



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Molecular and cellular characterization of cardiac overload-induced hypertrophy and failure**

Umar, S.

### **Citation**

Umar, S. (2009, June 18). *Molecular and cellular characterization of cardiac overload-induced hypertrophy and failure*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13860>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/13860>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

## Samenvatting

De voornaamste doelstellingen van dit proefschrift betreffen het onderzoek naar moleculaire en cellulaire mechanismen die verantwoordelijk zijn voor harthypertrofie en hartfalen. In een onderzoek naar pulmonale hypertensie in ratten die zijn behandeld met monocrotaline is celtherapie getest met mesenchymale stamcellen met het oogmerk deze ziekte bij patiënten te genezen.

**Hoofdstuk 1** is gewijd aan de inleiding van het proefschrift. Het geeft informatie over de moleculaire en cellulaire eigenschappen van het gezonde hart, het hypertrofische hart en het falende hart. De samenstelling, synthese en afbraak van de extracellulaire matrix (ECM), de integrines en bijbehorende signaleringspaden, stikstofoxide synthases (NOS) en stikstofoxide (NO) worden besproken in verband met het normale, hypertrofische en falende hart. Ook komen experimentele modellen die worden gebruikt voor de bestudering van harthypertrofie en hartfalen aan de orde. De nadruk ligt met name op de karakterisatie en pathologie van de rechterkamer functie in dieren met pulmonale hypertensie op basis van behandeling met monocrotaline.

In **hoofdstuk 2** is de hypothese dat drukoverbelasting van het hart door het myocard wordt "gevoeld" via rek-achtige effecten door de integrines, een familie van receptoren waarmee de cardiomyocyt gehecht is aan bestanddelen van het ECM. In het celmodel van neonatale rattenhart cardiomyocyten (NRCM) *in vitro* hebben we de integrines gestimuleerd met een pentapeptide dat het RGD-motief bevat, Arg-Gly-Asp, om te testen of integrine stimulatie leidt tot NRCM hypertrofie. Het pro-hypertrofische effect van het RGD-bevattende pentapeptide op NRCM is vergeleken met het goed gedocumenteerde pro-hypertrofische effect van  $\alpha_1$ -adrenoceptor stimulatie met fenylefrine (PE). NRCM die met fysiologisch zout zijn behandeld dienden als controle. De hypertrofische respons is gekwantificeerd door meting van het celoppervlak (CSA). Ook is gemeten hoeveel stikstofoxide synthase-1 (NOS1) gefosforyleerd is. Onder invloed van RGD steeg de CSA met 38% en onder invloed van PE met 68%, ten opzichte van controle. Een remmer van NOS, L-NAME, remde de door RGD gestimuleerde hypertrofie van NRCM volledig, maar had geen effect op de door PE gestimuleerde hypertrofie van NRCM. Remming van de door RGD gestimuleerde hypertrofie van NRCM met behulp van L-NAME kon, tenminste gedeeltelijk, worden doorbroken door toevoeging van een NO-donor, nitroprusside. Toevoeging van nitroprusside had geen effect op NRCM die met PE en L-NAME werden behandeld. Ryanodine en BAPTA-AM remden de door RGD gestimuleerde hypertrofie van NRCM volledig, maar niet de door PE gestimuleerde hypertrofie van NRCM, hetgeen betekent dat intracellulaire  $Ca^{2+}$  ionen betrokken zijn bij de door RGD gestimuleerde hypertrofie van NRCM. Onder invloed van RGD steeg het percentage gefosforyleerd NOS-1 met 61%. De conclusie van dit onderzoek was dat integrine stimulatie van NRCM met RGD leidt tot cardiomyocyt hypertrofie. Stopzetten van dit proces met behulp van een NOS remmer en het proces weer aan de gang krijgen met behulp van een NO-

donor doet ons vermoeden dat de door RGD gestimuleerde hypertrofie van NRCM afhankelijk is van NO, waarschijnlijk NO afkomstig van NOS1.

In **hoofdstuk 3** laten we zien dat hartfalen geassocieerd kan zijn met een verstoord collageen metabolisme. In patiënten met hartfalen kan de omzetting van collageen worden gemeten aan de hand van de serum concentraties van de aminoterminalen propeptiden van type I en type III collageen (resp. PINP en PIIINP) en het carboxyterminale telopeptide van type I collageen (ICTP) die maten zijn van hetzij collageen synthese (PINP, PIIINP) of collageen degradatie (ICTP). In 64 patiënten met hartfalen onderzochten wij de effecten van cardiale resynchronisatie therapie (CRT) op myocardiale collageen omzetting door meting van PINP, PIIINP en ICTP in serum verkregen vóór en 6 maanden na start van CRT. De hypothese was dat in patiënten met hartfalen CRT leidt tot kamerverkleining (na kamerdilatatie) die samen gaat met een toename van de myocardiale collageen concentratie. Zesenvestig patiënten (72%) vertoonden een >10% afname van hun linkerkamer eind-systolisch volume na 6 maanden en zij werden op basis hiervan responders genoemd. De andere 18 patiënten (28%) werden non-responders genoemd. Responders lieten een gemiddelde toename van serum PINP en PIIINP zien in de eerste 6 maanden, met resp 42% en 12%. In non-responders veranderden de serum PINP en PIIINP concentraties niet in de eerste 6 maanden. Voor aanvang van CRT hadden de responders significant lagere (met 21%) serum PINP concentraties dan non-responders. Serum ICTP concentraties van responders voor aanvang van CRT waren hoger (met 70%) dan die van non-responders, maar dit verschil was statistisch niet significant. In beide groepen veranderden de serum ICTP concentraties niet in de eerste 6 maanden. Onze conclusie was dat kamerverkleining (na kamerdilatatie) onder invloed van CRT geassocieerd is met een toegenomen myocardiale collageen synthese in de eerste 6 maanden van CRT.

Al lange tijd is bekend dat de door monocrotaline (MCT) opgewekte pulmonale hypertensie (PAH) en rechterkamer hypertrofie in ratten geassocieerd zijn met activatie van matrix metalloproteinases (MMP) in rechterkamer (RV) myocard. In **hoofdstuk 4** onderzochten wij of NO een rol speelt in de door PAH opgewekte RV hypertrofie en RV falen. Om dat te onderzoeken, gebruikten we twee doses MCT: een lage dosis om alleen RV hypertrofie te veroorzaken (RVH) en een hoge dosis om naast RV hypertrofie ook RV falen (RVF) te veroorzaken. In ratten met RVH en RVF was de ratio RV gewicht/lichaamsgewicht toegenomen met resp. 36% en 109%, terwijl de RV ejectiefractie was afgenomen met resp. 23% en 57%, ten opzichte van controle. In RV myocard van ratten met RVH steeg het fosforyleringspercentage van een met integrines geassocieerd eiwit, focal adhesie kinase (FAK), met een factor 2,5, maar in RV myocard van ratten met RVF steeg FAK-P met slechts 15%. De fosforylering van NOS1 in myocard van ratten met RVH en in myocard van ratten met RVF steeg met een factor van resp. 3,0 en 3,3. RV MMP-2 in ratten met RVH was toegenomen met een factor 3,5 en in ratten met RVF toegenomen met een factor 1,8 ten opzichte van controle. RV MMP-9 was toegenomen in ratten met RVH en RVF met een factor van resp. 2,4 en 2,9. Onze conclusie was dat FAK activatie in ratten met RVH wijst op een integrine-afhankelijke hypertrofische respons van het myocard. Activatie van

NOS1 in het falende RV doet ons vermoeden dat excessieve NO concentraties betrokken zijn bij de ontwikkeling van myocardfalen en de activatie van MMPs die de kamerdilatatatie inleiden.

**Hoofdstuk 5** geeft een uitgebreid overzicht van therapieën van PAH in proefdieren waarover recent is gerapporteerd. PAH is een levensbedreigende ziekte waarbij de longen in belangrijke mate betrokken zijn. Deze betrokkenheid van de longen biedt een aangrijpingpunt voor therapie. De grote verscheidenheid aan therapieën berust voor een groot gedeelte op geneesmiddelen. Hiertoe behoren anti-mitogene middelen, stoffen met endotheel-beschermende werking, vasodilatoren, stoffen die de angiogenese bevorderen, anti-inflammatoire stoffen, anti-oxidanten en stoffen die de apoptose van gladdespiercellen in de pulmonaal arteriën bevorderen. Ook komen moderne therapieën van PAH aan de orde zoals gen- en celtherapie. Dit hoofdstuk wordt afgesloten met een bespreking van de mogelijke toepassingen van experimenteel geteste interventies op patiënten met PAH. Behandeling van patiënten met PAH met autologe mesenchymale stamcellen (MSCs) uit beenmerg is waarschijnlijk veilig en succesvol en zou in die patiëntengroep kunnen worden getest.

**Hoofdstuk 6** beschrijft een onderzoek naar de effecten van stamcel therapie op de long pathologie van ratten met PAH die is opgewekt met MCT. Wij hebben aangetoond dat MSCs die zijn geïsoleerd uit beenmerg van donor ratten met door MCT opgewekte PAH, na intraveneuze inspuiting in ontvanger ratten die 14 dagen eerder waren behandeld met MCT leidden tot (1) minder schade aan het longparenchym, (2) minder hypertrofie van de pulmonale arteriolen en (3) minder RV hypertrofie, dan waargenomen in ratten met door MCT opgewekte PAH die geen stamcel therapie ondergingen. Op het moment van analyse, 28 dagen na behandeling met MCT was de piek-systolische druk in de pulmonaal arterie gestegen van 27.2 tot 41.5 mmHg en het longgewicht toegenomen met 73%. Histologische analyse van de longen liet ernstige vernauwing van de precapillaire arteriolen zien, verdikking van de wand van de arteriolen (toename met een factor 3,4), verdikking van de arteriolaire septa (toename met een factor 3,5), en een toename van het RV gewicht (met 63%), ten opzichte van controle. Behandeling van deze ratten met MSCs, 14 dagen na MCT behandeling, leidde tot verlaging van de piek-systolische druk in de pulmonaal arterie ( $30.7 \pm 4.4$  mmHg), een vrijwel normaal longgewicht (21% hoger dan controle), minder verdikking van de arteriolaire wand (20% hoger dan controle), minder verdikking van de alveolaire septa (9% hoger dan controle) en minder RV hypertrofie (RV gewicht 8% hoger dan controle). Naast ratten met PAH die wel of niet zijn behandeld met MSCs en controle ratten, is nog een vierde groep ratten bestudeerd. Deze groep is 14 dagen na MCT behandeling intraveneus ingespoten met huidfibroblasten van gezonde ratten. Deze ratten lieten veel minder grote reacties, of in het geheel geen reacties, zien op longpathologie, piek-systolische druk in de pulmonaal arterie en RV hypertrofie. Onze conclusie was dat intraveneuze toediening van MSCs, geïsoleerd uit beenmerg van donor ratten met PAH, aan ontvanger ratten met PAH leidde tot (1) lagere piek-systolische druk in de pulmonaal arterie, (2) minder ernstige long pathologie en (3) minder RV hypertrofie. Deze resultaten

ondersteunen een toekomstige toepassing van therapie met autologe MSCs in patiënten met PAH.

In **hoofdstuk 7** zijn de effecten van PAH op de rechterkamer functie van ratten die zijn behandeld met MCT, met of zonder celtherapie, beschreven. Op het moment van analyse, 28 dagen na behandeling met MCT, was de RV ejectiefractie gedaald van 56% naar 42%. In ratten met PAH waarbij 14 dagen na MCT MSCs zijn toegediend was de RV ejectiefractie vrijwel normaal (52%). Ratten waarbij 14 dagen na MCT behandeling huidfibroblasten zijn ingespoten, lieten minder grote verbeteringen op RV functie zien dan ratten die MSCs ingespoten kregen. Deze resultaten geven aan dat patiënten met PAH geholpen kunnen zijn met intraveneuze stamcel therapie gebruik makend van autologe MSCs.

**Hoofdstuk 8** beschrijft een onderzoek naar de electrofysiologische eigenschappen van cardiomyocyten die zijn geïsoleerd uit RV myocard van gezonde ratten. Dit onderzoek moet de basis bieden voor een later onderzoek waarin electrofysiologische eigenschappen van cardiomyocyten die zijn geïsoleerd uit RV myocard van gezonde ratten worden vergeleken met electrofysiologische eigenschappen van cardiomyocyten die zijn geïsoleerd uit RV myocard van ratten met PAH. In RV cardiomyocyten van gezonde rattenharten maakten we gebruik van de normaal aanwezige variabiliteit in exciteerbaarheid van deze cellen. Wij concentreerden ons op de rol van de spanningsafhankelijke  $K^+$  stroom ( $I_{kv}$ ), inclusief de kort-durende stroom  $I_t$  en de lang-durende stroom  $I_{ss}$ , op de actiepotiaal die wordt opgewekt door korte stroompulsjes en op de automaticiteit die wordt opgewekt door lange, depolariserende stroompulsen. In dit vooronderzoek zijn mogelijke mechanismen van door hartfalen geïnduceerde aritmieën onderzocht door meting van de exciteerbaarheid van cardiomyocyten die zijn geïsoleerd uit de RV van het normale rattenhart. Een biofysisch model van de RV cardiomyocyt van het rattenhart dat in 2001 in de literatuur gepubliceerd is was de basis voor het ontwikkelen van een computermodeel waarmee de membraanstromen en membraanspanningen kunnen worden gesimuleerd. Met dit model hebben we de reciproke relatie tussen actiepotentiaalduur en  $I_t$  stroom gereproduceerd. Ook leverde dit model een mechanisme voor de automaticiteit die wordt opgewekt door lange, depolariserende stroompulsen. Met name de deactivatie van  $I_{caL}$  en de deactivatie van  $I_{ss}$  tijdens depolarisatie lijken voor deze automaticiteit verantwoordelijk. Het is nog niet bekend of dit mechanisme van automaticiteit verantwoordelijk is voor het hoge risico op aritmieën in patiënten met hartfalen.

## Conclusies

1. Stimulatie van integrines op het membraan van cardiomyocyten bevordert hypertrofie van de cardiomyocyt via een mechanisme dat stikstofoxide afhankelijk is.
2. Signaaltransductie paden waarin activatie van focal adhesie kinase en stikstofoxide synthase-1 optreedt veroorzaken de activatie van matrix

- metalloproteinases in het falende rechter kamer myocard van ratten met pulmonale hypertensie. Geactiveerd stikstofoxide synthase-1 in het falende myocard doet vermoeden dat hartfalen geassocieerd is met (1) excessieve concentraties van stikstofoxide en met (2) geactiveerde matrix metalloproteinases die betrokken zijn bij het optreden van kamerdilatatie.
3. Kamerverkleining (na kamerdilatatie) als gevolg van cardiale resynchronisatie therapie in patiënten met hartfalen is geassocieerd met een toename van de myocardiale collageen synthese in de eerste 6 maanden na start van therapie.
  4. Intraveneuze toediening van mesenchymale stamcellen van donor ratten met door monocrotaline opgewekte pulmonale hypertensie aan ontvanger ratten met door monocrotaline opgewekte pulmonale hypertensie vermindert de bloeddruk in de pulmonaal arterie, vermindert de rechter kamer hypertrofie en verbetert de rechter kamer functie, verbeteringen die sterk gerelateerd zijn aan verbetering van de long pathologie.
  5. Inzicht in het membraanmechanisme van depolarisatie-geïnduceerde automatie lijkt van belang voor een beter begrip van het hoge risico op aritmieën in patiënten met hartfalen.
  6. De experimenten die in dit proefschrift zijn beschreven zijn bedoeld als bijdrage aan de kennis omtrent moleculaire en cellulaire mechanismen die verantwoordelijk zijn voor harthypertrofie en hartfalen. Wij hopen dat deze experimenten ook mogen bijdragen aan de introductie van stamceltherapie voor patiënten met pulmonale hypertensie met behulp van autologe mesenchymale stamcellen.

### **Toekomstperspectief**

1. Overmatige stikstofoxide concentraties in het falende hart zijn waarschijnlijk schadelijk en kunnen leiden tot nitrosylering van o.a. ryanodine receptoren waardoor ze  $Ca^{2+}$  ionen lekken tijdens diastole. Het is aan te bevelen in de toekomst de effecten van overmatige stikstofoxide concentraties in en op het falende myocard te bestuderen.
2. Verscheidene therapeutische modaliteiten inclusief farmacotherapie, genterapie en celtherapie zijn getest in diermodellen van pulmonale hypertensie, zoals de door monocrotaline opgewekte pulmonale hypertensie in ratten. Een aantal van deze therapieën hebben hun waarde al in patiënten met pulmonale hypertensie bewezen, hetgeen geleid heeft tot een verbeterde levensverwachting en een betere kwaliteit van leven. Echter, vele patiënten met pulmonale hypertensie blijven symptomatisch ondanks therapie. Voor hen zou celtherapie een uitkomst kunnen zijn, maar vooralsnog is er behoefte aan meer onderzoek naar het optimale celtype, naar de vraag of de toe te dienen cellen *in vitro* nog een voorbehandeling moeten ondergaan, naar de route van celtoediening en naar het optimale aantal in te spuiten cellen. Niettemin verwachten wij dat intraveneuze therapie met autologe mesenchymale stamcellen veilig is en effectief voor patiënten met pulmonale hypertensie.

