

Structural changes in the cardiac interstitium following myocardial infarction : focus on the renin-angiotensin-system and the sympathetic nervous system

Citation for published version (APA):

Kuizinga, M. C. (1999). *Structural changes in the cardiac interstitium following myocardial infarction : focus on the renin-angiotensin-system and the sympathetic nervous system*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19990312mk>

Document status and date:

Published: 01/01/1999

DOI:

[10.26481/dis.19990312mk](https://doi.org/10.26481/dis.19990312mk)

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.

Download date: 30 Jan. 2023

Summary
Samenvatting
Curriculum vitae
Dankwoord

Summary

Heart failure is a very common syndrome with an increasing incidence and prevalence. One of the major causes of heart failure is acute myocardial infarction. Understanding of the pathophysiology of heart failure is important for an adequate approach to therapy. At the present time, it is postulated that in heart failure, endogenously activated neurohumoral systems, like the renin-angiotensin system and the sympathetic nervous system lead to progression of the syndrome. A fundamental aspect of this hypothesis is that these control mechanisms can induce structural changes in de heart (termed 'cardiac remodeling') and thereby influence the natural course of heart failure.

The rat infarct model is a well established experimental model of cardiac failure. In this model, cardiac remodeling has been examined extensively. It has been shown that in the non-infarcted part of the myocardium, besides changes in

myocytes, alterations take place in the cardiac interstitium, like an increase in DNA synthesis and in collagen content.

The aim of the experiments presented in the present thesis is to further investigate, in a rat model of myocardial infarction, the regulation of these changes which occur in the interstitium of the non-infarcted part of the myocardium, by further characterizing the effects of the renin-angiotensin system and the sympathetic nervous system on these responses.

Chapter 1, a general introduction, provides an overview of the literature concerning several aspects of the cardiac remodeling process following myocardial infarction. This is followed by a discussion on the renin-angiotensin system and the sympathetic nervous system. Attention is paid to the relationship between these two systems and cardiac structure in particular. Finally, the aim and the hypothesis of the present thesis is presented.

In **chapter 2** the phenotype of the cells participating in the increased post-infarction DNA synthesis was further identified. Previous studies have shown that the increase in DNA synthesis was almost entirely found in interstitial cells, i.e. fibroblasts and endothelial cells. In this chapter a method was described by which DNA synthesizing endothelial cells can be visualized in paraffin embedded rat heart tissue.

First, in order to find a reliable endothelial cell marker to visualize the capillary network in paraffin embedded rat heart tissue, a panel of several “vascular cell markers” was evaluated. Best staining results were obtained with the lectin *Griffonia simplicifolia* I (GSI).

Second, the percentage of DNA synthesizing endothelial cells was quantified in sham-operated and infarct animals. To this end, myocardial infarction (MI) was induced by ligation of the left anterior descending coronary artery in Wistar rats. Sham-operated (same surgery procedure without ligation) animals served as controls. MI rats and sham-operated rats were infused with 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) to label DNA synthesizing cells. A double staining technique using the lectin GSI together with an anti-BrdU-antibody was developed to visualize DNA synthesizing endothelial cells. In this way, the majority of DNA synthesizing cells was identified in ‘non-endothelial cells’, the fibroblasts. However, a substantial proportion (about one-third) of DNA synthesis was shown to occur in microvascular endothelial cells, likely reflecting enhanced

growth of the microvasculature in the non-infarcted part of the left ventricle in the first two weeks after infarction.

In **chapter 3** the effects of early treatment with two ACE-inhibitors (captopril or perindoprilat) on post-infarction DNA synthesis of endothelial and non-endothelial cells were investigated. Results indicated that both early captopril and perindoprilat treatment inhibited total DNA synthesis in MI hearts. By means of the double staining technique (using a monoclonal anti-BrdU-antibody and the lectin GSI, as described in chapter 2) it was shown that only in captopril treated hearts, this inhibition was associated with a disproportionate inhibition of the endothelial cell proliferation.

Also, the functional consequences of ACE-inhibition on endothelial cell proliferation, reflected by the effect on maximal coronary flow, were determined in separate groups. In isolated retrogradely perfused rat hearts, it was shown that maximal coronary flow was completely normalized in MI hearts within three weeks after surgery. Early captopril (from day 0-21 after surgery), but not late captopril (day 21-35), inhibited the normalization of maximal coronary flow in MI hearts.

Thus, the results indicated that early captopril treatment inhibited endothelial cell proliferation and coronary vessel growth following myocardial infarction.

Having determined the effects of ACE-inhibition on total DNA synthesis and the DNA synthesis in endothelial cells, **chapter 4** describes the effects of blockade of the angiotensin II receptor subtypes 1 (AT_1) and 2 (AT_2) on these parameters. The AT_2 receptor antagonist PD123319, but not the AT_1 receptor antagonist GR138950C significantly reduced total interstitial DNA synthesis. Both agents did not alter the fraction of DNA synthesizing endothelial cells.

The effects of blockade of both these AT receptor subtypes on hemodynamic parameters were also studied in parallel experiments. Myocardial infarction reduced cardiac function at 3 weeks after myocardial infarction. PD123319 further reduced the already impaired cardiac function, whereas GR138950C did not show such effect.

Thus, the data indicate that the increase in DNA synthesis in cardiac endothelial cells and non-endothelial cells after myocardial infarction is - at least partially-mediated through AT_2 receptors. In addition, the inhibitory effects of AT_2 receptor blockade on interstitial cell DNA synthesis and cardiac function suggest that the hemodynamic effects of AT_2 receptor blockade after myocardial infarction may

depend upon reduction of DNA synthesis of endothelial cells and/or non-endothelial cells in the hypertrophying myocardium.

Evidence exists that, besides the renin angiotensin system, the sympathetic nervous system may also influence the process of remodeling in the cardiac interstitium. However, effects of drugs interfering with the sympathetic nervous system on interstitial remodeling early after infarction are not known. Therefore, effects of early treatment with different pharmacological agents either stimulating (chapter 5) or reducing (chapter 6) the adrenergic drive on cardiac DNA synthesis and collagen content were studied in the infarct-model.

In **chapter 5** the effects of adrenergic stimulation by dobutamine (α_1 - and β -adrenergic) were characterized in rats following myocardial infarction. In a parallel study the effects of milrinone (a phosphodiesterase III inhibitor) were determined. Phosphodiesterase III inhibition results in inhibition of the degradation of the second messenger cyclic adenosine monophosphate (cAMP), thereby mimicking β -adrenoceptor stimulation in a non- β -adrenoceptor mediated fashion. The relative collagen area of the non-infarcted left ventricle was determined morphometrically. The collagen content was significantly increased in the left ventricle of infarct animals, which confirms previous observations. The results indicate that adrenergic stimulation by dobutamine -possibly through stimulation of α_1 -adrenoceptors- after myocardial infarction affects the structure of the cardiac interstitium through further stimulation of DNA synthesis, but does not affect cardiac collagen content. The dobutamine-induced collagen deposition in sham animals in the present study may also depend upon α_1 -adrenergic stimulation, since phosphodiesterase inhibition by milrinone did not affect this parameter. In MI animals, collagen deposition may already be stimulated to its maximum.

There is now considerable interest in the use of sympatholytic drugs in the treatment of heart failure. Beneficial effects of β -adrenoceptor blocking drugs in clinical trials for this syndrome have been observed. Based upon the proposed suppression of arrhythmias as one of the potential mechanisms for the improvement in clinical outcome, together with the notion that cardiac interstitial fibrosis contributes to the development of arrhythmias, we sought to investigate the effects of β -adrenoceptor blockade and central sympatholysis on interstitial changes following infarction in rats. The experiments also follow the observations

in chapter 5, which led us to propose that the (presumed) sympathetic component in the control of collagen changes is maximally activated in this model for heart failure.

Thus, in **chapter 6** it was tested whether adrenergic blockade by means of the non-selective β -adrenergic receptor antagonist propranolol, or by means of the centrally acting sympatholytic agents clonidine or moxonidine, affects cardiac fibrosis and DNA synthesis after infarction in the rat.

We did not observe any significant effects of the β -blocker propranolol, nor of the centrally acting sympatholytic drugs clonidine and moxonidine on cardiac interstitial remodeling following myocardial infarction. In contrast, collagen content was increased after treatment with the above mentioned agents in sham-operated animals.

In conclusion, sympathetic inhibition does not affect fibrosis after infarction, possibly because of activation of the fibrotic process by other more dominant systems early after infarction. Similarly, interstitial cell proliferation is unaffected. Our data indicate that, in the early phase following myocardial infarction, the sympathetic nervous system does not substantially contribute to the control of interstitial remodeling.

In **chapter 7** the data obtained in the studies described in the previous chapters are discussed.

Samenvatting

Hartfalen vormt een toenemend medisch probleem, niet alleen door de verbeterde behandeling van het acute hartinfarct, een van de belangrijkste oorzaken van hartfalen, maar ook door de vergrijzing van de bevolking. Beter inzicht in de pathofysiologie van het hartfalen biedt een rationele basis voor het ontwikkelen en toepassen van therapeutische maatregelen. In dit verband gaat tegenwoordig veel belangstelling uit naar neurohumorale systemen zoals het renine-angiotensine systeem en het sympatisch zenuwstelsel als mogelijke factoren die betrokken zijn bij de ontwikkeling van hartfalen. Een ander wijdverbreid concept is dat veranderingen in de structuur van het hart (in de angelsaksische literatuur 'cardiac remodeling' genoemd) een belangrijke rol spelen in de ontwikkeling van hartfalen. Daarbij zijn er veel aanwijzingen dat activatie van het renine-angiotensine systeem en het sympatisch zenuwstelsel structuurveranderingen in het hart tot gevolg kan hebben.

Een beproefd experimenteel model voor hartfalen is het infarct-model bij de rat, waarin de veranderingen die optreden in de structuur van de hartspeer uitgebreid zijn onderzocht. Het is gebleken dat in het niet-geïnfarceerde deel van het hart, naast hypertrofie van spiercellen, veranderingen optreden in het ondersteunende weefsel, het zgn. interstitium. Zo is in eerdere studies aangetoond dat in het interstitium, na infarctering, de hoeveelheid collageen alsmede de DNA-synthese (een maat voor celproliferatie) toenemen in het niet-geïnfarceerde gedeelte van het hart.

Het doel van dit proefschrift is de regulatie van de veranderingen in het interstitium in het niet-geïnfarceerde deel van het myocard nader te onderzoeken, waarbij speciale aandacht wordt besteed aan het renine-angiotensine systeem en het sympatisch zenuwstelsel als mogelijke modulators van deze veranderingen.

Hoofdstuk 1 is een algemene introductie en biedt een overzicht van de literatuur aangaande structuurveranderingen in het myocard na een hartinfarct. Daarna volgt een beschrijving van het renine-angiotensine systeem en het sympatisch zenuwstelsel, waarbij met name wordt ingegaan op de invloed van deze systemen op de structuur van het hart. Aan het einde van het hoofdstuk worden de doelstelling en de hypothese van dit proefschrift beschreven.

In **hoofdstuk 2** werden de interstitiële cellen nader geïdentificeerd die na een infarct een verhoogde DNA-synthese laten zien. De celpopulatie van het interstitium bestaat voornamelijk uit fibroblasten en endotheelcellen. Een mogelijkheid om in dit model het aandeel van beide celtypen in de verhoogde DNA-synthese te bepalen is het zichtbaar maken van de microvasculatuur van het in paraffine ingebedde rattenhart en de DNA-synthese in deze microvaten te kwantificeren.

Hiertoe werd allereerst de geschiktheid van een aantal zgn. 'vasculaire markers' getest. De beste marker bleek *Griffonia simplicifolia* I ("GSI", een lectine) te zijn. Een beproefde methode ter kwantificering van de DNA-synthese is het toedienen van 5-bromo-2'-deoxyuridine ("BrdU", een thymidine-analoog). De resulterende BrdU-incorporatie in het DNA wordt vervolgens zichtbaar gemaakt door deze te kleuren met behulp van een anti-BrdU-antilichaam. Door middel van een combinatie van GSI en BrdU, m.a.w. een dubbelkleuring, bleek het mogelijk de DNA-synthese in endotheelcellen van de microvasculatuur te bepalen.

De gevolgen van een infarct werden bepaald door een infarct te induceren middels onderbinding van de linker kransslagader. Schijn-geopereerde ratten (zelfde operatieprocedure zonder onderbinding) dienden als controle. Op deze manier werd aangetoond dat het grootste deel van de DNA-synthese in de eerste twee weken na een infarct plaats vond in "niet-endotheelcellen", m.a.w. de fibroblasten. Een substantieel gedeelte (ongeveer eenderde deel) van de totale DNA-synthese vond evenwel plaats in endotheelcellen van de microvasculatuur, hetgeen duidt op een verhoogde vaatgroei in het niet-geïnfarcereerde deel van de linker ventrikel in de vroege fase na een infarct.

In **hoofdstuk 3** werd de modulerende rol van het renine-angiotensine systeem op de interstitiële veranderingen nader onderzocht door, na inductie van een infarct, de effecten te bepalen van twee verschillende angiotensin-convertering-enzyme ("ACE")-remmers, captopril en perindopriilaat, op de DNA-synthese in alle interstitiële cellen, en in de endotheelcellen.

Het bleek dat een vroege toediening van zowel captopril als perindopriilaat resulteerde in een remming van de na een infarct verhoogde totale DNA-synthese. Met behulp van de in hoofdstuk 2 ontwikkelde BrdU-GSI dubbelkleuring werd aangetoond dat alleen captopril een disproportionele remmende werking had op de DNA-synthese in endotheelcellen.

In een aparte studie werden de effecten van captopril op de maximale coronaire flow na infarcering onderzocht. In experimenten met geïsoleerde retrograad geperfundeerde rattenharten bleek dat zonder toediening van captopril de

maximale flow binnen drie weken volledig normaliseerde. Vroege behandeling met captopril (vanaf dag 1 tot 21 na de operatie), maar niet late behandeling (vanaf dag 21 tot 35) bleek de normalisatie van de maximale coronaire flow bij de infarct-ratten te remmen. Concluderend wijzen deze resultaten erop dat een behandeling met captopril in de vroege fase na een hartinfarct de proliferatie van endotheelcellen en coronaire vaatgroei remt.

Na de vaststelling van de effecten van ACE-remming op de totale DNA-synthese en de DNA-synthese in endotheelcellen, beschrijft **hoofdstuk 4** de effecten van specifieke blokkade van de angiotensine receptor subtype 1 (AT_1) en angiotensine receptor subtype 2 (AT_2).

De AT_2 -antagonist PD123319 gaf een significante daling van de totale DNA-synthese te zien. De AT_1 -receptor antagonist GR138950C daarentegen toonde geen effect op de DNA-synthese. Beide stoffen bleken geen verandering te induceren van de fractie van de DNA-synthetiserende endotheelcellen.

In parallelle experimenten werden de effecten van AT_1 - en AT_2 -receptor blokkade op de hartfunctie onderzocht. Zonder medicamenteuze behandeling werd drie weken na inductie van een hartinfarct een afname van de hartfunctie waargenomen. Behandeling met PD123319 verminderde de reeds verslechterde hartfunctie nog meer, terwijl GR138950C geen effect had. Concluderend wijzen deze resultaten erop dat de toename van de DNA-synthese (door endotheelcellen en fibroblasten) na een hartinfarct - ten minste ten dele - wordt gemedieerd door de AT_2 -receptor. Bovendien suggereert de vermindering van zowel de interstitiële DNA-synthese als van de hartfunctie door AT_2 -receptor blokkade, dat de geconstateerde hemodynamische effecten van AT_2 -receptor blokkade afhankelijk kunnen zijn van een reductie van de DNA-synthese door endotheelcellen en/of fibroblasten in het hypertrofe myocard.

Het is aannemelijk dat, naast het renine-angiotensine systeem, ook het sympatisch zenuwstelsel van invloed is op de structuur van het interstitium van de hartspeer. Onbekend was echter of medicijnen die interfereren met het sympathisch zenuwstelsel effect hebben op de interstitiële structuurveranderingen in een vroege fase na een hartinfarct. In het kader van dit onderzoek werden de effecten bestudeerd van verschillende farmaca met ofwel een stimulerende (hoofdstuk 5), ofwel een remmende (hoofdstuk 6) adrenerge werking, zowel op de interstitiële DNA-synthese als op het collageengehalte in het niet-geïnfarceerde deel van het rattenhart 14 dagen na infarctering.

In **hoofdstuk 5** werden de effecten beschreven van adrenerge stimulatie door dobutamine (een α 1- en β -adrenerge stof). In een parallelle studie werden de effecten van milrinon (een fosfodiësterase III-remmer) bepaald. Fosfodiësterase III-remming resulteert in de remming van de afbraak van de intracellulaire boodschapper cyclisch AMP (cAMP). Aldus wordt stimulatie van de β -adrenerge receptor nagebootst zonder dat er een adrenerge receptor aan te pas komt. Het collageengehalte werd morfometrisch bepaald door middel van meting van het relatieve collageenoppervlak van de niet-geïnfarceerde linker ventrikel. Na infarcering bleek het collageengehalte significant verhoogd, hetgeen resultaten van voorgaande studies bevestigt. De resultaten van de experimenten suggereren dat adrenerge stimulatie d.m.v. dobutamine -mogelijk via α 1-adrenerge receptoren- de structuur van het cardiale interstitium beïnvloedt middels additionele stimulatie van de DNA-synthese, maar geen invloed heeft op het collageengehalte na een hartinfarct. Bij schijn-geopereerde dieren induceerde dobutamine collageendepositie. Dit effect werd mogelijk ook gemedieerd door α 1-receptoren, aangezien fosfodiësterase III-remming d.m.v. behandeling met milrinon geen significant effect had. Voorts zou de collageendepositie bij infarct-dieren reeds maximaal gestimuleerd kunnen zijn.

Het gebruik van sympathicolytische geneesmiddelen vormt een belangrijk onderdeel van de behandeling van hartfalen. In klinische onderzoeken zijn gunstige effecten waargenomen van β -blokkerende medicijnen bij patiënten met hartfalen en/of een hartinfarct. Een van de verklaringen voor de verbetering van het klinisch beloop vormt de onderdrukking van ritmestoornissen door β -blokkade. Cardiale interstitiële fibrose wordt als een van de oorzaken van het ontstaan van ritmestoornissen aangemerkt. Op grond van deze overwegingen en de waarnemingen in hoofdstuk 5, waarin werd geopperd dat de (veronderstelde) sympatische component in de regulering van de collageendepositie maximaal geactiveerd zou kunnen zijn in het gebruikte model van hartfalen, zijn de experimenten met sympathicolytica uitgevoerd zoals beschreven in **hoofdstuk 6**. Uit deze experimenten kwam naar voren dat β -adrenerge blokkade met propranolol geen effect had op de DNA-synthese en het collageengehalte 14 dagen na het induceren van een infarct. Hetzelfde gold voor de centraal werkende sympathicolytica clonidine en moxonidine. Bij schijn-geopereerde dieren bleek daarentegen het cardiale collageengehalte te zijn verhoogd na behandeling met elk van de drie sympathicolytica.

Concluderend blijkt remming van de sympathicus geen meetbare invloed te hebben op de fibrose in het niet-geïnfarceerde deel van het hart. Waarschijnlijk

treedt activatie van het fibrotische proces in de vroege fase na een infarct op onder invloed van andere dominante systemen. Al met al wijzen de resultaten van de experimenten met diverse sympathicolytica erop dat het sympatisch zenuwstelsel in de vroege fase na een infarct geen substantiële bijdrage levert aan de regulering van de onderzochte interstitiële structuurveranderingen.

Ter afronding wordt in **hoofdstuk 7** een beschouwing gegeven van de in voorafgaande hoofdstukken gepresenteerde resultaten.