

'Nuclear factor kappa B' in perifere leukocyten is verhoogd bij patiënten met ischemie-reperfusieschade

E.M.L. SMETS¹, V.A.W.M. UMANS², R.W.M. HAUTVAST², J. OOMES¹, M. CHEVALLIER¹, M.F.M. van STIJN³ en A.P.J. HOUDIJK³

Tijdens oxidatieve fosforylering wordt zuurstof gedeeltelijk gereduceerd tot onschadelijke producten; een klein gedeelte van deze zuurstof wordt echter omgezet in reactieve zuurstofradicalen. Dit proces vindt voortdurend in beperkte mate plaats in het lichaam. In normale omstandigheden is er evenwicht tussen de 'scavenging'-mechanismen voor zuurstofradicalen en de productie ervan. Als dat evenwicht verstoord wordt en er meer zuurstofradicalen geproduceerd worden dan er onschadelijk gemaakt kunnen worden, spreken we van oxidatieve stress; een situatie met een overmaat aan radicalen die schade aan diverse celcomponenten tot gevolg heeft.

Van een groot aantal acute en chronische aandoeningen is aangetoond dat zij gepaard gaan met verhoogde oxidatieve stress (1), waarbij zuurstofradicalen zowel schade veroorzaken aan weefsels als dat zij het gevolg zijn van deze schade. Meting van oxidatieve stress zou daarom gebruikt kunnen worden om weefselschade en/of de reactie daarop in kaart te brengen.

Transcriptiefactor 'nuclear factor kappa B' (NFκB) speelt een sleutelrol in de reactiecascade geïnitieerd door oxidatieve stress (2). Expressie is verhoogd bij oxidatieve stress, o.a. in skeletspier (3, 4). Spierbiopten lenen zich echter niet tot veelvuldige afname; monitoren van de mate van oxidatieve en/of fysiologische stress via meting van NFκB in perifere leukocyten, middels eenvoudige venapunctie te verkrijgen, is mogelijk een patiëntvriendelijker alternatief.

Omdat messenger-RNA (mRNA) sneller geïnduceerd wordt dan het overeenkomstige eiwit, de amplitude van de inductie meestal groter is en NFκB een intracellulair eiwit is dat niet gesecreteerd wordt, gaat de voorkeur uit naar meting van het messenger-RNA van NFκB in perifere leukocyten.

Reperfusie na myocardinfarct leidt tot verhoogde oxidatieve stress en een inflammatoire respons (5-7). Daarom hebben we bij patiënten met een myocardinfarct (AMI), die behandeld worden met percutane coronaire interventie (PCI), de invloed van oxidatieve stress en inflammatoire respons op mRNA-expressie van NFκB in perifere leukocyten onderzocht.

Methoden en materialen

Negen patiënten met een AMI werden na schriftelijke toestemming geïnccludeerd. AMI werd als volgt gedefinieerd: (i) symptomen van myocardinfarct die minimaal 30 minuten aanhouden en niet verdwijnen met aspirine, heparine of nitroglycerine; (ii) gelijktijdige verhoging van het ST-segment van meer dan 1 mm (0,1mV) bij twee of meer ECG's en (iii) concentratie cardiaal troponine-I (cTnI) is hoger dan de afkapwaarde 10 uur na optreden van de symptomen. Om een reïnfarct uit te sluiten, werden patiënten waarvan de concentratie cTnI bij binnenkomst hoger was dan de afkapwaarde, niet geïnccludeerd. Bloed werd afgenomen bij binnenkomst in het ziekenhuis en 10, 16 en 24 uur na optreden van de symptomen. PCI werd zo snel mogelijk na opname uitgevoerd.

Het bloed werd afgenomen in PAXgene™ Blood RNA Tubes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) en onmiddellijk ingevroren. RNA werd uit volbloed geïsoleerd met het PAXgene™ Blood RNA System (Qiagen, Valencia, CA) zoals beschreven in de bijsluiters. 'Copy'-DNA werd vervolgens overgeschreven uitgaande van ongeveer 50 ng RNA met random hexameren en Taqman Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA) volgens de richtlijnen in de bijsluiters.

β-glucuronidase (GUSB) en NFκB werden gekwantificeerd met Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) en zelf ontworpen primers en probes. Alle analyses werden uitgevoerd op een Applied Biosystems 7500-systeem. De ΔΔCt-methode werd gebruikt voor relatieve kwantificatie met GUSB als referentiegen en het gemiddelde van twee normale patiënten als kalibrator (8).

Tabel 1. Messenger-RNA-expressie van NFκB bij patiënten met acuut myocardinfarct op verschillende momenten na percutane coronaire interventie (PCI) vergeleken met de waarde bij binnenkomst voor PCI (Wilcoxon rank test).

*: Significant verschil (p<0,05).

Tijd na symptomen (u) (gem.± S.D.)	tijd na PCI (u) (gem.± S.D.)	mRNA NFκB in leukocyten (gem.± S.D.)	P
3,0 ± 1,4	n.v.t.	1,32 ± 0,37	n.v.t.
9,8 ± 1,1	6,7 ± 1,8	1,54 ± 0,35	0,069
16,1 ± 1,1	13,0 ± 1,4	1,74 ± 0,39	0,011*
23,3 ± 1,8	20,2 ± 2,0	1,72 ± 0,39	0,051

Laboratorium voor Klinische Chemie, Hematologie en Immunologie¹, Afdeling Cardiologie², Afdeling Chirurgie³, Medisch Centrum Alkmaar, Alkmaar

Omdat de expressie van NFκB niet normaal verdeeld was (Kolmogorov-Smirnov-test), werden de resultaten op de verschillende tijdstippen na PCI met een gepaarde Wilcoxon Signed Rank Test vergeleken met de resultaten voor PCI.

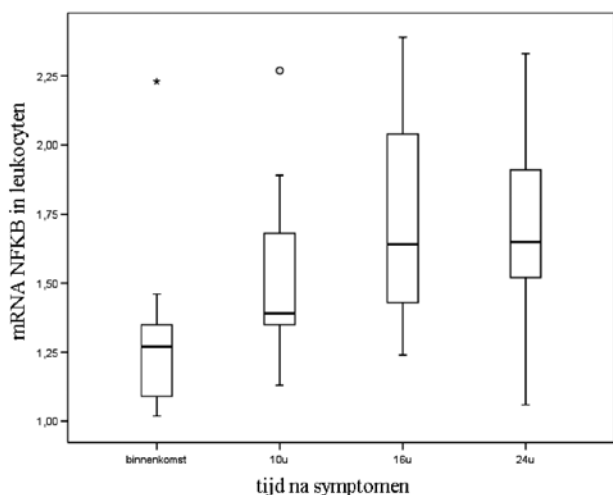
Resultaten

Patiënten kwamen 3,0±1,4 uur (gemiddelde ±S.D.) na begin van de symptomen binnen. De eerste bloedafname vond plaats bij binnenkomst, voor PCI. We vonden een trend naar verhoogde NFκB-expressie in leukocyten bij de eerste bloedafname na PCI, ongeveer 10 uur na optreden van symptomen, of ook 7 uur na PCI (zie tabel 1 en figuur 1). Expressie van NFκB was significant verhoogd 16 uur na optreden van symptomen, of 13 uur na PCI. Bij afname 24 uur na symptomen is er nog steeds een trend naar verhoogde expressie van NFκB, maar deze is niet significant.

Discussie

Veel acute en chronische aandoeningen zijn geassocieerd met een verhoogde oxidatieve stress met schade aan nucleïne-zuren, eiwitten en lipiden als gevolg. Meting van oxidatieve stress zou daarom nuttig kunnen zijn in het volgen van het ziekteverloop of de reactie op antioxidatieve therapie.

Biochemische reactieproducten van de cascade geïnitieerd door oxidatieve stress, zoals malondialdehyde en F2-isoprostanen, worden gebruikt als markers voor oxidatieve stress. Hoewel de gemiddelde waarden in groepen met en zonder verhoogde stress vaak verschillen, is het discriminerend vermogen om individuele patiënten met oxidatieve stress te identificeren vaak onvoldoende (9-12). Reperfusie na ischemie is geassocieerd met verhoogde oxidatieve stress en een inflammatoire respons, aantoonbaar in perifere bloed: verhoogde concentraties na reperfusie werden ook ge-



Figuur 1. Boxplots van de mRNA-expressie van NFκB bij patiënten met acuut myocardinfarct bij binnenkomst in het ziekenhuis en de waarden na Percutane Coronaire Interventie (PCI): 10 uur na optreden van symptomen (10u), 16 uur na symptomen (16u) en 24 uur na symptomen (24u). Uitbijters (°) zijn waarden die tussen 1,5 en 3 interkwartiele ranges (IQR's) van het uiteinde van de box verwijderd zijn, extreme waarden (*) zijn meer dan 3 IQR's van het uiteinde van de box verwijderd.

vonden voor malondialdehyde (5), 'soluble vascular cell adhesion molecule-1' (13), 8-iso-prostaglandine-F2α (6, 7) en 'high sensitive' CRP (6). Wij hebben mRNA-expressie van NFκB onderzocht in leukocyten bij patiënten met reperfusie na myocardische ischemie omdat NFκB een cruciale rol speelt en de expressie ervan verhoogd is bij oxidatieve stress (3, 4, 14). Bij patiënten met PCI na AMI vonden we 16 uur na optreden van symptomen, of ook 13 uur na PCI, significant verhoogde NFκB-expressie vergeleken met de waarde voor PCI. Bij afname 10 en 24 uur na symptomen was er een trend naar verhoogde expressie die echter niet significant was. Wat de bron is van oxidatieve stress/inflammatie bij deze patiënten, is niet duidelijk. Bij ischemie-reperfusiepatiënten zijn er aanwijzingen voor verhoogde oxidatieve stress en inflammatie in het myocard (15) en voor systemische endotheelactivatie (13, 16).

Selectieve PCI zonder voorafgaand AMI is ook geassocieerd met verhoogde oxidatieve stress vergeleken met de uitgangswaarde voor de ingreep (7). Het is daarom niet waarschijnlijk dat de verhoogde oxidatieve stress enkel te wijten is aan de verhoogde oxidatieve stress ten gevolge van het myocardinfarct. Wel was de bestudeerde groep beperkt tot slechts 9 patiënten; bevestiging van deze resultaten met grotere aantallen is dus nodig. Ook zal de waarde van deze parameter onderzocht worden bij andere aandoeningen en zal NFκB-expressie vergeleken worden met de reeds beschreven markers voor oxidatieve stress. Expressie van NFκB in perifere leukocyten in functie van oxidatieve stress is niet eerder beschreven. De resultaten zijn veelbelovend en nodigen uit tot verder onderzoek.

Referenties

- Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 2006; 52: 601-23.
- Macdonald J, Galley HF, Webster NR. Oxidative stress and gene expression in sepsis. *Br J Anaesth* 2003; 90: 221-32.
- Kefaloyianni E, Gaitanaki C, Beis I. ERK1/2 and p38-MAPK signalling pathways, through MSK1, are involved in NF-κB transactivation during oxidative stress in skeletal myoblasts. *Cell Sign* 2006; 18: 2238-51.
- Zhou LZ, Johnson AP, Rando TA. NF-κB and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 1405-16.
- Bhakuni P, Chandra M, Misra MK. Oxidative stress parameters in erythrocytes of post-reperfused patients with myocardial infarction. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2005; 20: 377-81.
- Berg K, Jynge P, Bjerre K, Skarra S, Basu S, Wiseth R. Oxidative stress and inflammatory response during and following coronary interventions for acute myocardial infarction. *Free Radic Res* 2005; 39: 629-36.
- Berg K, Wiseth R, Bjerre K, Brurok H, Gunnes S, Skarra S et al. Oxidative stress and myocardial damage during elective percutaneous coronary interventions and coronary angiography. A comparison of blood-borne isoprostane and troponin release. *Free Radic Res* 2004; 358: 517-25.
- Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaffl MW. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Letters* 2006; 28: 1601-13.

9. Bir LS, Demir S, Rota S, Kaseoglu M. Increased serum malondialdehyde levels in chronic stage of ischemic stroke. *Tohoku J Exp Med* 2006; 208: 33-9.
10. Hozawa A, Ebihara S, Ohmori K, Kuriyama S, Ugajin T, Koizumi Y et al. Increased plasma 8-isoprostane levels in hypertensive subjects: the Tsurugaya Project. *Hypertens Res* 2004; 27: 557-61.
11. McGrath LT, McGleenon BM, Brennan S, McColl D, McILroy S, Passmore AP. Increased oxidative stress in Alzheimer's disease as assessed with 4-hydroxynonenal but not malondialdehyde. *QJM* 2001; 94: 485-90.
12. Templar J, Kon SP, Milligan TP, Newman DJ, Raftery MJ. Increased plasma malondialdehyde levels in glomerular disease as determined by a fully validated HPLC method. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 946-51.
13. Gasparetto C, Malinverno A, Culacciati D, Gritti D, Prosperini PG, Specchia G et al. Antioxidant vitamins reduce oxidative stress and ventricular remodeling in patients with acute myocardial infarction. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2005; 18: 487-496.
14. Aoi W, Naito Y, Takanami Y, Kawai Y, Sakuma K, Ichikawa H et al. Oxidative stress and delayed-onset muscle damage after exercise. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 480-7.
15. Lefer DJ, Granger DN. Oxidative stress and cardiac disease. *Am J Med* 2000; 109: 315-23.
16. Nikolic-Heitzler V, Rabuzin F, Tatzber F, Vrkic N, Bulj N, Borovic S et al. Persistent oxidative stress after myocardial infarction treated by percutaneous coronary intervention. *Tohoku J Exp Med* 2006; 210: 247-55.