat dit cytokine een regulerende rol speelt in de expressie van vroege matrix eiwitten.

Een ander, bekend, regulerend eiwit is angiotensine II. In meerdere klinische studies is aangetoond dat Angiotensine I Convertering Enzyme inhibitor (ACEi) therapie een gunstig effect heeft op de overleving van de patiënt met LVH na myocard infarct of hypertensie. In hoofdstuk 6 word een studie beschreven waarbij de hart kleppen van de rat zijn bestudeerd. Deze kleppen, die volledig uit interstitium bestaan, dienden als model voor structurele veranderingen in een Renine-Angiotensine-Aldosterone-systeem afhankelijk druk overbelasting van de linker ventrikel. DNA synthese, mRNA van collageen I en III en eiwit concentraties zijn bepaald in hartkleppen van Wistar Kyoto ratten (WKY) met een acute druk overbelasting van de linker ventrikel door een ligatie van de abdominale aorta (AL). Ook werden de kleppen van even oude spontaan hypertensieve ratten (SHR) geanalyseerd als een model voor chronische hypertensie.

De 5'Bromo-2'deoxy-Uridine cumulatieve labelings index (LI), een maat voor DNA synthese, werd bepaald in de mitralis, aorta klep en tricuspidalis. Alle hartkleppen van de AL groep toonden een significant hogere LI vergeleken met de SHAM geopereerde dieren. De labelings index van hartkleppen van de SHR groep was vergelijkbaar met die van normale WKY's.

De totale hoeveelheid collageen bleef constant in alle hartkleppen. Wel werd er een toename gezien aan mRNA collageen I en III in de hartkleppen van de AL groep en van de SHR groep.

De interstitiële cellen in de drie hartkleppen bevatten vimentine. Desmine werd niet aangetroffen. Een constant deel van de cellen bevatte voorts α -gladde spiercel actine ten teken van myofibroblastaire differentiatie.

Dus, hartkleppen bezitten de mogelijkheid zich aan te passen aan acute druk overbelasting, door DNA synthese en een toename in collageen produktie. Deze structurele veranderingen zijn overeenkomstig die, elders in het hart. Een duidelijk verschil is echter de afwezigheid van collageen hoeveelheid toename, hetgeen een verhoogde collageen turnover suggereert. Dit duidelijke verschil toont aan dat hartkleppen geen ideaal model zijn voor het totale interstitium in het hart, maar het toont tevens aan dat hartkleppen actief metaboliserende structuren zijn. De structurele veranderingen in hartkleppen kunnen aanleiding geven tot hartklep afwijkingen, die opnieuw de effecten van de drukoverbelasting versterken: een vicieuze cirkel. De toename van LI in the normotensieve tricuspidalis suggereert voorts het bestaan van een circulerende factor van belang bij de regulatie deze structurele veranderingen.