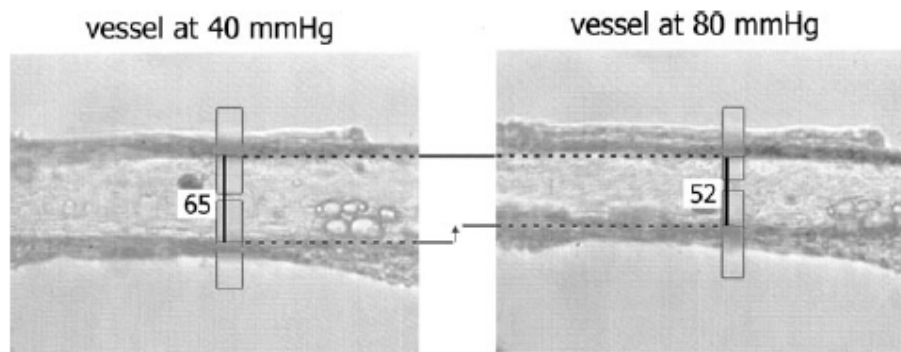


De myogene respons in autoregulatorie vaatbedden

Mechanismes, pathologieën en mogelijke therapieën



Bachelorscriptie Life Science & Technology – Biomedische Wetenschappen

Auteur:	J.H. Seefat
Datum:	26-06-2009
Basiseenheid:	Klinische Farmacologie
Begeleider:	Dr. R.P.E. van Dokkum

De myogene respons in autoregulatorie vaatbedden

Mechanismes, pathologieën en mogelijke therapieën

Bron foto voorkant:

- **R. Schubert et al.**, The emerging role of Ca^{2+} sensitivity regulation in promoting myogenic vasoconstriction, *Cardiovascular Research* (2008) 77, 8–18

Samenvatting

In 1902 beschreef Sir William Bayliss de myogene respons al. De myogene respons wordt gekarakteriseerd door een afname in vaatdiameter, wanneer de transmurale druk stijgt en een toename in vaatdiameter, wanneer de transmurale druk daalt. Autoregulatie staat onder invloed van verschillende mechanismes: metabole factoren, invloed van weefseldruk en myogene respons.

Wanneer er disfunctie in de myogene respons ontstaat, ontwikkelt zich systemische- of orgaanhypertensie, wat in het geval van de nier en het brein kan leiden tot nierfalen of een hersenbloeding.

Stretch-geactiveerde kanalen, calciumgeactiveerde kaliumkanalen, chloridekanalen, calciumkanalen en TRP-kanalen blijken betrokken te zijn bij membraandepolarisatie. Voor calciumkanalen en enkele TRP-kanalen is significant bewijs dat ze betrokken zijn bij de myogene respons, transmembrane calciuminflux blijkt cruciaal te zijn in de ontwikkeling van myogene activiteit. In diverse studies is gebleken dat ze membraandepolarisatie en contractie van de vaatwand stimuleren. Voor de overige kanalen is er nog veel onduidelijk en zijn er veel tegenstrijdige resultaten die nog verder onderzocht zullen moeten worden.

Er is steeds meer bewijs dat verschillende intracellulaire second messengers, zoals IP_3 , DAG/PKC, RhoA/Rho kinase en ROS, betrokken zijn bij de myogene respons. IP_3 kan intracellulaire Ca^{2+} -voorraden vrijzetten wanneer deze gevormd worden. Dit verhoogt dan dus de cytosolische $[Ca^{2+}]$. DAG/PKC, RhoA/Rho kinase en ROS vergroten de calciumsensitisatie.

Diabetische nefropathie en herseninfarct zijn zeer veelvuldig voorkomende pathologieën. Diabetische nefropathie is de meest voorkomende oorzaak van end-stage renal disease (ESRD) in de westerse wereld. Zowel diabetes als nierfalen zijn toenemende mate omschreven als gegeneraliseerde vasculopathische statussen waarbij de myogene respons bij betrokken is. Herseninfarct is de tweede meest frequente oorzaak van overlijden en de meest voorkomende oorzaak van invaliditeit. Bij het overschrijden van de bovenlimiet van de cerebrale perfusiedruk ontstaat er een verhoogde permeabiliteit van de bloed-hersenbarrière met als gevolg een vasculair hersenoedeem. Men spreekt daarbij van het doorbreken van de autoregulatie. Dit zijn zeer grote risicofactoren voor een herseninfarct.

Er zijn diverse medicamenten die mogelijk zouden kunnen ingrijpen in de myogene respons, zoals calciumzouten, vitamine-D, ACE-remmers, osmotische diuretica en speciaal voor diabetische nefropathie nog de orale bloedglucoseverlagende middelen.

1. Inhoudsopgave

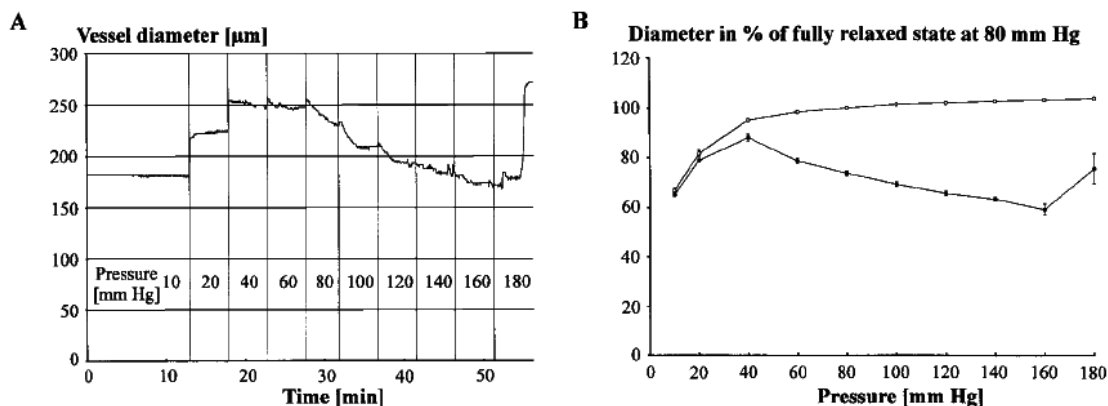
1. Inhoudsopgave	p. 3
2. Inleiding	p. 4, 5
3. De myogene respons.....	p. 6
4. Membraandepolarisatie	p. 7 t/m 12
4.1. Stretch-geactiveerde kanalen.....	p. 7, 8
4.2 Calciumgeactiveerde kaliumkanalen.....	p. 8, 9
4.3 Chloridekanalen.....	p. 9
4.4 Calciumkanalen.....	p. 9, 10
4.5 TRP-kanalen.....	p. 10, 11
4.6 Intracellulaire calciumconcentratie	p. 12
5. Intracellulaire second messengers	p. 13 t/m 15
5.1 IP ₃	p. 13
5.2 Calciumsensitisatie.....	p. 13
5.2.1 DAG/PKC	p. 13, 14
5.2.2 RhoA/Rho kinase.....	p. 14
5.2.3 ROS	p. 14, 15
6. Pathofysiologie van de myogene respons	p. 16 t/m 20
6.1 Diabetische nefropathie	p. 16, 17
6.2 Herseninfarct.....	p. 17, 18
6.3 Mogelijke medicatie	p. 18 t/m 20
7. Conclusie/Discussie	p. 21
8. Literatuurlijst.....	p. 22

2. Inleiding

Het lichaam is constant onderhevig aan grote veranderingen in perfusiedruk. Toch wordt de perfusie van bloed door de organen relatief constant gehouden, ook wel aangeduid als autoregulatie. Hierdoor wordt ervoor gezorgd dat de bloedstroom precies voldoende is om te voldoen aan de metabole behoeften van het desbetreffende orgaan, ondanks variatie in de bloeddruk. Organen die afhankelijk hiervan zijn om adequaat te kunnen functioneren, zijn de nieren en het brein en daarom wordt er bij deze organen ook wel gesproken van autoregulatorische vaatbedden.

Autoregulatie bestaat uit verschillende mechanismes: metabole controle, weefseldruk controle en myogene controle. Bij metabole controle gaat het om metabole factoren, zoals lactaat en CO_2 , die hun werking hebben op het bloedvat om de bloedstroom te reguleren [Girouard et al. 2006]. Weefseldruk controle bestaat uit interactie tussen de interstitiële en de weefseldruk om zo de bloedstroom te reguleren. Tenslotte is de myogene controle ook betrokken bij autoregulatie. Hierbij gaat het om dat de perfusiedruk zijn werking uitoefent op het bloedvat om de bloedstroom te reguleren [Schubert and Mulvany, 1999]. Deze myogene controle wordt ook wel de myogene respons genoemd en heeft een significant aandeel in de autoregulatie van organen, niet alleen in de nieren en hersenen, maar bijvoorbeeld ook in skeletspieren, de coronaire circulatie en in de mesenterische vaten.

In 1902 beschreef Sir William Bayliss de myogene respons al. Zijn beschrijving luidde als volgt: 'When [now] the pressure was raised inside the artery it was seen at first to swell, but immediately, and while the mercury was still kept at its height, a powerful contraction took place, in which the artery appeared to writhe like a worm. [. . .]' [Schubert 2008]. De myogene respons wordt dus gekarakteriseerd door een afname in vaatdiameter, wanneer de transmurale druk stijgt en een toename in vaatdiameter, wanneer de transmurale druk daalt (Figuur 1) [Schubert and Mulvany, 1999].



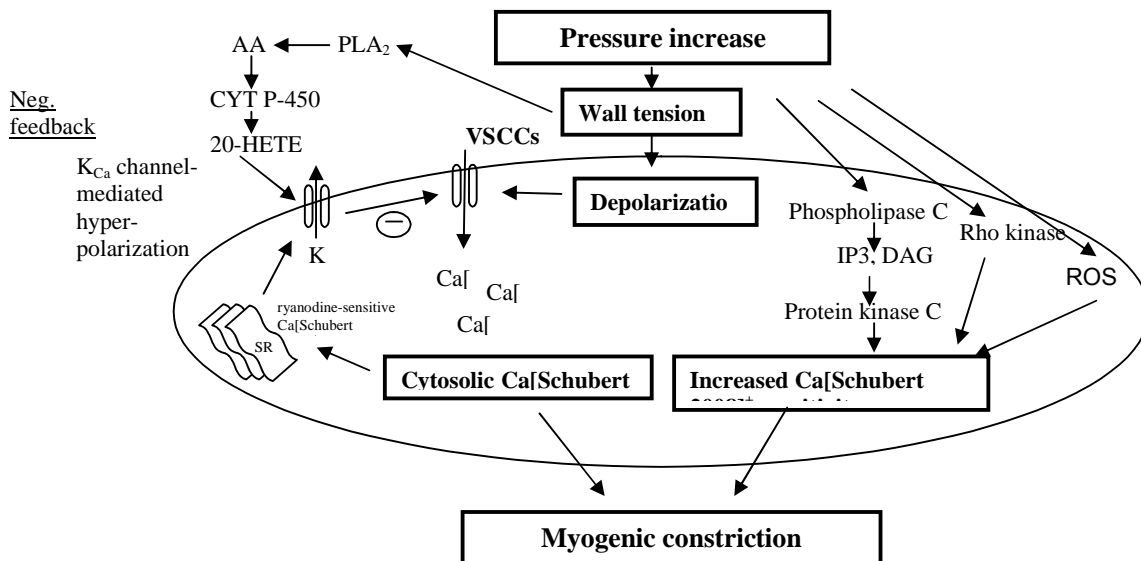
Figuur 1: De myogene respons van een kleine arterie

(A) Voorbeeld van het gedrag van vaatdiameter van een rattenstaarterie op stijging van de transmurale druk van 10 naar 180 mmHg. Bij lage transmurale druk (10-40 mmHg) is de vaatdiameter gestegen door passieve rekking van het vat. Bij een hogere transmurale druk (60-180 mmHg) wordt de actieve myogene respons gezien, wat resulteert in een afname van de vaatdiameter. Bij zeer hoge transmurale druk (180 mmHg) is er een stijging van de vaatdiameter gezien, wat indiceert op het verlies van myogene activiteit door schade aan de vaatwand. (B) Data van het gedrag van vaatdiameter na stijging van de transmurale druk van 10 tot 180 mmHg. De bovenste lijn laat een reactie zien van een vat in een calciumvrije-oplossing en is een voorbeeld van passieve vaatrespons. De onderste lijn laat een reactie zien van een vat in een fysiologische saline-oplossing met 1,6 mM calcium en geldt als voorbeeld voor de actieve myogene respons.

Wanneer er disfunctie in de myogene respons ontstaat, ontwikkelt zich orgaanhypertensie. Dit is met name in de autoregulatorische vaatbedden gevaarlijk. Door het disfunctioneren van de myogene respons, kan door variaties in de perfusiedruk de perfusie van de nieren en de

hersenen niet constant worden gehouden. Hierdoor ontstaat schade, wat kan leiden tot nierfalen of een hersenbloeding. Een stoornis in bijvoorbeeld renale autoregulatie, zoals de onmogelijkheid van arteriën om adequaat constrictie te tonen als reactie op een stijging in de druk, is een cruciale factor in het ontwikkelen van nierschade. De capaciteit om de intraglomerulaire druk te autoreguleren is grotendeels afhankelijk van de mogelijkheid om adequaat een myogene tonus te ontwikkelen. Dit bestaande begrip is recentelijk aangevuld met data vanuit het lab van Klinische Farmacologie vanuit het UMCG. Dat laat zien dat de aanwezigheid van een intacte/hoge myogene tonus in gezonde individuen beschermt tegen geïnduceerde renale schade [Dokkum van 2008]. Echter kan myogene disfunctie ook het gevolg zijn van diverse pathologieën, zoals systemische hypertensie, Diabetes Mellitus, zwangerschap en cardiovasculaire ziekten.

In deze scriptie wordt besproken wat de myogene respons eigenlijk precies is en welke mechanismen, waarvan significant bewijs is dat het de myogene respons beïnvloedt, er bekend zijn. Maar ook zullen nog niet bevestigde hypothesen en potentiële mechanismen besproken worden. Als laatste zal er besproken worden wat er mogelijk qua therapieën gedaan kan worden om myogene disfunctie te verbeteren.



Figuur 2: Myogene activatie van vasculaire gladde spiercellen.

Druk induceert membraandepolarisatie leidend tot opening van spanningssensitieve calciumkanalen (VGCC's) en cytosolische Ca²⁺ stijging. Drukgeïnduceerde activatie van fosfolipase C en andere second messenger systemen (IP₃, DAG, protein kinase C, Rho kinase en ROS) leiden tot een vergrootte Ca²⁺-sensitiviteit van het contractiele apparaat. Zowel toegenomen Ca²⁺-concentratie, als Ca²⁺-sensitiviteit induceren gladde spiercelcontractie. Contractie wordt tegengewerkt door "Ca²⁺ sparks" leidend tot K_{Ca}-kanaal gemedieerde hyperpolarisatie en dilatatie. SR, sarcoplasmatisch reticulum.

3. De myogene respons

Een myogene respons is in vele soorten bloedvaten aangetroffen, zowel in venen als arteriën. In venen is de myogene respons erg zwak en tot nu toe nog slecht onderzocht. Dat is de reden waarom de bespreking van de mechanismes alleen zal gaan over de myogene respons in arteriën. Veel onderzoeksgroepen hebben studies gedaan in met name de kleine arteriën en arteriolen, aangezien deze een belangrijke rol spelen bij de regulatie van de bloeddruk en bloedstroom naar verschillende organen.

De kracht van de myogene respons hangt af van de diameter van de kleine arteriën en arteriolen. De grotere en heel kleine vaten hebben een relatief zwakke myogene respons, terwijl de vaten met een middelgrote diameter de grootste myogene activiteit laten zien. De diameter van een dergelijke middelgrote arteriool is $32.3 \pm 1.1 \mu\text{m}$ in stabiele actieve situatie met een druk van respectievelijk 100, 80 en 50 mmHg [Sun 1994]. Dit is aangetoond in diverse vasculaire vaatbedden, als in mesenterische arteriën en skeletspierarteriën in ratten, renale arteriën en arteriolen in konijnen, coronaire arteriën en arteriolen in varkens, kleine coronaire arteriën en kleine piaale arteriën in mensen en tenslotte ook nog in arteriolen uit de hamsterwang [Schubert and Mulvany, 1999].

Verder blijkt dat niet alleen de diameter van het bloedvat bepalend is voor hoe sterk de myogene respons is, dit varieert ook in verschillende vasculaire vaatbedden. Een voorbeeld hiervan is dat er in mesenterische arteriën een relatief zwakke myogene respons te vinden is, in vergelijking tot een veel sterkere respons in even grote cerebrale en skeletspiervaten.

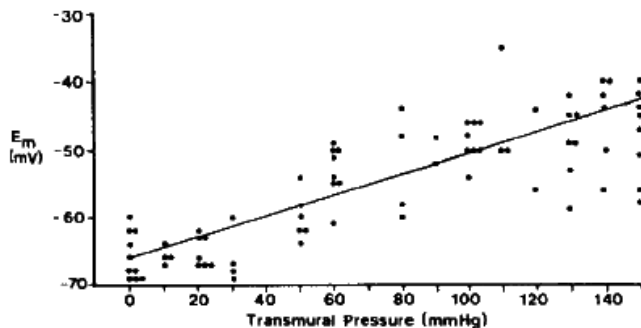
Er wordt gedacht dat een drukgeïnduceerde verandering in vaatwandspanning de stimulus is voor een myogene respons en niet de druk zelf of een drukgeïnduceerde verandering in cellengte. Daarnaast wordt de vaatwanddruk verminderd tijdens de myogene respons door een negatief feedbackmechanisme, die ervoor zorgt dat de myogene vaatconstrictie beperkt wordt [Schubert and Mulvany, 1999].

De vaatwand zorgt voor een omgeving waarin de gladde spiercellen sterk in interactie zijn met twee andere type cellen: het endotheel en cellen van zenuwuiteinden. De onmiddellijke nabijheid van deze twee typen cellen zorgt ervoor dat cellen de myogene respons via paracriene acties op de gladde spiercellen zouden kunnen moduleren. Echter, in het algemeen blijkt dat endotheliale cellen en de zenuwcellen maar een minimale uitwerking hebben op de myogene respons en dat deze dus vrijwel alleen wordt bewerkstelligd door de gladde spiercellen [Schubert et al. 2008].

De myogene respons zorgt er dus voor dat de gladde spiercellen van arteriolen reageren met vasoconstrictie op een stijging van intraluminale druk en met vasodilatie wanneer deze druk daalt. Deze vasoconstrictie zorgt er ook voor dat er een basale tonus ontstaat, die ervoor zorgt dat de arteriolen zich goed kunnen aanpassen in diameter in respons op neurohumorale stimuli [Hill et al. 2001]. Naast de term basale tonus wordt in dezelfde context ook wel het begrip myogene tonus in gebuikt. De myogene tonus is een voortdurend en spontaan niveau van myogene constrictie die de normale bloeddruk in rusttoestand bepaald [Murphy et al. 2002].

4. Membraandepolarisatie

Het is bekend dat een toename in transmurale druk zorgt voor membraandepolarisatie van gladde spiercellen (Figuur 3). Dit is aangetoond in diverse vaten, zoals cerebrale arteriën van katten, ratten en konijnen, in kleine renale arteriën en ileum arteriën van honden en mesenterische arteriën van ratten. De drukgeïnduceerde membraandepolarisatie gaat altijd tezamen met contractie van het bloedvat, zoals de myogene respons [Schubert and Mulvany, 1999].



Figuur 3: Afhankelijkheid van het membraanpotentiaal door transmurale druk in middel cerebrale arteriën van katten in een bad van fysiologische saline met 2.5 mM calcium [Schubert and Mulvany, 1999]
Elk punt laat het membraanpotentiaal zien verkregen van een enkele gladde spiercel. De lijn resulteert uit een lineaire regressieanalyse ($r=0.79$, $r.c.=0.145$).

In dit hoofdstuk worden verschillende kanalen besproken die in verband worden gebracht met myogene respons en membraandepolarisatie. De kanalen die besproken zullen worden, zijn: stretch-geactiveerde kanalen, calciumgeactiveerde kaliumkanalen, chloridekanalen, calciumkanalen en TRP-kanalen.

4.1 Stretch geactiveerde kanalen

De aanwezigheid van kanalen gevoelig voor mechanische stimuli is in vele celtypen aangetoond, inclusief vasculaire gladde spiercellen. In het algemeen wordt gedacht dat stretch-activatie van deze kanalen bijdraagt aan membraandepolarisatie gevolgd door het openen van voltage-gated calcium channels (VGCC's). Consistent met deze gedachte is dat ondanks inhibitie van VGCC's, de stretch-geïnduceerde depolarisatie van vasculair gladde spiercellen niet wordt geïnhibeed [Hill et al. 2001].

De hypothese is dat myogene respons wordt veroorzaakt door activatie van stretch-geactiveerde cation kanalen, wat resulteert in een toename van de inwaartse stroom de gladde spiercel in. Stretch-geactiveerde cation kanalen passen hun activiteit in respons aan, wanneer er een verandering van de stretch in het membraan is.

Wu and Davis [Hill et al. 2001] hebben laten zien dat stretch van een enkele gladde spiercel ook een uitwaartse stroom van K^+ activeert. Deze stroom werd geïnhibeed door verwijdering van extracellulaire Ca^{2+} en door toevoeging van iberiotoxine (K^+ -kanaalblokker). Hieruit werd geconcludeerd dat de stroom gedragen werd door een K_{Ca} -kanaal. Dopico *et al.* [Hill et al. 2001] hebben eerder gerapporteerd dat K_{Ca} -kanalen in mesenterische arteriële gladde spiercellen direct geactiveerd kunnen worden door stretch. De bevinding dat iberiotoxine de stretch-geïnduceerde depolarisatie verbetert, suggereert dat de K^+ -stroom de stretch-geïnduceerde veranderingen in het membraanpotentiaal en myogene constrictie

verminderd. Dit is weer consistent met observaties in intacte arteriolen waar iberiotoxine het niveau van de myogene tonus lijkt te verbeteren [Hill 2001]. De K_{Ca} -kanalen zullen later in dit hoofdstuk nog uitgebreider besproken worden.

Naast directe activatie van ionkanalen door stretch, wordt er gedacht dat er door mechanische perturbatie van celmembranen factoren losgelaten worden die de activiteit van dergelijke kanalen moduleren. Vetzuren vrijgekomen door celstretch worden gedacht de kanaalafsluiting te moduleren. Dit concept van mechanische stimulus-geïnduceerde productie van second messengers, die secundair de ionkanalen moduleren, zoals bijvoorbeeld activatie van cationkanalen, kunnen worden gerangschikt onder een andere generatie moleculen zoals arachidonzuur metabolieten, diacylglycerol en cyclische nucleotides. Diacylglycerol zal later in de tekst nog besproken worden.

Verskillende studies laten echter zien dat het stretchen van vasculaire gladde spiercellen niet voldoende is om myogene activiteit te induceren. Stretch laat geen invloed zien op de activiteit van calcium- en calciumgeactiveerde kaliumkanalen, maar wel in activatie van niet-selectieve cationkanalen waardoor Na^+ , K^+ en Ca^{2+} passeren, die membraandepolarisatie van deze cellen produceren [Schubert and Mulvany, 1999].

Tenslotte laten data van experimenten op intacte vaatpreparaten zien dat Na^+ ionen niet nodig zijn voor de myogene respons. De myogene respons in skeletspier en mesenterische kleine arteriën in ratten en de myogene tonus in cerebrale kleine arteriën in ratten wordt behouden in laag-natrium extracellulaire oplossing, een bevinding die in scherp contrast staat met een rol van Na^+ als hoofd ladingdrager door de stretch-geactiveerde cation kanalen [Schubert and Mulvany, 1999].

Ondanks dat de ontdekking van stretch-geactiveerde cation kanalen in geïsoleerde gladde spiercellen veelbelovend leek als grote spil in stretch-geactiveerde cation kanalen in de myogene respons, is er nog steeds onvoldoende functioneel bewijs voor een definitieve conclusie.

4.2 Calciumgeactiveerde kaliumkanalen

Een tweede hypothese wijst er op dat membraandepolarisatie, die gepaard gaat met de myogene respons, leidt tot een calciumkanaal-gemedieerde toename van de intracellulaire calciumconcentratie met daarnaast een verhoging van de frequentie van calcium sparks, die gegenereerd worden vanuit het sarcoplasmatisch reticulum (SR). Deze calcium sparks activeren de calciumgeactiveerde kaliumkanalen (K_{Ca} -kanalen), die op hun beurt weer zorgen voor hyperpolarisatie van de celmembraan en het sluiten van de calciumkanalen [Schubert and Mulvany, 1999]. Dit mechanisme functioneert als een negatief feedbackmechanisme om de calciuminflux te beperken. Door de celmembraan te hyperpolariseren zorgen de calciumgeactiveerde kaliumkanalen ervoor dat de celmembraan niet overgeactiveerd raakt en dus sensitief blijft voor calcium.

Zoals gezegd, K_{Ca} -kanalen worden geactiveerd door calcium sparks. Calcium sparks zijn zeer lokale Ca^{2+} stijgingen vanuit het SR, die veroorzaakt worden door het opengaan van clusters van ryanodine receptoren. Deze calcium sparks zijn o.a. gezien in gladde spiercellen in cerebrale arteriën uit ratten [Hill et al. 2001]. In tegenstelling tot globale Ca^{2+} -stijging in het cytosol, wat leidt tot vasoconstrictie, zorgen deze lokale calcium sparks juist voor vasorelaxatie door middel van activatie van de K_{Ca} -kanalen. Inhibitie van deze calcium sparks of K_{Ca} -kanalen leidt tot membraandepolarisatie, activatie van VGCC's en aansluitend tot vasoconstrictie en dus myogene activiteit.

Brenner *et al.* heeft laten zien dat targeted deletie van een gen voor de β -subunit van K_{Ca} -kanalen leidt tot een daling van de sensitiviteit van Ca^{2+} in K_{Ca} -kanalen in arteriële gladde spiercellen. Zo'n daling van de sensitiviteit zorgt voor een reductie in het functionele koppelen van Ca^{2+} sparks met de K_{Ca} -kanalen en daardoor stijgen de arteriële tonus en de bloeddruk [Hill et al. 2001].

Er zijn ook endogene mediators die invloed hebben op de K_{Ca} -kanalen en op die wijze de myogene respons moduleren. Een voorbeeld hiervan is het cytochroom P-450/20-HETE

(zie figuur 2). In diverse arteriële preparaten is aangetoond dat wanneer je P-450 inhibeert, de myogene activiteit geremd wordt. Er is echter geen direct bewijs van verbanden in activiteit tussen het cytochrom P-450, K_{Ca} -kanalen en de myogene respons. Daarnaast behoren P-450 en 20-HETE tot mediators die vanuit het endotheel de myogene respons beïnvloeden en dus zullen deze verder niet meer besproken worden.

Als laatste is er recentelijk nog een andere modulator van K_{Ca} -kanaalactiviteit gevonden. Dit is caveolin-1 en is een groot structureel eiwit wat de caveolae stabiliseert (een micro-omgeving wat voor vele signaalpathways belangrijk is). Genetische deletie van het caveolin-1-gen zorgt ervoor dat de activiteit van K_{Ca} toeneemt waardoor de membraanpotential negatiever wordt [Hill et al. 2001] en het moeilijker wordt voor de celmembraan om te depolariseren waardoor de myogene respons geremd wordt. Of caveolin-1 de K_{Ca} -functie moduleert door stabilisatie van de micro-omgeving of dat caveolin-1 en K_{Ca} direct in interactie met elkaar zijn, moet nog verder onderzocht worden.

4.3 Chloridekanalen

Een derde hypothese stelt dat chloridekanalen ook zouden kunnen bijdragen aan de myogene respons. Deze hypothese stelt dat de elektrochemische gradiënt van Cl_2 in vasculaire gladde spiercellen als resultaat Cl_2 -kanalen opent en leidt tot een potentiële efflux van Cl_2 , vervolgens tot depolarisatie en vasoconstrictie. Daarom wordt er gedacht dat chloridekanalen betrokken zouden kunnen zijn bij de arteriële myogene tonus. Daarnaast zijn er bevindingen dat volumegereguleerde Cl_2 -kanalen tot expressie komen in vasculaire gladde spiercellen en dit suggereert een mogelijke rol voor deze kanalen in het reguleren van de myogene tonus [Hill et al. 2001].

Welsh *et al.* hebben de aanwezigheid van een zwellingsgeactiveerde stroom, gevoelig voor Cl_2 -kanaalblockers, bevestigd. Voorbeelden van Cl_2 -kanaalblockers zijn 4,4'-diisothiocyano-stilbene-2,2'-disulfonzuur (DIDS) en het cytostaticum tamoxifen. De zwellingsgeactiveerde in- en efflux van de cel veranderde niet wanneer de Cl_2 -concentratie verlaagd werd in de oplossing waarin de cel zich bevond. Het potentiaal veranderde echter wel wanneer Na^+ -concentratie verlaagd werd. Daarnaast, blokkeerde Gd31, wat normaliter niet de zwellingsgeactiveerde Cl_2 -kanaalstroom blokkeert in vasculair gladde spiercellen, wel de stroom, suggererend dat het om een cation-selectieve stroom gaat [Hill et al. 2001].

Er kan dus geconcludeerd worden dat er nog veel onduidelijk is over de functie van Cl_2 -kanalen in de myogene tonus en respons en dat er nog meer onderzoek gedaan moet worden naar dit onderwerp.

4.4 Calciumkanalen

De aanwezigheid van een relatie tussen intraluminale druk en gladde spiercel membraanpotential is als eerste getoond in gecannuleerde arteriën door Harder [Harder 1984]. Met het gebruik van middelste cerebrale arteriën van katten liet hij zien dat wanneer de druk stijgt, het membraanpotential daalt naar minder negatieve waarden. Dit leidt sneller tot een depolarisatie en depolarisatie leidt tot Ca^{2+} -entry via L-type VGCC's [Hill et al. 2001]. Consistent met de rol van drukgeïnduceerde depolarisatie, leiden blockers van de L-type VGCC's, zoals nifedipine, verapamil en nicardipine, tot sterk gereduceerde myogene respons.

Membrandepolarisatie, wat vooraf gaat aan de myogene respons, kan dus veroorzaakt worden door activatie van calciumkanalen. Dit resulteert dan in een toename van de inwaartse stroom de gladde spiercellen in. Deze hypothese wordt gesteund door patch-clamp experimenten in kleine cerebrale arteriën uit ratten, die laten zien dat spanningsafhankelijke calciumstromen gestimuleerd kunnen worden door membraanstretch. Desondanks werd in cerebrale arteriën van konijnen en posterieure cerebrale arteriën van

ratten gedemonstreerd dat, na complete blokkade van de calciumkanalen, een toename van de transmurale druk resulteert in een onveranderde membraandepolarisatie, maar niet in een verandering van de bijbehorende myogene respons. Deze data suggereren in eerste instantie dat een calciuminflux door calciumkanalen niet verantwoordelijk is voor de membraandepolarisatie die gepaard gaat met de myogene respons. Verder laten deze data zien dat een calciuminflux door calciumkanalen essentieel is voor de myogene respons, waarbij de membraandepolarisatie zelf niet *per se* nodig is voor de myogene respons. Hierbij kan de conclusie getrokken worden dat calciumkanalen niet een belangrijke rol spelen in de membraandepolarisatie die gepaard gaat met de myogene respons [Schubert and Mulvany, 1999].

Recente studies hebben laten zien dat calciumkanalen gemoduleerd kunnen worden door integrines. Het binden van $\alpha_v\beta_3$ -integrine inhibeert de dihydropyridine-gevoelige VGCC's en daardoor de myogene activiteit. Daarentegen vergroot de binding van $\alpha_5\beta_1$ -integrine en $\alpha_4\beta_1$ -integrine de inwaartse Ca^{2+} -stroom en stimuleert hierdoor de myogene respons [Hill et al. 2001].

Als laatste speelt ook tyrosine fosforylatie een rol in myogene activiteit via L-type VGCC's. Tyrosine kinase-activiteit is relatief hoog in vasculair gladde spiercellen, vergeleken met andere celtypes en daardoor ook als een mogelijke modulator van de myogene respons gezien. Tyrosine fosforylatie van L-type VGCC's in gladde spiercellen van arteriën uit het oor van konijnen vergrootte de stroom die door deze kanalen gaat. Integrines en focale adhesie complexen, mogelijke kandidaten voor het functioneren als tensiesensor in myogene activiteit zoals hierboven genoemd, zijn geassocieerd met een tal van tyrosine kinases, zoals cSrc en focal adhesion kinase (FAK), samen met eiwitten die geactiveerd worden door tyrosine fosforylatie [Murphy et al. 2002]. Op cSrc en FAK zal verder niet ingegaan worden, aangezien deze stoffen op zichzelf geen essentieel aandeel vormen in de werking van calciumkanalen waar het in dit hoofdstuk om gaat.

Vanuit een teleologisch (theoretisch) standpunt is VGCC-gemedieerde Ca^{2+} -influx, welke zich snel en proportioneel aanpast aan veranderingen in druk via het membraanpotentiaal, een ideaal mechanisme om de myogene respons vanuit beide richtingen te verklaren. Er is een kleine twijfel dat myogene respons sterk afhankelijk is van VGCC's. Concluderend dat VGCC's misschien niet de enige kanaal-gemedieerde drukgeïnduceerde Ca^{2+} -influx is [Schubert et al. 2008]. Hier zal nog verder onderzoek naar gedaan moeten worden.

4.5 TRP-kanalen

Als laatste van de kanalen zal de TRP-kanalen worden besproken. Dit is een relatief recentelijk onderzocht mechanisme in de myogene respons-pathway. TRP-kanalen bestaan uit zes transmembrane segmenten en een enkel poriedomein, waarvan gedacht wordt dat deze gelokaliseerd is tussen segment 5 en 6. Zowel amino- als carboxy terminale domeinen zijn gericht naar het cytosol. Er zijn 28 genen in zoogdieren gevonden die voor TRP-kanalen coderen. Deze kunnen weer onderverdeeld worden in zes subfamilies, gebaseerd op homologie: de canonische TRPC (zeven leden), de melastatine TRPM (acht leden), de vanilloïde TRPV (zes leden) en de meer op afstand gerelateerde mucolipine TRPML (drie leden), de polycystine TRPP (drie leden) en als laatste ankyrine TRPA [Sharif-Naeini et al. 2008].

De exacte aard van de membraankanalen die capacitatief Ca^{2+} -influx dragen, zijn onzeker, wat wel bekend is dat TRP-kanalen direct geactiveerd kunnen worden door mechanische stimuli. De constituenta eiwitten worden gedacht van de TRP-genefamilie afkomstig te zijn. Op dit moment zijn er zeven TRP-eiwitten beschreven en daarvan wordt gedacht dat ze homo- en heteromultimerische kanaalstructuren vormen. De verschillende combinaties van subunits kunnen ten grondslag liggen aan verschillen in regulatoire capaciteit [Sharif-Naeini et al. 2008].

Er is slechts voor drie genen aanwijzingen dat ze te maken hebben met de myogene respons. Dit zijn respectievelijk de genen TRPC6, TRPM4 en TRPV2. Recentelijk hebben

antisense oligonucleotide technieken voor het eerst functionele bewijs geleverd dat stretch-geactiveerde kanalen, specifiek TRPC6 en TRPM4, betrokken zijn bij de myogene respons [Schubert et al. 2008].

TRPC6, een gen uit de canonische-TRP-subfamilie. De expressie van TRPC6 is met name hoog in vasculaire gladde spiercellen. Het diacylglycerol-sensitieve canonische TRPC6-kanaal heeft zowel een inwaarts als uitwaarts gerichte stroom, met een relatief lage selectiviteit voor Ca^{2+} over Na^+ . Het is sensitief voor intracellulair Ca^{2+} en wordt geactiveerd door diacylglycerol (DAG). Anti-sense oligonucleotides van TRPC6 verlagen de TRPC6-eiwitexpressie en verminderen cerebrale arterie gladde spierceldepolarisatie en constrictie, veroorzaakt door een verhoogde intraluminale druk. Welsh en Brayden [Sharif-Naeini et al. 2008] rapporteerden een verlaagd niveau van de stabiele myogene tonus in cerebrale vaten, waarin een anti-sense benadering was gebruikt om de expressie van TRPC6 te reduceren. Interessant was dat in COS-cellen de verminkte vorm van TRPC6 de non-selectieve cationstroom verlaagde, gelijkend aan de capacitatieve Ca^{2+} -influx in de gladde spiercel. Verrassend was dat TRPC6 $-/-$ muizen een verhoogde bloeddruk lieten zien met een toegenomen agonist-geïnduceerde contractiliteit van geïsoleerde aortaringen en een verhoogde myogene contractie van de cerebrale arteriën [Sharif-Naeini et al. 2008]. TRPC6 wordt niet per definitie altijd geopend door membraanstretch, tenminste niet als homomultimeer. Homomultimeer betekent dat het kanaal opgebouwd is uit één soort subunit. Mechanische activatie kan ook betrokken zijn bij interactie van andere kanaalsubunits en kan afwezig zijn in COS-cellen. Ook kan het indirect afhankelijk zijn van bijvoorbeeld de G-eiwit/fosfolipase C/DAG-pathway [Sharif-Naeini et al. 2008].

De expressie van TRPM4 is gelijk aan die van TRPC6. TRPM4 is een gen uit de melastatine subfamilie. Naast TRPC6 lijkt TRPM4 ook nodig voor myogene constrictie van cerebrale arteriën. Aangezien TRPM4 door intracellulair calcium wordt geactiveerd, kan zijn activering op verhoogde intraluminale druk uit calciuminflux door TRPC6 voortvloeien. Tenslotte, proteïne kinase C (PKC) activatie maakt TRPM4 sensitiever voor intracellulair calcium. PKC-afhankelijke activatie van TRPM4 kan dus een belangrijke mediator zijn van de vasculaire myogene tonus [Sharif-Naeini et al. 2008]. PKC zal later nog verder besproken worden.

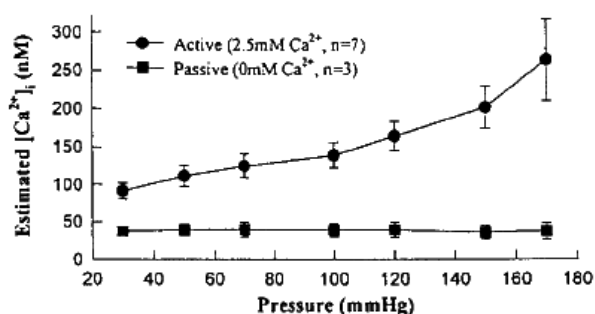
Ondanks dat knockout-strategieën voor functioneel bewijs hebben gezorgd dat verschillende TRP-kanaalsubunits betrokken kunnen zijn bij de arteriële myogene respons, zoals TRPC6 en TRPM4, is het waarschijnlijk dat activatie van deze kanalen indirect is en mogelijk gemedieerd worden door second messengers als DAG, fosforylatie en/of intracellulair calcium.

Als laatste is er dan nog TRPV2 en dit is een gen uit de vanilloïde TRP-subfamilie. Het is een cationkanaal wat door warmte geactiveerd kan worden (drempelwaarde $>52^{\circ}\text{C}$). TRPV2 komt tot expressie in vasculair glad spierweefsel van o.a. de aorta, mesenterische en cerebraal basilaire vaten. Celzwellen veroorzaakt door een hypotone shock activeert een niet-selectieve cationkanaal-stroom en verhoogt de intracellulaire calciumconcentratie in bijvoorbeeld nieuw geïsoleerde aortacellen van muizen. Verder, knockdown van TRPV2 met anti-sense oligonucleotide onderdrukt zwellingsgeactiveerde stromen. In CHO-cellen (Chinese hamster ovaria K1-cellen) getransfecteerd met TRPV2 cDNA, induceert membraanstretch in celgebonden patch-configuratie het openen van kanalen. Daarnaast zorgt stretch van cellen die TRPV2 tot expressie brengen en op een siliconenmembraan zijn bevestigd voor een significante stijging van het intracellulaire calcium. Deze resultaten suggereren dat TRPV2 kan functioneren als een stretchsensor in vasculair gladspierweefsel. Echter is het mechanisme van activatie van TRPV2 nog steeds onduidelijk.

Er zijn significante aanwijzingen dat TRP-kanalen betrokken zijn bij de myogene respons. Het betreft echter nog wel veel niet erg duidelijk gedefinieerde resultaten en er zal nog meer onderzoek gedaan moeten worden naar specifieke pathways en mechanismes. Verder zijn er momenteel maar 7 TRP-eiwitten beschreven, terwijl er 28 genen zijn. Hier zal ook verder onderzoek noodzakelijk zijn, om te kijken of er eventueel meer TRP-eiwitten bestaan die de myogene respons kunnen moduleren.

4.6 Intracellulaire calciumconcentratie

Het is vastgesteld dat een toename in de transmurale druk een toename van de intracellulaire Ca^{2+} -concentratie in gladde spiercellen produceert (Figuur 4). Dit is vastgesteld in diverse arteriën uit ratten, zoals posterieure cerebrale en afferente renale arteriën [Schubert and Mulvany, 1999].



Figuur 4: Afhangelijkheid van intracellulaire calciumconcentratie op transmurale druk [Schubert and Mulvany, 1999]. De onderste lijn laat data zien van een passief vat in een calciumvrije oplossing. De bovenste lijn laat data zien van een actief vat in fysiologische saline-oplossing met 2.5 mM calcium. (n=het aantal gebruikte vaten).

Myogene constrictie is sterk afhankelijk van intracellulaire $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in de gladde spier. Toename in druk over de vaatwand gaat samen met een toename van cytosolische $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en verwijdering van extracellulair Ca^{2+} stopt compleet de myogene activiteit, suggererend dat Ca^{2+} entry cellen in vanuit de extracellulaire ruimte is een hoofdfactor in myogene constrictie [Murphy et al. 2002].

De rol van het vrijzetten van Ca^{2+} uit intracellulaire opslag, met name uit het sarcoplasmatisch reticulum, in arteriëel glad spierweefsel blijft met name de mechanotransductie slecht gedefinieerd. Op basis van functionele studies hebben Low *et al.* geconcludeerd dat de rol van het SR (gerelateerd tot de extracellulaire Ca^{2+} bevoorrading) in contractie afneemt wanneer de arteriële diameter afneemt. Studies die een rol voor intracellulair Ca^{2+} vrijzetting in myogene constrictie bevestigen, laten zien dat na een drukverhoging in gecannuleerde kleine renale arteriën er een accumulatie is van inositol fosfaatsoorten. Gelijk hieraan kan een toegenomen druk in kanaalarteriën en stretch van gekweekte gladde spiercellen leiden tot inositol trifosfaat (IP_3) productie. Deze data worden ook bevestigd door enkele gladde spiercelstudies van Davis *et al.*, waarin stretch-geïnduceerde vrijzetting van Ca^{2+} werd aangetoond [Hill et al. 2001]. IP_3 zal verderop nog verder besproken worden.

Toename in intracellulaire calciumconcentratie brengt de gladde spiercel in contractie door binding van calmoduline en activatie van de myosine light chain kinase (MLCK), met vervolgens fosforylatie van de 20 kDa light chain van myosine (LC20). Bewijs voor een dergelijke pathway in myogene constrictie is gevonden in een cremaster arteriole van ratten, waar drukafhankelijke stijgingen in fosforylatie van LC20 werden gedemonstreerd door het gebruik van gelelectroforese. De tijdlijn van LC20 ontstond binnen 10s wanneer de druk verhoogd was en bleef minimaal 5 minuten aanwezig. Verder laten de MLCK –inhibitors ML-7 en ML-9 een geïnhibeerde myogene contractie zien [Murphy et al. 2002].

Er is dus (significant) bewijs dat de intracellulaire $[\text{Ca}^{2+}]_i$ een, zo niet de belangrijkste, rol speelt in de myogene respons. Wat het mechanisme is in dit mechanotransductiesysteem is nog niet geheel duidelijk en hier zal dan ook meer onderzoek naar gedaan moeten worden.

5. Intracellulaire second messengers

Er is steeds meer bewijs dat verschillende intracellulaire second messengers betrokken zijn bij de myogene respons. In de komende subhoofdstukken worden er een aantal besproken waarvan aanwijzingen zijn dat ze betrokken zijn bij de myogene respons. De second messengers die behandeld worden zijn inositol trifosfaat (IP₃), diacylglycerol (DAG)/proteïne kinase C (PKC), RhoA/Rho kinase en tot slot reactive oxygen species (ROS).

5.1 IP₃

Studies die een rol bevestigen voor intracellulaire Ca²⁺-vrijzetting in de myogene respons, bevatten de observatie dat, na een drukstijging in gecannuleerde kleine renale arteriën, er een accumulatie plaats vindt van inositol fosfaatsoorten. Daarnaast zorgt toegenomen druk in kanaalarteriën en stretch van gekweekte gladde spiercellen voor een inositol trifosfaat (IP₃) productie. Deze data worden ook bevestigd door studie van Davis *et al.* in enkele gladde spiercelstudies waarin een stretch-geïnduceerde vrijlating van Ca²⁺ werd gezien [Hill *et al.* 2001].

IP₃ is een second messenger die intracellulaire Ca²⁺-voorraden kan loslaten wanneer het gevormd wordt. Een studie in renale en kanaalarteriën van ratten laat zien dat wanneer IP₃ gevormd wordt, de wandspanning stijgt. Echter is er nog geen vaststaand bewijs dat er een rol is voor druk-geïnduceerde intracellulaire Ca²⁺-vrijzetting door IP₃ in de myogene respons. Dergelijke studies zijn ook erg moeilijk uit te voeren doordat door het verwijderen van extracellulair Ca²⁺ de hele myogene tonus verdwijnt [Murphy 2002].

Dus ondanks dat er aanwijzingen zijn dat IP₃ betrokken is bij de stretch-geïnduceerde intracellulaire vrijlating van Ca²⁺ vanuit diverse studies, zal er meer onderzoek nodig zijn om dit significant vast te stellen. Echter om meer onderzoek te kunnen doen, zullen er nieuwe technieken gevonden moeten worden die ervoor zorgen dat extracellulair Ca²⁺ buiten beschouwing gelaten wordt en dat is tot op het moment van dit schrijven nog niet gelukt.

5.2 Calciumsensitisatie

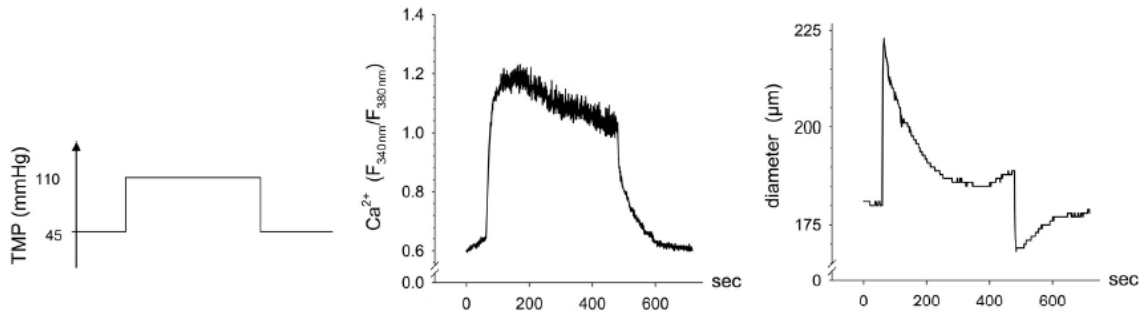
Afgelopen 10-15 jaar hebben studies veel bewijsen getoond dat, naast directe Ca²⁺/calmoduline myosine light chain kinase-gemedieerde activatie van actinomyosine interactie, er verschillende andere regulatoire mechanismes zijn die participeren in de controle van gladde spiercontractie. Een van die mechanismes is Ca²⁺-sensitisatie.

Calciumsensitisatie is het tijdsverschil tussen onmiddellijke stijging in calcium en volle vasoconstrictie laat een continue stijging in calciumsensitiviteit zien (Figuur 5). De modulatie van Ca²⁺-sensitisatie is een belangrijk concept en is recentelijk door de Somlyos uitgebreid gereviewed. Hun definitie van het fenomeen stelt dat Ca²⁺-sensitisatie van gladde spiercellen en nonmusculaire myosin II een ratio van activiteiten reflecteert van MLCK tot MLCP [Schubert *et al.* 2008].

Potentiële regulatiepathways die ik ga bespreken zijn diacylglycerol/proteïne kinase c (DAG/PKC), RhoA/Rho kinase en reactive oxygen species (ROS).

5.2.1 DAG/PKC

Diacylglycerol (DAG) is een second messenger lipide die hydrofobe eigenschappen heeft en daardoor binnen de plasmamembraan blijft in tegenstelling tot IP₃, wat het cytosol in diffundeert. DAG is een endogene activator van proteïne kinase c (PKC). Echter is er weinig literatuur te vinden over DAG in de functie als second messenger en op welke wijze het PKC activeert. Dus zal ik verder ingaan op de functie van PKC.



Figuur 5: Drukgeïnduceerde veranderingen in gladde spier Ca^{2+} en vasculaire diameter in weerstandsarterie van hamsters. [Schubert 2008]

In arteriën geïsoleerd van de musculus gracilis uit hamsters (4^e generatie zijtak van de femorale arterie, 80µm diameter in rust), een stapsgewijze verandering in transmurale druk van 45 mmHg naar 110 mmHg (grafiek links) induceert een snelle toename in gladde spier intracellulaire calcium (middelste grafiek), gebruikt om Ca^{2+} -sensitiviteit te bepalen met Fura2 kleuring (fluorescentie ratio $F_{340\text{nm}}/F_{380\text{nm}}$). De rechtse grafiek laat de geassocieerde verandering in diameter is, wat een typische bifasische repons laat zien. De passieve omvang van het vat dat direct volgt na de stapsgewijze groei qua druk, wordt teruggedrongen door een continue, actieve vasoconstrictie.

Protein kinase C is zoals de naam het al zegt een eiwitkinase. De eerste aanwijzing voor een rol van PKC in de myogene respons is verkregen uit femorale kleine arteriën uit ratten, waar PKC-inhibitoren de myogene respons reduceerde tot drukveranderingen tussen 40 en 100 mmHg. Daarnaast was er in een andere studie laten zien dat de specifieke PKC-inhibitor calphostin C de myogene respons reduceerde tussen 20 en 100 mmHg in humane coronaire kleine arteriën. Ook is laten zien dat phorbol esters, analoge structuren van DAG en evenals DAG activators van PKC, in hoge concentraties alleen vasoconstrictie teweeg brachten, maar niet de myogene respons faciliteerden. Echter in lagere concentraties, waardoor de basale tonus niet veranderde, induceerden phorbol esters wel een myogene respons in mesenterische arteriën van ratten tussen 40 en 100 mmHg en in humane coronaire kleine arteriën tussen 40 en 100 mmHg en dat terwijl geen van beide voor de behandeling een myogene respons liet zien [Schubert and Mulvany, 1999].

De translocatie van PKC- α , de calciumafhankelijke isoform van PKC en een marker van PKC-activatie, naar het plasmamembraan is gedemonstreerd in respons op toegenomen transmurale druk. Met het oog op de geobserveerde translocatie van PKC- α zijn de temporale kinetika van de translocatie gevolgd na een stijging van de druk, en zijn deze bevindingen consistent met zijn verwachte betrokkenheid in de myogene respons [Hill et al. 2001].

Onderzoeken naar de betrokkenheid van PKC in de myogene respons wordt gelimiteerd door verschillende factoren, hierbij gaat het om (1) het bestaan van verschillende functionele PKC-isoformen, (2) slechte specificiteit van de chemische inhibitoren en (3) de niet uniforme expressie en distributie van PKC door de gehele vasculaire boom. Verder, er vanuit gaande dat PKC een prominente rol speelt in het behouden van Ca^{2+} -sensitiviteit onder rustcondities, kan zijn inhibitie een bloedvat onresponsief maken voor pro-constrictieve stimuli. Dit heeft als consequentie dat PKC-inhibitie kan uitmonden in een totale ophef van de myogene vasoconstrictie zonder directe betrokkenheid van drukgeïnduceerde signalen [Schubert et al. 2008].

5.2.2 Rho/Rho kinase

Recente bewijzen van de Laboratories of GA Meininger and RC Webb suggereren dat calciumsensitisatie kan ontstaan door activatie van Rho kinase. Bewijs van beide van deze laboratoria hebben geïndiceerd dat Rho kinase-inhibitor Y-27632 de effecten van microtubule disruptie inhiberen op de contractiele functie van vasculair gladde spiercellen. Het is significant dat Rho kinase gelinkt is naar focale contacten.

In mesenterische arterien uit ratten en gracilis arteriën uit hamsters is gebleken dat Rho kinase-inhibitie de myogene vasoconstrictie opheft, zonder effect te hebben op de drukgeïnduceerde stijging van Ca^{2+} , terwijl in staarteriën en cerebrale kleine arteriën ook uit ratten is gebleken dat de myogene constrictie verminderd wordt met daarnaast een vergroting in drukgeïnduceerde Ca^{2+} -stijging [Davis et al. 2001].

Ondanks dat het is laten zien dat de Rhoa/Rho kinase-pathway betrokken is in G-eiwitgekoppelde mechanismes van gladde spiercelsensitisatie en mechanische activatie van groei-gerelateerde pathways in gladde spiercellen in kanaalarteriën en in de hartspeer, is er weinig direct bewijs om zo'n mechanisme specifiek te linken aan arteriolaire myogene vasoconstrictie. Nochtans, heeft een directe beoordeling van de sensitiviteit van Ca^{2+} , via meting van de I-tone Ca^{2+} -verhouding, steeds een lagere gevoeligheid tijdens Rho kinase-inhibitie voortgebracht.

Het zal duidelijk zijn dat er meer onderzoek gedaan moet worden in dit onderzoeksgebied om deze potentieel belangrijke pathway te linken aan arteriolaire myogene reactiviteit en om meer duidelijkheid te verschaffen in de mogelijk betrokken mechanismes.

5.2.3 ROS

De betrokkenheid van reactive oxygen species (ROS) in de modulatie van Ca^{2+} -sensitiviteit en myogene respons in een relatief recentelijke ontdekking. De initiële indicatie dat O_2^- de myogene respons moduleert, was doordat arteriën van transgene dieren die NADPH oxidase-functie misten (knockout van p47phox en transgeen voor dominant-negatieve N17Rac) geen myogene reactiviteit lieten zien.

Deze ontdekking was later bevestigd door observaties dat muizen deficiënt voor superoxide dismutase (SOD, een endogene antioxidant enzym dat superoxide oxideert naar H_2O_2) een vergrote myogene reactiviteit bezaten. Het gebruik van chemische NADPH oxidase inhibitors en antioxidanten bleken een verplichte rol van O_2^- -generatie voor myogene reactiviteit vast te stellen. Keller et al. concludeerde dat ROS een modulatorische rol, in plaats van een obligate rol, speelt in de regulatie van Ca^{2+} -sensitiviteit tijdens myogene vasoconstrictie [Schubert et al. 2008].

Verdere mechanismes en pathways zullen nog verder onderzocht moeten worden.

6. Pathofysiologie van de myogene respons

In dit laatste hoofdstuk wordt de pathofysiologische kant van de myogene tonus/myogene respons besproken. Zoals in de inleiding beschreven, bestaan autoregulatorische vaatbedden uit twee organen, de nieren en de hersenen. Van beide van deze organen zal er een veelvoorkomende pathologie besproken worden, respectievelijk diabetische nefropathie voor de nieren en herseninfarct voor de hersenen. Dit, omdat dit zeer veelvuldig voorkomende pathologieën in de westerse wereld zijn. Als laatste zal er dan nog gekeken worden naar wat er mogelijk is qua medicatie, welke nu al op de markt beschikbaar zijn, om de myogene tonus/myogene respons te verbeteren en dus te kijken wat er mogelijk is om deze pathologieën te verbeteren en/of te voorkomen, wanneer bekend is dat myogeen disfunctioneren betrokken is.

6.1 Diabetische nefropathie

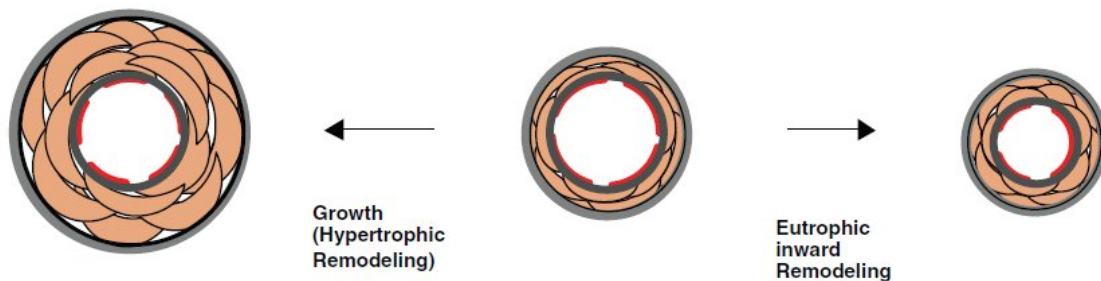
Diabetische nefropathie is de meest voorkomende oorzaak van end-stage renal disease (ESRD) in de westerse wereld, met gemiddelde kosten van meer dan \$15.6 miljoen per jaar in de Verenigde Staten alleen al. In anticipatie op een obesitas-gerelateerde diabetes-epidemie, gekoppeld met progressieve groei in patiënten met hypertensie, wordt een exponentiële groei verwacht. Zowel diabetes als nierfalen zijn toenemend herkend als gegeneraliseerde vasculopathische statussen. Er is vernieuwde interesse in het identificeren van potentiële vasculaire mechanismes die invloed hebben op nierschade. De relatie tussen diabetes, hypertensie en nierziekten is complex, progressief en terugkerend. Wat wel bekend is, is dat insulineresistentie vaak samen gaat met hypertensie. Insulineresistentie is gerelateerd aan Diabetes Mellitus Type 2 en wanneer deze vorm van resistentie ontstaat, bestaat het vermoeden dat door de insulineresistentie via een of ander mechanisme ook de myogene respons aangetast wordt.

Microalbuminurie is een sterke marker om progressie van nefropathie te bepalen en renale functie blijft verslechteren in 30% van de microalbuminurische patiënten met of type 1 of type 2 diabetes. Dus, de status waarin diabetische nierziekten het liefst gestopt worden en eventueel zelfs teruggedraaid kunnen worden is op het moment dat microalbuminurie gedetecteerd wordt bij de clinicus. De reversibiliteit van microalbuminurie suggereert eerder een geassocieerde vasculaire disfunctie dan een meer permanent structureel defect van de nieren.

Zeer vroeg in de natuurlijke ontwikkeling van diabetische nefropathie is er een subklinische fase van renale hyperfiltratie, gekarakteriseerd door een toename van de glomerulaire filtratie rate (GFR). Hyperfiltratie is gerapporteerd in respectievelijk 66% en 50% in type 1 en type 2 diabetespatiënten. Dit is kan teruggedraaid worden door het normaliseren van de hyperglycemie. Sinds het bekend is dat hyperfiltratie vooraf gaat aan de ontwikkeling van glomerulaire schade, albuminurie en verslechtering van de renale functie, zijn er suggesties gedaan dat disfunctionele autoregulatie van de GFR een causale rol heeft in diabetische nefropathie. De principedeterminant van GFR is de glomerulaire capillaire druk (P_{GC}), welke op zijn beurt weer afhankelijk is van de autoregulatie van renale blood flow (RBF). RBF wordt gecontroleerd door twee mechanismes: de snelle myogene respons van de renale afferente arteriool en de langzamere tubuloglomerulaire feedback.

Individueen met een adequate myogene respons en eutrofische remodelling (Figuur 6), hebben hier een gereduceerde lumendiameter en dus een gereduceerde flow rate. Dit heeft een beschermend effect op het orgaan dat stroomafwaarts ligt. Daarnaast, in patiënten waarbij een adequate autoregulatie ontbreekt en waarvan arteriële remodelling niet resulteert in een lumen met een gereduceerde diameter, zal een centrale hypertensie door gestegen druk direct doorwerken op de microcirculatie in het desbetreffende orgaan. De resulterende passieve druk in het microcirculatorische vaatbed zal leiden tot drukgerelateerde

schade in de betrokken organen, zoals in de glomeruli van de nieren. Daarom geeft ontwikkeling van hypertrofie een signaal af voor functionele ziekten en is het een dreigend doelwit voor orgaanschade, zoals diabetische nefropathie [Khavandi et al. 2009].



Figuur 6: Eutrofische en hypertrofische remodeling van kleine arteriën.

Eutrofische inwaartse remodeling wordt gezien in essentiële hypertensie en is geassocieerd met een toename in wanddikte en reductie van de lumendiameter. Het is de tegengestelde van hypertrofische remodeling, waarbij de wanddikte ook toeneemt, maar waarbij de lumendiameter onveranderd blijft en dus de arterie zelf vergroot is.

Er is in diverse studies geprobeerd een verband te leggen tussen diabetische nefropathie en het disfunctioneren van de myogene respons in de afferente arteriolen in nieren van diabetici. Het is bekend dat adequate vasoconstrictie een adequaat werkend endotheel nodig heeft. Dit impliceert dat de endotheliale functie gestoord zou kunnen zijn bij diabetici. In de studie van Hayashi et al. is gebleken dat ondanks een verminderde reactiviteit op druk in de afferente arteriolen van DM-nieren, de endotheelfunctie niet afwijkend is. Dit suggereert dat het endotheel niet betrokken is bij de myogene disfunctie in diabetische nefropathie. In dezelfde studie kon de myogene reactiviteit hersteld worden door cyclooxygenase inhibitie. Cyclooxygenase remt prostaglandine-productie en remt dus de vasodilatatoire werking van prostaglandines. Dit indiceert dat de disfunctie in de afferente arteriolaire respons op druk in diabetische nieren kan toegeschreven worden aan functionele vernaderingen in de renale microcirculatie. Hier is mogelijk het eicosanoïde metabolisme betrokken, aangezien deze prostaglandines produceert. [Hayashi et al. 1992]

Wanneer je mogelijk kan ingrijpen in deze pathway en hierdoor de myogene respons kan verbeteren, zou je mogelijk de progressie van diabetische nefropathie kunnen remmen en eventueel (in de toekomst) de aandoening zelf genezen. Echter zal hier nog veel onderzoek naar gedaan moeten worden, aangezien er nog lang geen definitieve conclusie hierover getrokken kan worden.

6.2 Herseninfarct

Herseninfarcten zijn al bekend sinds de antieke tijden. Op heden is herseninfarct de tweede meest frequente oorzaak van overlijden en de meest voorkomende oorzaak van invaliditeit. In ontwikkelingslanden speelt het herseninfarct epidemiologisch gezien nog geen grote rol van betekenis als gevolg van minder voorkomende risicofactoren en een geringere levensverwachting. Dit is echter met de toenemende welvaart aan het veranderen.

In ongeveer 80% van de gevallen is een herseninfarct veroorzaakt door cerebrale ischemie en in ongeveer 20% is het veroorzaakt door intracerebrale bloedingen, subarachnoidale bloedingen, veneuze thromboses en andere cerebrovasculaire ziektes. De hersenen zijn een van de meest rijk doorbloede weefsels en zijn hier fundamenteel afhankelijk van voor de bevoorrading van zuurstof en glucose. Om een adequate cerebrale blood flow te garanderen, zijn de hersenen uitgerust met een autoregulatiesysteem door interactie van verschillende autoregulatorische mechanismes, zoals myogeen, neurogeen en

metabole factoren, maar ook bloedviscositeit, renine-angiotensinesysteem en het endotheel zijn betrokken [Heckman et al. 2001]. Als resultaat van de combinaties van veranderingen in gladde spiercel ionische permeabiliteit, contraheert de spier, de diameter van de vaten zal verkleinen en de cerebrale vasculaire weerstand zal vergroten. Deze ketting van gebeurtenissen beslaat het myogene mechanisme in de hersenen [Panerai 2008].

In een studie van Reading et al. is gebleken dat het receptorpotentiaal van TRPM4-kanalen fundamenteel gelinkt is aan de myogene constrictie-respons van cerebrale arteriën, welke ontstaat wanneer de intravasculaire druk stijgt. In vivo verlaagt suppressie van TRPM4 de myogene constrictie in cerebrale arteriën en verslechtert het de autoregulatie. Dit impliceert dat TRPM4-kanalen en daardoor myogene constrictie een grote bijdrage leveren aan de cerebrale blood flow-regulatie [Reading et al. 2007].

Bij het overschrijden van de bovenlimiet van de cerebrale perfusiedruk ontstaat er schade aan de vaatwanden kalibren onregelmatigheden, vaatoedeem en storingen van de bloed-hersenbarriere met als gevolg een vasculair hersenoedeem. Men spreekt daarbij van het doorbreken van de autoregulatie [Heckman et al. 2001].

Dit zijn zeer grote risicofactoren voor een herseninfarct en de kans is dus groot dat wanneer het myogene mechanisme niet goed functioneert, dat iemand een herseninfarct ontwikkelt. Daarnaast is het ook zo dat in veel gevallen patiënten met een herseninfarct ook myogeen disfunctioneren hebben. Als je dus kan ingrijpen ergens in de pathway van de myogene respons, zou de kans op een herseninfarct mogelijk verkleind kunnen worden.

6.3 Mogelijke medicatie

In dit laatste subhoofdstuk zal er gekeken worden welke medicijnen mogelijk een potentieel positief effect kunnen hebben op de pathologieën diabetische nefropathie en herseninfarct, zoals hier boven besproken. De medicatie die besproken zal worden, komen allen uit verschillende medicatieklassen. Enkele zullen betrekking hebben op de calciumhuishouding, aangezien dit erg nauw verbonden is met de myogene respons. Verder wordt er gekeken naar antihypertensiva (ACE-remmers), diuretica en specifiek voor diabetische nefropathie ook nog naar orale bloedglucoseverlagende middelen. De informatie over desbetreffende medicijnen komt uit het Farmacotherapeutisch Kompas [Farmacotherapeutisch Kompas]. Echter niet alle medicijnen zijn geïndiceerd bij de desbetreffende pathologieën, maar zijn door mij gekozen, omdat naar mijn persoonlijke inzicht deze mogelijk toch een positief effect kunnen hebben.

Calciumzouten

Bij myogene disfunctie zou mogelijk de myogene respons verbeterd kunnen worden door een verhoogde extracellulaire calciumconcentratie. Uit onderzoeken is namelijk gebleken dat de myogene respons hoofdzakelijk afhankelijk is van de extracellulaire $[Ca^{2+}]$ en ik kan me voorstellen dat bij myogeen disfunctioneren bijvoorbeeld de sensitiviteit voor calcium van de VGCC verlaagd is, of dat de calciumconcentratie in het lichaam ten tijde van diabetische nefropathie of herseninfarct verlaagd is en dat er dan hypocaliëmie ontstaat.

Bij hypocalciëmie hebben calciumcitraat, -gluconaat of -glubionaat als calciumzouten de voorkeur als behandeling. Calcium is van belang voor de botvorming en speelt een rol bij de bloedstolling, spieractiviteit, het handhaven van de permeabiliteit van de membranen en bij de voortgeleiding van de zenuwprikkels in de neuromusculaire overgangen [Farmacotherapeutisch Kompas].

Dus door het verhogen van de extracellulaire $[Ca^{2+}]$ verwacht ik een verbetering in de myogene respons, doordat of door een overload aan calcium dat de VGCC's meer en sneller calcium naar de intracellulaire ruimte transporteren of doordat de hypocaliëmie verbeterd en/of opgeheven wordt.

Vitamine-D

Vitamine-D bestaat uit een groep chemisch sterk verwante stoffen, die alleen een steroïdskelet hebben. In de huid opgeslagen 7-dehydrocholesterol (provitamine D₃) wordt onder invloed van ultraviolette straling (UV-B) omgezet tot colecalciferol. Met behulp van het vitamine-D-bindend proteïne wordt colecalciferol getransporteerd naar de circulatie. In de lever wordt colecalciferol gemetaboliseerd tot 25-hydroxyD₃, waarna in de nieren de omzetting tot met name actief 1,25-dihydroxyD₃ (calcitriol) plaatsvindt. Deze laatste omzetting wordt gestimuleerd door het parathyroïd hormoon (PTH).

Colecalciferol (vitamine-D₃) speelt een rol bij de skeletopbouw en -instandhouding, onder andere door handhaving van de calcium/fosforspiegel. Hiertoe bevordert het de fosfaat- en calciumabsorptie uit het maag-darmkanaal en de terugresorptie van calcium door de nieren en mobiliseert het calcium uit botweefsel [Farmacotherapeutisch Kompas].

Door vitamine-D-suppletie wordt de calciumconcentratie verhoogd en om dezelfde redenen als hierboven genoemd bij calciumzouten, verwacht ik een verbetering in de myogene respons.

ACE-remmers

Het renine-angiotensine-systeem (RAS). Onder invloed van bloeddrukverlaging, afname van het bloedvolume en natriumdepletie, scheiden de juxtaglomerulaire cellen in de nier renine af. Geactiveerd renine in de bloedbaan veroorzaakt hydrolyse van angiotensinogeen tot angiotensine (AT) I, dat op zijn beurt door ACE wordt gehydrolyseerd tot AT II. Dit heeft zelf sterk vasoconstrictieve eigenschappen en induceert tevens het vrijkomen van aldosteron uit de bijnierschors, waardoor bloeddrukstijging en natrium- en waterretentie optreden. Naast het systemische RAS speelt mogelijk ook het lokale RAS (in de vaatwand) een belangrijke rol. Remming van het ACE en/of blokkade van de AT II (type-1)-receptor hebben bloeddrukdaling tot gevolg [Farmacotherapeutisch Kompas].

Wanneer er dus ACE-remmers gegeven worden, zal de gehele systemische bloeddruk omlaag gaan en dus ook de hypertensie die in de organen is ontstaan. Het grijpt dus niet direct in de myogene pathway in, maar heeft indirect invloed op het disfunctioneren van de myogene respons, want wanneer de bloeddruk lager is, hoeven de vaatwanden ook niet zo sterk te contraheren met behulp van de myogene respons.

Osmotische diuretica

Osmotische diuretica zouden zowel bij nefropathie als bij hersenoedeem en dus herseninfarct werkzaam kunnen zijn. Voor de nieren zouden Mannitol en Sorbitol gebruikt kunnen worden en bij hersenoedeem alleen Mannitol.

Osmotische diuretica werken in de nieren op de proximale tubulus en de lis van Henle. Door osmoseverhinderend vind er terugresorptie van water en daarmee van Na⁺Cl⁻ plaats. Verder vindt er een verlaging van de toniciteit van de medulla plaats door verbetering van de medullaire doorbloeding. Dit heeft als gevolg een verminderd vermogen van de nier tot urineconcentratie. Ook zorgt het voor een verhoging van de osmolaliteit van de extracellulaire ruimte, waardoor waterverhuizing optreedt van intracellulair naar extracellulair [Farmacotherapeutisch Kompas].

Door het geven van osmotische diuretica wordt er meer water afgescheiden, hierdoor bevindt zich minder vloeistof in het lichaam en dus ook in de nieren en hierdoor daalt de hypertensie en wordt de myogene disfunctie mogelijk gecompenseerd.

Bij een verhoogde druk in de hersenen is er een vergroot risico op hersenoedeem. De therapie bij hersenoedeem dient gericht te zijn op de verlaging van de intracraniale druk en zo mogelijk het wegnemen van de onderliggende oorzaak. In afwachting van verdere diagnose wordt het hoofd hoger gelegd, wordt gewaakt voor grote bloeddrukveranderingen en gezorgd voor voldoende oxygenatie. Verder wordt er ook een infuus met mannitol gegeven. De werking hiervan treedt binnen max. een uur op en houdt ongeveer 4-24 uur

aan. Kortdurende hyperventilatie (tot 24 uur, waarna langzame afname van de ademhalingsfrequentie) met als doel verlaging van de koolzuurspanning tot 26–30 mm Hg kan door lokale vasoconstrictie en de vermindering van het volume intracranieel bloed positief zijn bij intracranieële hemorrhagie en een tumor [Farmacotherapeutisch Kompas].

Zoals hieruit blijkt kunnen osmotische diuretica dus ook werkzaam zijn bij hersenoedeem en dus bij het risico voor herseninfarct. Door de intracranieële drukverlaging wordt de myogene disfunctie mogelijk gecompenseerd en wordt het risico op het ontwikkelen van een herseninfarct, bijvoorbeeld hersenbloeding verlaagd.

Orale bloedglucoseverlagende middelen

Specifiek voor diabetische nefropathie zijn orale bloedglucoseverlagende middelen ook nog een optie. De orale bloedglucoseverlagende middelen worden toegepast bij Diabetes Mellitus type 2. Gebruik komt in aanmerking nadat tevergeefs is geprobeerd de diabetes door voedingsadviezen en lichaamsbeweging te regelen en bij voortschrijdende ziekte. Met een optimale bloedglucoseregulatie kan men complicaties op de korte termijn voorkomen en op de lange termijn uitstellen. De instelling van de patiënt en bijstelling van de medicatie vindt plaats op basis van gemeten bloedglucosespiegels. Er bestaat een relatie tussen de mate van de hyperglycemie en het ontstaan van lange termijn complicaties zoals microvasculaire (retinopathie, nefropathie). De resultaten van de United Kingdom prospective diabetes study (UKPDS) lieten zien dat optimale bloedglucoseregulatie met orale bloedglucoseverlagende middelen (metformine en de SU-derivaten glibenclamide en chloorpropamide) of insuline leidt tot met name uitstel van het aantal microvasculaire complicaties [Farmacotherapeutisch Kompas].

Conclusie/Discussie

De myogene respons, gekarakteriseerd door een afname in vaatdiameter wanneer de transmurale druk stijgt en een toename in vaatdiameter wanneer de transmurale druk daalt, is betrokken bij autoregulatie van diverse vaatbedden, zoals de nieren en de hersenen. Wanneer er disfunctie in de myogene respons ontstaat, ontwikkelt zich orgaanhypertensie. Dit is met name in de autoregulatorische vaatbedden gevaarlijk. Het is gebleken dat niet alleen de diameter van het bloedvat bepalend is voor hoe sterk de myogene respons is, maar dat dit ook varieert tussen verschillende vaatbedden. De vaatwand zorgt voor een omgeving waarin de gladde spiercellen sterk in interactie zijn met twee andere type cellen: het endotheel en zenuwen/zenuweinden. Echter, in het algemeen blijkt dat endotheliale cellen en de zenuwcellen maar een minimale uitwerking hebben op de myogene respons en dat deze dus vrijwel alleen wordt bewerkstelligd door de gladde spiercellen. De myogene mechanismes kunnen opgedeeld worden in twee secties: mechanismes betrokken bij membraandepolarisatie, veelal kanalen en intracellulaire second messenger mechanismes.

Stretch-geactiveerde kanalen, calciumgeactiveerde kaliumkanalen, chloridekanalen, calciumkanalen en TRP-kanalen blijken betrokken te zijn bij membraandepolarisatie. Voor calciumkanalen en enkele TRP-kanalen is significant bewijs dat ze betrokken zijn bij de myogene respons, transmembrane calciuminflux blijkt cruciaal te zijn in de ontwikkeling van myogene activiteit. TRPC6, TRPM4 en TRPV2 lijken ook betrokken te zijn, in diverse studies is gebleken dat ze membraandepolarisatie en contractie van de vaatwand stimuleren. Voor de overige kanalen is er nog veel onduidelijk en zijn er veel tegenstrijdige resultaten die nog verder onderzocht zullen moeten worden.

Er is steeds meer bewijs dat verschillende intracellulaire second messengers, zoals IP_3 , DAG/PKC, RhoA/Rho kinase en ROS, betrokken zijn bij de myogene respons. IP_3 kan intracellulaire Ca^{2+} -voorraden loslaten wanneer het gevormd wordt. Dit verhoogt dan dus de cytosolische $[Ca^{2+}]$. DAG/PKC, RhoA/Rho kinase en ROS vergroten de calciumsensitatie.

Diabetische nefropathie en zijn zeer veelvuldig voorkomende pathologieën in de samenleving. Het is de meest voorkomende oorzaak van end-stage renal disease (ESRD) in de westerse wereld en het is bekend dat insulineresistentie vaak samen gaat met hypertensie. Zowel diabetes als nierfalen zijn toenemend herkend als gegeneraliseerde vasculopathische statussen waarbij de myogene respons bij betrokken is. Hyperfiltratie gaat vooraf aan de ontwikkeling van glomerulaire schade, albuminurie en verslechtering van de renale functie. Herseninfarct is de tweede meest frequente oorzaak van overlijden en de meest voorkomende oorzaak van invaliditeit. In ongeveer 80% van de gevallen is een herseninfarct veroorzaakt door cerebrale ischemie en in ongeveer 20% is het veroorzaakt door intracerebrale bloedingen, subarachnoidale bloedingen, veneuze thromboses en andere cerebrovasculaire ziektes.

Bij het overschreden van de bovenlimiet van de cerebrale perfusiedruk ontstaat en schade aan de vaatwanden kalibren onregelmatigheden, vaatoedeem en storingen van de bloed-hersenbarriere met als gevolg een vasculair hersenoedeem. Men spreekt daarbij van een breakthrough van de autoregulatie. Dit zijn zeer grote risicofactoren voor een herseninfarct en de kans is dus groot dat wanneer het myogene mechanisme niet goed functioneert, dat iemand een herseninfarct ontwikkelt.

Er zijn diverse medicamenten die mogelijk zouden kunnen ingrijpen in de myogene pathway, of indirect via andere pathways de myogene mechanismes zouden kunnen ontlasten. Dit zijn calciumzouten, vitamine D, ACE-remmers, osmotische diuretica en speciaal voor diabetische nefropathie nog de orale bloedglucoseverlagende middelen.

Door mogelijkwerwijs de vasculopathische statussen te doorbreken, zou er een vicieuze cirkel van nog meer vasculaire pathologieën doorbroken en/of voorkomen kunnen worden, zoals cardiovasculaire aandoeningen. Het is namelijk gebleken dat patiënten met nierfalen, herseninfarct of een cardiovasculaire aandoening een vergrote kans hebben op het ontwikkelen van dergelijke andere pathologieën.

8. Literatuurlijst

- **Davis M.J. et al.**, *Integrins mechanotransduction of the vascular myogenic response*, *AJP – Heart and Circulatory Physiology* (2001) 280, H1427-H1433
- **Dokkum van R.P.E.**, *Renal myogenic tone as therapeutic target in kidney disease*, aanvraag onderzoekssubsidie aan Nierstichting Nederland (2008)
- **Farmacotherapeutische kompas**, <http://www.fk.cvz.nl/>, geraadpleegd op 22-06-2009
- **Girouard et al.**, *Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease*, *Journal of Applied Physiology* (2006) 100(1):328-335
- **Harder D.R.**, *Pressure-dependent membrane depolarization in cat middle cerebral artery*, *Circ Res* (1984) 55: 197–202
- **Hayashi K. et al.**, *Impaired myogenic responsiveness of the afferent arteriole in streptozotocin-induced diabetic rats: role of eicosanoid derangements*, *Journal American Soc. Nephrology* (1992); 2:1578-1586)
- **Heckmann J.G. et al.**, *Die Hirndurchblutung aus klinischer Sicht: Historischer Überblick, Physiologie, Pathophysiologie, diagnostische und therapeutische Aspekte*, *Medizinische Klinik* (2001) 96, 583-592
- **Hill M.A. et al.**, *Signal transduction in smooth muscle; Invited review: arteriolar smooth muscle mechanotransduction: Ca²⁺ signalling pathways underlying myogenic reactivity*, *Journal of Applied Physiology* (2001) 91, 973–983
- **Khavandi K. et al.**, *Myogenic tone and small artery remodelling: insight into diabetic nephropathy*, *Nephrol Dial Transplant* (2009) 24, 361-369
- **Murphy T.V. et al.**, *Cellular signalling in arteriolar myogenic constriction: involvement of tyrosine phosphorylation pathways*, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* (2002) 29, 612-619
- **Panerai R.B.**, *Cerebral autoregulation: From models to clinical applications*, *Cardiovasc Eng* (2008) 8, 42-59
- **Reading S.A.**, *Central role of TRPM4 channels in cerebral blood regulation*, *Journal of the American Heart Association; American Stroke Association* (2007) 38, 2322-2328
- **Schubert R. and Mulvany M.**, *The myogenic response: established facts and attractive hypotheses*, *Clinical Science* (1999) 96, 313-326
- **Schubert R. et al.**, *The emerging role of Ca²⁺ sensitivity regulation in promoting myogenic vasoconstriction*, *Cardiovascular Research* (2008) 77, 8–18
- **Sharif-Naeini R. et al.**, *TRP channels and mechanosensory transduction: insight into the arterial myogenic response*, *European Journal of Physiology* (2008) 456, 529-540
- **Sun D. et al.**, *Characteristics and origin of myogenic response in isolated gracilis muscle arterioles*, *American Journal of Physiology* (1994) 266(3 Pt 2):H1177-83