

Profile ekspresji genów apoptozy w miokardium chorych z zaawansowanym niedokrwieniem oraz po zawale serca, oceniane techniką mikromacierzy oligonukleotydowych

Expression profiles of genes associated with apoptosis assessed by oligonucleotide microarray analysis in advanced coronary artery disease and post-infarction patients

Józefa Dąbek¹, Zbigniew Gąsior¹, Przemysław Szmagała², Aleksander Owczarek³, Andrzej Kułach¹, Barbara Monastyrska-Cup¹, Urszula Mazurek³, Andrzej Bochenek²

¹Katedra i Klinika Kardiologii Wydziału Opieki Zdrowotnej Śląskiej Akademii Medycznej (Department of Cardiology, Medical University of Silesia, Katowice, Poland)

²Katedra i Klinika Kardiologii Śląskiej Akademii Medycznej (1st Department of Cardiac Surgery, Medical University of Silesia, Katowice, Poland)

³Zakład Biologii Molekularnej Wydziału Farmaceutycznego Śląskiej Akademii Medycznej (Department of Molecular Biology, Medical University of Silesia, Sosnowiec, Poland)

Streszczenie

Wstęp: Badania ostatnich lat dowodzą, że do śmierci kardiomiocytów w trakcie i po zawale serca może dochodzić zarówno w mechanizmie nekrozy, jak i apoptozy. Mimo że oba procesy prowadzą ostatecznie do niepożądanego efektu, udział apoptozy w tym zjawisku pociąga za sobą potencjalną możliwość wpływu przynajmniej na część populacji umierających komórek. Celem pracy była ocena metodą mikromacierzy oligonukleotydowych profilu ekspresji genów związanych z procesem apoptozy w miokardium chorych: z przebyłym zawałem, z zaawansowaną chorobą wieńcową oraz u osoby bez choroby niedokrwiennej serca.

Materiał i metody: Analizie poddano uszka prawego przedsionka pochodzące od 3 chorych (po zawale serca, z przewlekłym niedokrwieniem oraz bez choroby niedokrwiennej serca), uzyskane w trakcie operacji kardiologicznej w krążeniu pozaustrojowym. Po izolacji RNA z tkanki, za pomocą mikromacierzy Affymetrix HG_U133A, oceniano ekspresję 141 genów zaangażowanych w proces apoptozy. Podobieństwo transkryptomów chorych porównano metodą klasteryzacji hierarchicznej.

Wyniki: Na podstawie metody klasteryzacji hierarchicznej wykazano, iż profil ekspresji badanych genów w miokardium pacjenta po zawale serca różni się od transkryptomów pozostałych próbek. Na podstawie krzywej regresji wykazano, że transkryptami różnicującymi są geny CASP4, PDCD8, BBC3, BIT1 oraz DIA-BLO, wykazujące nadekspresję w próbce pozawałowej, oraz geny TNFRSF1A i TNFRSF21, wykazujące niższą ekspresję w miokardium pozawałowym w odniesieniu do klasteryzujących wspólnie pozostałych próbek.

Wnioski: Profil ekspresji genów związanych z apoptozą jest znamienne różny w miokardium pozawałowym w porównaniu ze zdrową oraz przewlekle niedokrwioną mięśniówką serca. W badanym miokardium pozawałowym na uwagę zasługuje nadekspresja proapoptotycznych genów związanych z mitochondriami. Nie obserwowano natomiast istotnych różnic w ekspresji genów układu kaspaz, a 2 geny receptorów TNF α wykazały niższą ekspresję w tkance pochodzącej z serca pozawałowego.

Słowa kluczowe: mikromacierze oligonukleotydowe, apoptoza, zawał serca

Abstract

Background: According to recent data, the pathology of cardiomyocyte death during and after myocardial infarction involves both necrosis and apoptosis. Although both mechanisms eventually lead to cell death, the participation of apoptosis in this process carries the potential of developing strategies to influence at least part of the population of dying cells. Therefore, the aim of this study was to determine expression profiles of genes associated with apoptosis in post-infarction myocardium, chronically ischemic myocardium as well as in a healthy heart muscle with the use of oligonucleotide microarrays.

Material and methods: The tissue samples used were sections from the right cardiac auricles obtained during elective surgery performed on 3 patients, as stated above. Then, the expression of 141 genes involved in fibrosis was assessed using an Affymetrix HG_U133A microarray. The similarity of the patients' transcriptomes was compared using hierarchical clusterisation.

Results: Hierarchical clusterisation demonstrated that the profile of gene expression in post-infarction myocardium was different than that in the remaining specimens.

Regression analysis showed that in post-infarction sample genes encoding caspase 4, PDCD8, BBC3, BIT1 and DIABLO were overexpressed, whereas transcriptional activity of 2 genes encoding TNF α receptors presented a lower expression in the post-infarction sample.

Conclusions: The profile of apoptosis-associated genes is significantly different in post-myocardial infarction (post-MI) myocardium compared to chronically ischemic and non-ischemic myocardium. Our data suggest the importance of proapoptotic factors associated with mitochondria. Genes encoding a cascade of caspases were undifferentiating, while 2 genes encoding TNF α receptors were underexpressed in post-infarction tissue.

Key words: oligonucleotide microarray, apoptosis, myocardial infarction

Wstęp

Spojrzenie na mechanizm śmierci kardiomiocytów w trakcie i po zawale serca ulega w ostatnim czasie wyrażonej ewolucji. Przez lata za wyłączny patomechanizm śmierci niedokrwionych komórek miokardium uważano martwicę. Nowsze badania wskazują jednak, że część niedokrwionych miocytów umiera w mechanizmie apoptozy [1].

Zjawisko apoptozy, określanej mianem programowanej śmierci komórki, bądź aktywnej śmierci komórki, jest procesem podlegającym ścisłej regulacji. W odróżnieniu od nekrozy, w której na skutek zadziałania czynnika uszkadzającego dochodzi do gwałtownego zaburzenia homeostazy komórki, a następnie do jej obrzęku, degradacji błony i rozpadu organelli, apoptoza jest mechanizmem zorganizowanym, prowadzącym do obumarcia komórki bez odpowiedzi zapalnej organizmu [2].

Mimo że w zawałowym miokardium oba mechanizmy prowadzą ostatecznie do niepożądanego efektu śmierci kardiomiocytów, udział apoptozy w tym zjawisku pociąga za sobą potencjalną możliwość wpływu przynajmniej na część populacji umierających komórek.

Regulacja apoptozy jest zjawiskiem bardzo złożonym. Do najważniejszych zewnątrzkomórkowych induktorów tego procesu należą czynnik martwicy nowotworów α (TNF α — *tumor necrosis factor α*) [3], ligand Fas (Fas-L) [4] oraz niektóre czynniki wzrostu. W wewnątrzkomórkowej regulacji istotne znacznie mają kaspazy [5], białka z rodziny bcl-2 [6], białko p-53 [7] oraz kinazy wewnątrzkomórkowe [8]. Nie poznano jeszcze dokładnych zależności między poszczególnymi szlakami sygnałowymi. Ponadto w procesie apoptozy istnieją najpewniej jeszcze inne ogniwa, których udział jest mało poznany lub pomijany. Możliwość analizy wielu takich ogniw jednocześnie może potencjalnie dać szerszy wgląd w patomechanizm apoptozy w miokardium, jak również wskazać punkty ewentualnych działań terapeutycznych.

W ostatnich latach pojawiło się nowe narzędzie w medycynie molekularnej — mikromacierze oligonukleotydowe, pozwalające na jednoczesną ocenę aktywności setek bądź tysięcy genów, które podejrzewa się o udział w danym zjawisku. Narzędzia te dają możliwość opracowania profili ekspresji genów typowych dla danej

Introduction

Views on the mechanisms of cardiomyocyte death during and after myocardial infarction has evolved in recent years. For years necrosis was considered to be the only mechanism of myocardial cell death due to acute ischemia. More recent data, however, indicate that a part of infarcted cardiomyocytes undergo apoptosis [1].

Apoptosis, also referred to as programmed cell death or active cell death is a strictly regulated process. In contrast to necrosis, where sudden loss of cellular equilibrium leads to swelling, degradation of the cellular membrane and disruption of the organelles, apoptosis is a highly organized process and does not involve an inflammatory response [2].

Although both mechanisms eventually lead to cell death, the participation of apoptosis in this process carries the potential of developing strategies to influence, at least, part of the population of dying cells.

The regulation of apoptosis is a complex issue. The cascade of processes is triggered by extracellular inducers. The most important factors to induce apoptosis are: Tumor Necrosis Factor α (TNF α) [3], Fas ligand (Fas-L) [4] and several growth factors of minor significance. Intracellular regulation and the execution of apoptosis are dependent on numerous interacting groups of enzymes and messengers, the most important of which are caspases [5], the bcl-2 protein family [6], p-53 protein [7] and intracellular kinases [8]. Certainly, there are more pieces of the puzzle that are not very well known or their role in apoptosis is underestimated. The possibility of conducting a simultaneous analysis of a number of genes potentially involved in the process may give better insight into the pathomechanism of apoptosis and could reveal potential targets for therapeutic strategies.

In recent years, new research modalities have emerged in the expanding field of molecular medicine. Oligonucleotide microarray analysis allows simultaneous evaluation of the activities of hundreds or thousands of genes participating in a particular process. This method enables a researcher to determine expression profiles of genes typically involved in a given pathology, and allows one to develop an individual treatment strategy depending on the result obtained.

Tabela I. Pacjenci
Table II. Patients

Kod Code	Płeć Sex	Wiek Age	Diagnoza Diagnosis	Przebyty zawał serca History of MI	Palenie tytoniu Smoking
2	M	57	Dławica piersiowa, stan po zawale serca Stable angina, post-MI	Tak Yes	Nie No
7	F	65	Dławica piersiowa Stable angina	Nie No	Nie No
11	F	63	Stenoza mitralna Mitral stenosis	Nie No	Nie No

MI (myocardial infarction) — zawał serca

patologii oraz na indywidualizację podejścia do pacjenta w zależności od profilu. Dlatego celem niniejszej pracy była ocena metodą mikromacierzy oligonukleotydowych profilu ekspresji genów związanych z procesem apoptozy w miokardium chorych: z przebyłym zawałem, z zaawansowaną chorobą wieńcową (bez przebytego zawału serca) oraz u osoby bez zmian w naczyniach wieńcowych.

Material i metody

Pacjenci

Analizie poddano uszka prawego przedsionka pochodzące od 3 chorych (tab. I) operowanych w trybie planowym w I Klinice Kardiologii. U wszystkich pacjentów wykonano EKG, badanie echokardiograficzne, koronarografię, morfologię krwi z rozmazem oraz oznaczono troponinę I, CK, CK-MB. U chorej z zaawansowaną chorobą wieńcową (próbka nr 7) oraz u chorego z zaawansowaną dławicą po przebyłym (około miesiąca wcześniej) zawałem ściany dolnej (okluzja prawej tętnicy wieńcowej) (próbka nr 2) przeprowadzono operację pomostowania tętnic wieńcowych. U chorej ze stenozą mitralną (próbka nr 11) wykonano operację wymiany zastawki mitralnej. Wszystkie operacje przeprowadzone były w krążeniu pozaustrojowym.

Podczas zabiegu w krążeniu pozaustrojowym rutynowo zostaje usunięta część prawego przedsionka, którą następnie się wyrzuca. Ten fragment tkanki został, za zgodą uczestników, wykorzystany do badań genetycznych. Próbkę bezpośrednio po pobraniu umieszczono w ciekłym azocie, a następnie przechowywano w temperaturze -70°C do czasu analizy.

Ekstrakcja RNA

Ekstrakcji mRNA dokonano przy użyciu odczynnika do izolacji całkowitego RNA — Trizol™ (Invitrogen). Po wyizolowaniu kwasu rybonukleinowego RNA oczyszczano poprzez trawienie DNazą I na kolumnach zestawu RNeasy Mini Kit firmy Qiagen. Wydajność ekstrakcji oceniano spektrofotometrycznie za pomocą spektrofotometru Gene Quant II. Jakość całkowitego RNA, cDNA i cRNA oceniono techniką elektroforezy w 1,2-procentowym żelu agarozowym.

Aktywność transkrypcyjna genów wyznaczona techniką mikromacierzy oligonukleotydowych

Do syntezy dwuniciowego cDNA (Invitrogen SuperScript Choice system) wykorzystano 8 μg wyizolowanego z komórek prawego przedsionka całkowitego RNA. W ko-

The purpose of the present study was to use oligonucleotide microarray analysis to determine expression profiles of genes associated with apoptosis in the myocardium of patients with: advanced CAD and a history of myocardial infarction, advanced CAD and no history of myocardial infarction, as well as subjects without ischemic heart disease.

Material and methods

Patients

The tissue samples used were sections from the right cardiac auricles obtained during elective surgery performed on 3 patients (Table I); all three were operated on employing a cardiopulmonary bypass system. The patients had an ECG, echocardiography, coronary angiography, complete blood count and leukocyte differential count while plasma levels of troponine I, CK and CK-MB were also assessed. The patient with advanced CAD (sample 7), and the patient with advanced angina and a history of inferior wall myocardial infarction caused by right coronary artery occlusion (approximately one month before) (sample 2) received coronary bypass grafts. Another patient, with mitral stenosis and normal coronary angiography result (sample 11) underwent a mitral valve replacement.

Excision of right cardiac auricle is routinely performed during surgical procedures with extracorporeal circulation. The specimen is then disposed of. By consent of the subjects taking part in the study, the tissue was used in genetic research. Immediately after collection, tissue samples were placed in liquid nitrogen, and then stored for analysis at a temperature of -70°C . The study conforms with the Declaration of Helsinki.

RNA extraction

The investigations were carried out on Trizol™-extracted mRNA, which was then purified and digested with DNase I on the RNeasy Mini Kit from Qiagen. Extraction efficiency was assessed employing Gene Quant II spectrophotometry. The quality of total RNA, cDNA, and cRNA was determined in 1.2% agarose gel electrophoresis.

Transcriptive activity of the genes was determined using oligonucleotide microarray

About 8 μg of the total RNA extracted from the right cardiac auricle was used in the synthesis of double-

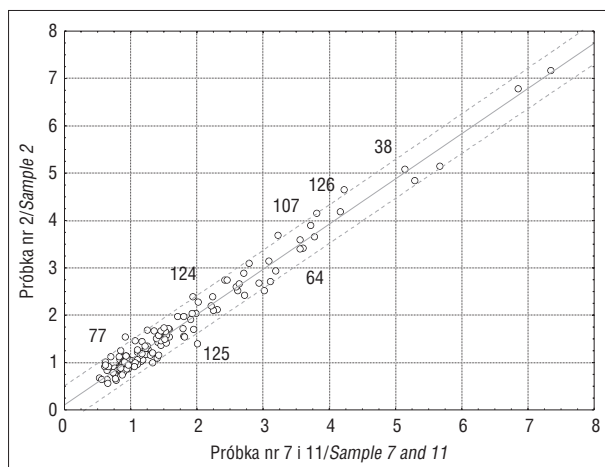
lejnym etapie syntetyzowano cRNA — wyznakowane biotyną (reakcja transkrypcji in vitro, Enzo kit). Biotynylowany cRNA został pofragmentowany, a następnie zhybrydowany z mikromacierzą Test3 oraz HG_U133A (Affymetrix) i znakowany kompleksem streptawidyna–fikoerytryna. Intensywność fluorescencji była analizowana przy użyciu skanera GeneArray Scanner G2500A. Analizę otrzymanych wyników przeprowadzono z wykorzystaniem programów MicroArray Suite 5.0 i Data Mining Tool (Affymetrix).

Analiza statystyczna

Spośród 22 283 transkryptów, których aktywność transkrypcyjną można analizować z zastosowaniem mikromacierzy oligonukleotydowej HG_U133A Affymetrix, wyszukano numery (tzw. ID) genów związanych z procesem apoptozy (141 transkryptów). Następnie przy udziale programu Cluster 3.0 porównano podobieństwo transkryptomów chorych metodą klasteryzacji hierarchicznej (aglomeracja z miarą Euklidesa), która pozwoliła podzielić badaną grupę na dwie podgrupy. W celu znalezienia genów różnicujących podgrupę zastosowano regresję liniową z 95-procentowym obszarem prognozy („kryterium statystyczne”). Za geny różnicujące uznano te, które znalazły się poza wyznaczonym w ten sposób rozmiarem.

Wyniki

Na podstawie metody klasteryzacji hierarchicznej wykazano, iż profil ekspresji badanych genów w próbce nr 2 odbiega od transkryptomów pozostałych próbek. Na podstawie krzywej regresji wykazano, że transkryptami różnicującymi są geny CASP4, PDCD8, BBC3, BIT1 oraz DIABLO, wykazujące nadekspresję w próbce nr 2, oraz geny TNFRSF1A i TNFRSF21, wykazujące niższą ekspresję w miokardium pozawałowym w odniesieniu do klasteryzujących wspólnie próbek 7 i 11 (ryc. 1 i tab. II).



Rycina 1. Krzywa regresji z 95-procentowym obszarem prognozy. Geny różnicujące oznaczono numerami. Opis w tabeli II
Figure 1. Regression curve with 95% prognosis area. Differentiating genes are marked with numbers as described in Table II

stranded cDNA (Invitrogen SuperScript Choice System). The next stage of the process was the synthesis of biotin-labelled cRNA (in vitro transcription, Enzo kit), which was subsequently fragmented and hybridised onto Test 3 and HG-U133A (Affymetrix) microarrays. Following that, streptavidine–phycoerythrin complex labelling was used; fluorescence intensity was measured with a GeneArray Scanner G2500A. A result analysis was carried out using MicroArray Suite 5.0 and Data Mining Tool (Affymetrix).

Statistical analysis

Among 22,283 transcripts whose activity can be analyzed using HG-U133A Affymetrix microarrays, apoptosis-associated gene IDs were searched for (141 transcripts). The similarity of the patients' transcriptomes was compared using hierarchical clusterisation (agglomeration including the Euclidean distance; Cluster 3.0), which resulted in dividing them into two subgroups. In order to identify the subgroup-differentiating genes, linear regression analysis was used with a 95% prognosis area (statistical criterion). Genes which were beyond the 95% prognosis area were considered as differentiating genes.

Results

Based on hierarchical clusterisation, it was demonstrated the profile of gene expression in specimen 2 was demonstrated to be different from that determined in the remaining specimens. Regression curves showed that CASP4, PDCD8, BBC3, BIT1 and DIABLO genes were overexpressed in sample 2, whereas TNFRSF1A and TNFRSF21 genes were showed to have lower expression in post-infarct myocardium than in specimens 7 and 11 (Figure 1 and Table II).

Discussion

The results of our study indicate that the profile of apoptosis-associated genes is significantly different in post-myocardial infarction (post-MI) myocardium compared to advanced CAD/non-MI myocardium and non-

Tabela II. Geny różnicujące
Table II. Differentiating genes

Nr No.	Gen ID Gene ID	Symbol Symbol	Nazwa Name
77	209310_s_at	CASP4	Caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase
125	218856_at	TNFRSF21	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21
38	205512_s_at	PDCD8	Programmed cell death 8 (apoptosis-inducing factor)
64	207643_s_at	TNFRSF1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
107	211692_s_at	BBC3	BCL2 binding component 3
124	218732_at	BIT1	Bcl-2 inhibitor of transcription
126	219350_s_at	DIABLO	Diablo homolog

Dyskusja

Wyniki niniejszego badania wskazują, iż profil ekspresji genów związanych z apoptozą jest wyraźnie różny w miokardium pozawałowym w porównaniu z miokardium chorego z przewlekłym niedokrwieniem oraz mięśniówką serca pacjenta bez choroby niedokrwiennej serca. Analiza klasteryzacji wykazała, że profile ekspresji genów apoptozy są bardziej jednorodnie u chorych, którzy nie przeżyli zawału (zaawansowana MIC i chory bez MIC), zaś transkryptom pacjenta po przeżytym zawale odbiega od tego profilu. Analiza transkryptów związanych z procesem apoptozy w pozawałowym sercu zwróciła uwagę na istotne znaczenie w tym procesie 7 z 141 analizowanych genów, z których 2 (geny z rodziny receptorów TNF α) wykazały w miokardium pozawałowym obniżoną aktywność, a pozostałe 5 — nadekspresję.

Jak zaznaczono we wstępie, proces apoptozy zaczyna się od otrzymania przez komórkę „rozkazu śmierci”, który implikuje dalsze przemiany wewnątrzkomórkowe prowadzące do jej degeneracji i obumarcia. Jednym z najważniejszych induktorów tego procesu jest TNF α . Czynnikiem ten działa poprzez rodzinę receptorów błonowych, które następnie aktywują wewnątrzkomórkowe białka TRADD (TNF receptor associated death domain protein) oraz TRAF (TNF receptor associated factor). Głównym efektem pobudzenia tych białek jest uruchomienie kaskady kaspaz — wewnątrzkomórkowych proteaz cysteinowych, odgrywających zasadniczą rolę w procesie apoptozy [3]. Pobudzenie receptora TNF α ma jednak również działanie przeciwnie — poprzez aktywację działającego antyapoptotycznego czynnika jądrowego NFkappaB [9]. Obserwowana w niniejszym badaniu obniżona aktywność dwu genów z rodziny receptorów TNF α : TNFRSF1A i TNFRSF21, jak również porównywalna aktywność genów kaspaz (poza nadekspresją kaspazy 4) sugerują, że TNF α -zależny mechanizm apoptozy indukcji apoptozy nie jest najistotniejszym w badanym materiale. Jednocześnie obniżona ekspresja TNFRSF1A może pośrednio sugerować, że antyapoptotyczne działanie TNF α zależne od aktywacji NFkappaB jest upośledzone. Wyniki badań eksperymentalnych nad udziałem TNF α w apoptozie niedokrwionych kardiomiocytów (prowadzonych na modelu zwierzęcym oraz na hodowlach) zdają się potwierdzać protekcyjne (antyapoptotyczne) działanie TNF α w tych komórkach [10, 11], aczkolwiek dostępne są również doniesienia eksponujące działanie proapoptotyczne [12].

Najważniejszą wewnątrzkomórkową kaskadą prowadzącą do apoptozy jest, jak wspomniano, układ kaspaz. Enzymy te stanowią podstawowy układ efektorowy dla bodźców proapoptotycznych, takich jak TNF α i Fas-L. Grupa enzymów obejmuje kilkanaście proteaz cysteinowych, klasyfikowanych w zależności od funkcji jako aktywatory apoptozy (kaspazy: 2, 8, 9, 10), enzymy wykonawcze (kaspaza 3, 6 i 7) oraz mediatory zapalne (m.in. kaspaza 1, 4 i 5) [5]. W piśmiennictwie opisano wzmożoną aktywność kaspaz w zawałowym miokardium [13]. Niektóre badania dowodzą jednak, że ich aktywacja jest silniejsza po reperfuzji niedokrwionego miokardium. Ponadto udowodniono, że *preconditioning* znacznie zmniejsza aktywa-

-ischemic myocardium. A clusterisation analysis revealed that expression profiles of the above-mentioned genes were more homogenous for advanced CAD/non-MI, and non-ischemic myocardium than for post-MI myocardium. An analysis of apoptosis-related genes in post-MI heart have revealed the importance of 7 of 141 assessed genes, out of which 2 (TNF α receptor family genes) showed underexpression, whereas the remaining 5 genes were overexpressed in post-MI myocardium.

As stated, apoptosis is initiated by an extracellular trigger which is a “kiss of death” for the target cell. The activation of membrane receptors launches intracellular cascades leading to the organized degradation of cell and finally to its death.

One of the most important inducers of apoptosis is Tumor Necrosis Factor α . TNF α acts via the family of membrane receptors which in turn activate TRADD proteins (TNF receptor associated death domain protein) and TRAFs (TNF receptor associated factor). This subsequently leads to activation of caspases, a family of intracellular cysteine proteases, which are the most important regulatory and effector enzymes in the process of apoptosis [3]. The effects of TNF α with regard to apoptosis are, however, twofold. Due to the activation of nuclear factor kappa B (NFkappaB) TNF α exert an antiapoptotic effect [9]. The diminished expression of TNF α receptor family genes TNFRSF1A i TNFRSF21, as well as no difference in the transcriptional activity of caspases (except for caspase 4) suggest that TNF α -induced apoptotic pathways do not play a significant role in studies of postinfarct myocardium. Moreover, decreased expression of TNFRSF1A may suggest that antiapoptotic action of TNF α (due to activation of NFkappaB) is diminished. Experimental studies (animal in vivo and cultured cardiomyocytes) on the role of TNF α in apoptosis of ischemic cardiomyocytes seem to confirm the protective (antiapoptotic) role of TNF α signaling [10, 11]. There is, nevertheless, some data to prove proapoptotic action of this cytokine in ischemic hearts [12].

Intracellular cascades of caspase family proteases are essential in the induction, transduction and amplification of the apoptotic signal. Caspases are intracellular effectors of such triggers as TNF α and Fas-L. The family consists of three subgroups, classified as activators (caspase 2, 8, 9, 10), executioners (caspase 3, 6 and 7) and inflammatory mediators (caspase 1, 4, 5 and more) [5]. Increased activity of caspases in post-MI myocardium has been reported in the literature [13]. Several studies, however, prove that caspase cascade activity is augmented particularly due to reperfusion of ischemic tissue. Moreover, ischemic preconditioning of the myocardium significantly attenuates caspase reaction to an ischemic stimulus [14, 15]. In the following study, gene expression of a caspase family member did not differ significantly between post-MI and non-MI samples, except for caspase 4, which is overexpressed in post-MI tissue. Caspase 4 belongs to the subfamily of inflammatory

cję kaspaz w trakcie niedokrwienia [14, 15]. W przeprowadzonym badaniu nie obserwowano istotnych odchyleń w ekspresji genów układu kaspaz, poza mniej istotną w mechanizmie apoptozy kaspazą 4, należącej do mediatorów zapalnych, których obecność w niedokrwionym miokardium może być usprawiedliwiona procesami naprawczymi. Brak ewidentnej aktywacji układu kaspaz może częściowo wynikać z obecności przewlekłego niedokrwienia poprzedzającego zawał oraz z faktu, iż był on (do czasu zabiegu chirurgicznego) leczony zachowawczo, a więc nie doszło do reperfuzji.

Poza procesami apoptozy zachodzącymi w cytoplazmie komórki kluczowe znaczenie dla apoptozy mają mitochondria. Organella te zawierają czynniki proapoptotyczne, takie jak cytochrom *c*, AIF (*apoptosis inducing factor*) czy DIABLO [16]. Ich uwolnienie z mitochondriów, a w konsekwencji indukcja apoptozy, mogą nastąpić na skutek zadziałania czynników proapoptotycznych, takich jak białko Bax czy Bak. Na straży tego procesu stoi jednak białko antyapoptotyczne Bcl-2. Jego działanie może być osłabione przez takie czynniki, jak BBC3 (białko wiążące bcl-2) i BIT1 (inhibitor transkrypcji bcl-2), których geny wykazały w prezentowanym badaniu nadekspresję. Jednocześnie analiza wykazała wzmożoną aktywność genu proapoptotycznego czynnika mitochondrialnego DIABLO oraz czynnika indukującego apoptozę PDCD8 (*programmed cell death 8*), uczestniczącego w degradacji DNA i mitochondriów. Dane te sugerują istotność procesów proapoptotycznych, zwłaszcza związanych z mitochondriami w badanym materiale. Podobne obserwacje, dotyczące głównie układów Bax i Bcl-2, są opisywane zarówno w eksperymentach na zwierzętach [17] hodowlach [18], jak u ludzi [19, 20].

Przeprowadzone badania mają charakter wstępny i wymagają potwierdzenia na większej grupie badanych oraz za pomocą referencyjnych metod oceny ilościowej ekspresji poszczególnych genów. Jednym z ograniczeń badania jest fakt, iż analizie poddana jest tkanka nie pochodząca bezpośrednio z obszaru zawałowego. Wiadomo jednak, że apoptoza w zawał dotyczy głównie kardiomiocytów na obrzeżach obszaru zawałowego oraz, w mniejszym stopniu, poza tym obszarem [1]. Mając te zastrzeżenia na uwadze, wyniki niniejszego eksperymentu sygnalizują jednak mechanizmy, które mogą mieć istotne znaczenie w patologii pozawałowego mięśnia sercowego, a ich dokładniejsze poznanie może przynieść konsekwencje terapeutyczne.

Wnioski

Profil ekspresji genów związanych z apoptozą jest znamienne różny w miokardium pozawałowym w porównaniu ze zdrową oraz przewlekle niedokrwioną mięśniewką serca.

W badanym materiale na uwagę zasługuje nadekspresja proapoptotycznych genów związanych z mitochondriami. Nie obserwowano natomiast istotnych różnic w ekspresji genów układu kaspaz, a 2 geny receptorów TNF α wykazały niższą ekspresję w tkance pochodzącej z serca pozawałowego.

mediating caspases and its activation may be justified by the reparative processes in post-IM hearts. The lack of significant activation of caspases in studied tissue may result from chronic ischemia that has preceded acute coronary syndrome. It can be additionally explained by the fact, that the patient was primarily treated with no coronary intervention, which would eventually lead to reperfusion — an important trigger of caspase activity.

Besides membrane and cytoplasmatic factors, mitochondria are a component of great importance in apoptosis. There are several proapoptotic factors enclosed in these organelles, such as cytochrom *c*, AIF (*apoptosis inducing factor*) and DIABLO [16]. Some cytoplasmatic factors (e.g. Bak and Bax) may lead to increased permeability of mitochondria and subsequently to the release of mitochondrial factors. To prevent such situations another cytoplasmatic factor, bcl-2 protein, is responsible for blocking cytoplasmatic proapoptotic proteins. The action of bcl-2 may be, however attenuated by, among others, BBC3 (*bcl-2 binding component*) and BIT1 (*bcl-2 transcription inhibitor*), whose genes displayed overexpression in our experiment. Additionally we have observed overexpression of the mitochondrial factor DIABLO and PDCD8 (*programmed cell death 8*), an inducer of apoptosis responsible for degradation of mitochondria and DNA. These data together suggest the significance of proapoptotic factors associated with mitochondria in study samples. Similar observations supporting the importance of mitochondria-related apoptotic pathways (mainly Bax and Bcl-2) have been made in both human [19, 20], and animal [17, 18], models.

The results represent only some of the mechanisms involved in post-MI apoptosis, and should certainly be considered as preliminary. Moreover, the results obtained represent the processes taking place in the myocardium of the atrium, which is not the proper infarcted area. It is known, however, that myocytes undergoing post-ischemic apoptosis are localized mainly in border zones of a recent infarction, and, to a lesser extend, remotely from the infarct site [1]. Considering the limitations, the data gained can still give an approximate insight into a problem which, if developed further, may lead to a better understanding of the pathology of myocardial infarction and carry potential therapeutic implications.

Conclusions

The profile of apoptosis-associated genes is significantly different in post-myocardial infarction (post-MI) myocardium compared to chronically ischemic and non-ischemic myocardium.

Moreover, our data suggest the importance of proapoptotic factors associated with mitochondria. Genes encoding cascade of caspases were undifferentiating, while 2 genes encoding TNF α receptors were under-expressed in post-infarction tissue.

Piśmiennictwo (References)

1. Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M *et al.* Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* 1997; 95: 320–323.
2. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res.* 2000; 45: 58–37.
3. Kuwano K, Hara N. Signal transduction pathways of apoptosis and inflammation induced by the tumor necrosis factor receptor family. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000; 22: 147–149.
4. Nagata S. Fas-induced apoptosis. *Intern Med.* 1998; 37: 179–181.
5. Fan TJ, Han LH, Cong RS *et al.* Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2005; 37: 719–727.
6. Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med.* 2003; 7: 249–257.
7. Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis — the p53 network. *J Cell Sci.* 2003; 116: 4077–4085.
8. Cross TG, Scheel-Toellner D, Henriquez NV *et al.* Serine/threonine protein kinases and apoptosis. *Exp Cell Res.* 2000; 256: 34–41.
9. Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV *et al.* MAP3K-related kinase involved in NFκB induction by TNF, CD95, and IL-1. *Nature* 1997; 385: 540–544.
10. Kurrelmeyer KM, Michael LH, Baumgarten G *et al.* Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci.* 2000; 97: 5456–5461.
11. Bergmann MW, Loser P, Dietz R *et al.* Effect of NF-kappa B inhibition on TNF-alpha-induced apoptosis and downstream pathways in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2001; 33: 1223–1232.
12. Krown KA, Page MT, Nguyen C *et al.* Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes. Involvement of the sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death. *J Clin Invest.* 1996; 98: 2854–2865.
13. Roy S, Khanna S, Kuhn DE *et al.* Transcriptome analysis of the ischemia-reperfused remodeling myocardium: temporal changes in inflammation and extracellular matrix. *Physiol Genomics* 2006; 25: 364–374.
14. Piot CA, Martini JF, Bui SK *et al.* Ischemic preconditioning attenuates ischemia/reperfusion-induced activation of caspases and subsequent cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase in rat hearts in vivo. *Cardiovasc Res.* 1999; 44: 536–542.
15. Yaoita H, Ogawa K, Maehara K *et al.* Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation* 1998; 97: 276–281.
16. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N *et al.* Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397: 441–446.
17. Cheng W, Kajstura J, Nihahara JA *et al.* Programmed myocyte cell death affects the viable myocardium after infarction in rats. *Exp Cell Res.* 1996; 226: 316–327.
18. Akao M, Ohler A, O'Rourke B *et al.* Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels inhibit apoptosis induced by oxidative stress in cardiac cells. *Circ Res.* 2001; 88: 1267–1275.
19. Misao J, Hayakawa Y, Ohno M *et al.* Expression of bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, and Bax, an accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human hearts with myocardial infarction. *Circulation* 1996; 94: 1506–1512.
20. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74: 609–619.

Adres do korespondencji (Address for correspondence):

Dr med. Józefa Dąbek
Katedra i Klinika Kardiologii Wydziału Opieki Zdrowotnej Śląskiej Akademii
Medycznej
ul. Ziołowa 47, 40–635 Katowice
tel./faks: (032) 252–74–07

Praca wpłynęła do Redakcji: 21.09.2006 r.