

CHAPTER 7 SAMENVATTING

7. SAMENVATTING

Samenvatting

Om diafragmazwakte van mechanisch geventileerde ernstige zieke patiënten beter te kunnen begrijpen is het bestuderen van diafragmaspierbiopten noodzakelijk. In deze thesis zijn diafragmaspierbiopten van mechanisch geventileerde hersendode en ernstig zieke patiënten vergeleken met controle patiënten die electieve long chirurgie ondergingen. Hierbij is gekeken naar het dwarsoppervlakte, de contractiele kracht en kinetiek van cross bridge vorming van individuele spiervezels. Daarnaast zijn de componenten en regulatoren van het ubiquitine-proteasoom systeem -een van de belangrijkste proteolytische systemen- in dit onderzoek in kaart gebracht. Ook is er getest of een troponine activator voor snelle spiervezels (CK-2066260) de contractiliteit van spiervezels kan verbeteren. Tot slot zijn mitochondriële fragmentatie en complexen -die atrofische mechanismen kunnen activeren en ATP productie kunnen beïnvloeden- bestudeerd.

Hoofdstuk 1 is een algemene introductie van de fysiologie van respiratie, waarbij het diafragma de belangrijkste spier is. Het verspreiden van een actiepotentiaal over het sarcolemma van een spiervezel induceert het vrijkomen van calcium en de vorming van cross bridges in de contractiele filamenten, en daarmee de ontwikkeling van kracht. Contractie van diafragma spiervezels leidt tot vergroting van de ruimte in de longen waardoor lucht van buiten de alveoli in wordt gezogen. Op Intensive Care afdelingen is mechanische ventilatie een veelgebruikte levensreddende therapie tegen respiratoir falen. Verscheidene studies hebben echter aangetoond dat tijdens mechanische ventilatie diafragma dysfunctie kan ontwikkelen in zowel dierenmodellen als in mensen. Diafragmazwakte bemoeilijkt het ontwennen van mechanische ventilatie, leidt tot een verlengde ziekenhuis-opname duur en een verhoogde morbiditeit van patiënten die opgenomen zijn op de Intensive Care ^{1,5-7}.

Bevindingen van verminderde beweging en verdunning van het diafragma ^{59,58} en een verminderde capaciteit om transdiafragma druk te genereren ^{63 51} suggereren dat ernstig zieke patiënten te kampen hebben met diafragma dysfunctie. Het in kaart brengen van de veranderingen op het niveau van individuele diafragma spiervezels is belangrijk voor ons begrip van de pathofysiologie van diafragma dysfunctie, maar dat is tot zover vrijwel niet gedaan. Dit is hoofdzakelijk te verklaren door de technische moeilijkheden bij het verkrijgen van diafragma biopten van ernstig zieke mechanisch geventileerde patiënten. Een alternatieve benadering voor het verkrijgen van diafragma van zulke patiënten is het afnemen van diafragma weefsel van hersendode orgaandonoren ^{62,67-69}, gezien zij mechanisch geventileerd worden voordat organen worden verwijderd. Verscheidene studies hebben atrofie en activatie van proteolytische mechanismen in diafragmavezels van deze donoren aangetoond ^{62,67-69}. Tot zover hebben dit soort studies echter niet gekeken naar de effecten van

mechanische ventilatie op spiervezel functie. Daarom vergelijken we in **hoofdstuk 2** het weefsel van hersendode orgaandonoren (n=9) met controle patiënten (n=9) die resectie hebben ondergaan op verdenking van een vroege long maligniteit. Onze bevindingen laten zien dat langzame en snelle diafragma spiervezels van hersendode orgaandonoren niet verschillen van die van controle patiënten op het gebied van (1) spiervezel dwarsdoorsnede, (2) spiervezel contractiliteit, gemeten als zowel absolute en specifieke kracht, (3) de calciumgevoeligheid van krachtgeneratie en (4) kinetiek van cross bridge vorming, en 5) myosine heavy chain content. De discrepantie tussen de bevindingen van voorgaand werk en onze studie zou een resultaat kunnen zijn van de beademingsduur na afloop van de diagnose hersendood, welke relatief kort is in onze studie (26h) in vergelijking met de duur zoals gerapporteerd in voorgaande studies (34h in Levine et al ⁶⁸ en 80h in Jaber et al ⁶²). Andere verklaringen zouden de verschillen in duur en manier van beademen voorafgaande aan de diagnose hersendood kunnen zijn, gezien bekend is dat verschillende beademingstechnieken en perioden het diafragma op verschillende wijzen beïnvloeden ^{44,46,63}, evenals verschillen in blootstelling aan medicatie waarvan bekend is dat die contractiliteit van spieren veranderen, zoals corticosteroiden ¹⁶². Helaas is zulke informatie van de periode voorafgaand aan de diagnose hersendood niet beschikbaar. De beste verklaring is daardoor waarschijnlijk dat 26h ventilatie niet voldoende is om diafragma spiervezel atrofie en dysfunctie te veroorzaken in mensen.

Het is onduidelijk of bevindingen van hersendode orgaandonoren van toepassing zijn op mechanisch geventileerde ernstig zieke patiënten, gezien zij verschillende klinische eigenschappen hebben. Om die reden is het van groot belang om diafragma's van mechanisch geventileerde ernstig zieke patiënten te bestuderen zodat we de problemen rondom het vermoelijk ontwennen van de beademing kunnen ontrafelen. In **Hoofdstuk 3** worden metingen op diafragma weefsel van 22 ernstig zieke patiënten die reeds mechanisch geventileerd werden voordat zij chirurgie ondergingen vergeleken met 14 controle patiënten die slechts mechanisch geventileerd zijn tijdens chirurgie voor verwijdering van verdenking van een vroege maligniteit van de longen. Er is gevonden dat (1) mechanisch geventileerde ernstig zieke patiënten ongeveer 25% kleiner dwarsoppervlakte van langzame en snelle diafragmaspieren hadden en 2) dat de absolute kracht van deze vezels 50% kleiner was dan controles. Deze vermindering in kracht persisteert wanneer genormaliseerd wordt voor het verminderde dwarsoppervlak, wat duidt op een vermindering in maximale tensie. De reductie in maximale tensie komt voornamelijk door een vermindering in het aantal vastzittende cross bridges tijdens activatie. Onze bevindingen laten ook zien dat er in diafragma's van ernstig zieke patiënten 3) een significant hogere ubiquitinatie van eiwitten is en een grotere hoeveelheid dwarsgestreepte spiervezel-specifiek ubiquitine E3 ligasen (MuRF-1 en MAFbx). Deze ligasen faciliteren de conjugatie van ubiquitine naar eiwitten ²³. De sleutelrol van MuRF-1 in de ontwikkeling van spierzwakte wordt bevestigd in onze studie in MuRF-1 knockout muizen, waarin duidelijk wordt dat (4)

deze muizen beschermd zijn tegen ontwikkeling van contractiele zwakte van het diafragma tijdens mechanische ventilatie.

De waargenomen reductie in de contractiele kracht van diafragma vezels in ernstig zieke patiënten is vergelijkbaar met de reductie in diafragma kracht gemeten in vivo, zoals voorheen is vastgesteld middels het stimuleren van de nervus phrenicus^{51,63}. Dit wijst erop dat veranderingen op het niveau van diafragma spiervezels grotendeels de veranderingen die gevonden zijn in vivo verklaren. Onze studie geeft aanleiding om behandelstrategieën te ontwikkelen die het ontwennen van mechanische ventilatie kunnen bevorderen. Voorbeelden hiervan zijn remmers van spierspecifieke ligasen van het ubiquitine-proteasoom systeem -om daarmee atrofie te voorkomen- en therapieën die de contractiliteit van diafragma spiervezels verbeteren.

Troponine activatoren behoren tot een nieuw type medicatie van kleine moleculen die de contractiliteit van dwarsgestreepte spiervezels kan verbeteren. Een van die activators, genaamd tirasemtiv (voorheen CK-2017357)⁸¹, wordt momenteel getest in patiënten met amyotrofische laterale sclerosis [NCT01709149]. In **hoofdstuk 4** wordt getest of de troponine activator voor snelle spiervezels CK-2066260, wat een analoog is van tirasemtiv, de contractiele kracht van diafragma spiervezels kan verbeteren. Diafragma biopten van ernstig zieke patiënten (n=10) worden vergeleken met controle patiënten die electieve longchirurgie ondergingen (n=10). Er is gevonden dat (1) de pCa50 -i.e. negatieve logaritme van de calcium concentratie benodigd voor de ontwikkeling van 50% van de maximale kracht - significant lager is in snelle diafragma spiervezels van ernstig zieke patiënten. We hebben individuele spiervezels van een representatieve groep van controle (n=3) en ernstig zieke patiënten (n=4) blootgesteld aan 5µM of CK-2066260. Onze bevindingen laten zien dat dit (2) vergeleken met een vehicle de calcium gevoeligheid van diafragma spiervezels significant verhoogt in zowel de patiënten als controle groep. Bovendien (3) herstelt CK-2066260 op fysiologische calcium-concentratie de contractiele kracht van snelle diafragma spiervezels van ernstig zieke patiënten terug tot die van onbehandelde diafragma spiervezels van controle patiënten. Hiermee komen we tot de conclusie dat CK-2066260 de contractiele kracht van diafragma spiervezels ex vivo verbetert. Toekomstige studies zouden de werkzaamheid van dit soort medicatie kunnen testen met betrekking tot het verbeteren van ontwennen van mechanische ventilatie.

Onze bevindingen van hoofdstuk 3 en 4 suggereren dat verzwakking van het diafragma in ernstig zieke patiënten voor een groot deel toegeschreven zou kunnen worden door contractiele zwakte en atrofie van individuele spiervezels, en dat het ubiquitine-proteasoom systeem een belangrijke rol speelt in proteolyse van spiereiwitten van het diafragma. Echter blijft het onduidelijk welke mechanismen deze proteolytische systemen in diafragma vezels van ernstig zieke patiënten aanwakkeren. Recente studies laten zien dat de AMPK-FoxO3 pathway een belangrijke regulator is van

expressie van atrofische mechanismen zoals die van het ubiquitine-proteasoom systeem³²⁻³⁴, en dat mitochondriële afsplitsing en fusie signalen zijn voor de activatie hiervan^{27,31,32}. Een andere belangrijke rol voor mitochondriële afsplitsing en fusie is dat ze efficiënte menging van de matrix en binnenmembraan bewerkstelligen, evenals de uitwisseling van constituenten voor optimale ATP productie¹³⁸. Wanneer mitochondriën onvoldoende ATP produceren zodra na lange tijd van inactiviteit weer een beroep wordt gedaan op het diafragma, zoals bij het beëindigen van mechanische ventilatie, kan dit problemen voor deze spier opleveren. In **hoofdstuk 5** wordt de morfologie en functie van mitochondriën van mechanisch geventileerde ernstig zieke patiënten (n=28) vergeleken met controle patiënten (n=27). We vinden (1) een verhoging van eiwitten die mitochondriële afsplitsing bewerkstelligen, (2) vermindering van de mitochondriële biogenese regulator PGC1- α , (3) activatie van de energie stress sensor AMPK, (4) een vermindering in elektronen transfer eiwit complexen III, IV en V. We vinden echter dat (5) complex I en II content en respiratie behouden blijven, alhoewel hier een grote heterogeniteit is tussen patiënten. Beschadigde mitochondriën en mitochondriële netwerken zouden kunnen bijdragen aan spieratrofie, de productie van ATP kunnen beperken en de productie van ROS kunnen verhogen. We postuleren dat mitochondriële dysfunctie de functie van het diafragma kan verslechteren, wat voornamelijk belangrijk is bij het ontwennen van mechanische ventilatie.

Conclusie

Onze bevindingen van diafragma atrofie, contractiele zwakte en veranderingen van mitochondriën in diafragma spiervezels van mechanisch geventileerde ernstig zieke patiënten kunnen voor een groot deel zwakte van het diafragma verklaren. Onze innovatieve benadering om diafragma spierweefsel te verzamelen maakt het mogelijk potentiële therapeutische strategieën te testen, en is een stap voorwaarts in de strijd tegen diafragmazwakte, en daarmee tegen het bemoeilijkt ontwennen van mechanische ventilatie, een veelvoorkomend probleem in de kliniek.