

# Activity of the kinin complex and increased proliferation of arterial intima in patients with generalized atherosclerosis operated on abdominal aortic aneurysm

**Aktywacja układu kinin i pobudzenie proliferacji komórek śródbłonka naczyniowego u pacjentów z wielopoziomową miażdżycą poddanych operacyjnemu leczeniu tętniaka aorty brzusznej**

Bogna Gabrylewicz<sup>1</sup>, Urszula Mazurek<sup>2</sup>, Andrzej Ochała<sup>1</sup>, Elektra Sliupkas-Dyrda<sup>2</sup>, Andrzej Pyrlík<sup>1</sup>, Piotr Garbocz<sup>1</sup>, Violetta Jaskuła<sup>1</sup>, Teresa Kowalewska-Twardela<sup>3</sup>, Krzysztof Ziaja<sup>3</sup>, Tadeusz Wilczok<sup>2</sup>, Michał Tendera<sup>1</sup>

<sup>1</sup>3<sup>rd</sup> Department of Cardiology, Medical University of Silesia, Katowice, Poland (III Katedra i Klinika Kardiologii Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach), <sup>2</sup>Department of Molecular Biology and Genetics, Medical University of Silesia, Sosnowiec, Poland (Katedra i Zakład Biologii Molekularnej i Genetyki Śląskiej Akademii Medycznej w Sosnowcu), <sup>3</sup>Department of General and Vascular Surgery, Medical University of Silesia, Katowice, Poland (Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyń Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach)

## Abstract

**Background.** Cellular proliferation plays an important role in the formation of neointima in the setting of coronary artery disease (CAD). Increased expression and acetylation of the H3 histone may be one of the pivotal factors in this process. The inflammatory response in acute coronary syndrome is associated with activation of the kininogen leading to increased production of bradykinin and expression of its receptors. The goal of our study was to evaluate the expression of mRNA for bradykinin BR1 and BR2 receptors, kallistatin (inhibitor of kallikrein) and H3 histone in samples of aortic intima in patients with generalized atherosclerosis operated on abdominal aortic aneurysms.

**Material and methods.** Fifty one patients (age  $63.0 \pm 6.7$  years) were enrolled. The total mRNA was isolated from tissue samples removed during surgical repair of aortic aneurysms. Quantitative RT-PCR technique was used to analyze the expression of mRNA for BR1, BR2, kallistatin and H3 histone. The results are expressed as the concentration of mRNA for the tested genes per 1  $\mu$ g of total mRNA (tmRNA). The expression of  $\beta$ -actin gene was used as the control.

**Results.** In all tissue samples, the expression of mRNA for BR1 and BR2 receptors was found. Subsequently, based on the relative level of expression, patients were divided into two groups: I — expression of BR2 < BR1 ( $n = 31$ ) and II — BR2 > BR1 ( $n = 20$ ). In group I, the mean number of BR1 mRNA copies was  $3325 \pm 754/\mu\text{g tmRNA}$  and in group II  $2426 \pm 267/\mu\text{g tmRNA}$  ( $p = \text{NS}$ ). The mean number of BR2 copies was  $818 \pm 131/\mu\text{g tmRNA}$  in group I and  $4021 \pm 456/\mu\text{g tmRNA}$  in group II ( $p < 0.001$ ). In group II there was also a higher number of mRNA copies for kallistatin ( $3634 \pm 204$  vs  $1198 \pm 968/\mu\text{g tmRNA}$ ;  $p < 0.0001$ ) and H3 histone ( $7795 \pm 532$  vs  $3869 \pm 366/\mu\text{g tmRNA}$ ;  $p = 0.0063$ ) in comparison to group I. The expression of gene encoding for  $\beta$ -actin was comparable in both groups. A positive correlation between the ratio of BR1/BR2 mRNA copies and number of mRNA copies for kallistatin ( $r = 0.6571$ ;  $p < 0.001$ ) and H3 histone ( $r = 0.3519$ ;  $p = 0.0131$ ) was found.

Address for correspondence (Adres do korespondencji):

Dr n. med. Bogna Gabrylewicz, III Katedra i Klinika Kardiologii Śl. AM  
 ul. Złotowa 45/47, 40–635 Katowice, Poland  
 tel/fax: + 48 (32) 252 39 30, e-mail: [bognagabrylewicz@poczta.onet.pl](mailto:bognagabrylewicz@poczta.onet.pl)

**Conclusion.** In tissue samples of aortic intima of patients with generalized atherosclerosis and aortic aneurysm the increased expression of bradykinin BR2 receptor is associated with the higher expression of kallistatin and H3 histone genes.

**Key words:** kinins, bradykinin receptors, H3 histone, atherosclerosis, QRT-PCR reaction, aorta aneurysm

### Streszczenie

**Wstęp.** Podstawowe znaczenie w etiopatogenezie i rozwoju miażdżycy odgrywa upośledzenie czynności śródbłonka naczyniowego. Aktywacja kininogenezy w odpowiedzi na czynnik zapalny powoduje wzrost produkcji bradykininy i jej metabolitów, co w konsekwencji prowadzi do nasilenia miejscowego procesu zapalnego. Aktywność proliferacyjną komórek śródbłonka ocenia się na podstawie ekspresji genów kodujących białka histonowe. Celem pracy była ocena ekspresji genów kodujących mRNA receptora bradykininowego BR1 i BR2 oraz kalistatyny i histonu H3 w ścianie aorty u pacjentów z wielopoziomową miażdżycą, leczonych operacyjnie z powodu tętniaka aorty brzusznej.

**Materiał i metody.** Do badania włączono 51 osób (średni wiek  $63,9 \pm 6,7$  roku) operowanych z powodu tętniaka aorty brzusznej. Materiałem badanym były fragmenty tętniaków aorty brzusznej wycinane w trakcie zabiegu operacyjnego, z których izolowano mRNA do dalszych badań genetycznych z wykorzystaniem reakcji QRT-PCR. Wszystkie wyniki porównywano z aktywnością transkrypcyjną genu dla  $\beta$ -aktyny stanowiącej kontrolę endogenną. Stężenie mRNA badanych genów przedstawiano w przeliczeniu na 1  $\mu$ g RNA.

**Wyniki.** We wszystkich badanych fragmentach tętniaków aorty stwierdzono obecność obu receptorów BR1 i BR2 w błonie wewnętrznej naczynia. Średnia liczba kopii mRNA BR2 w całej grupie badanej wynosiła  $2721 \pm 980$ , a BR1 —  $3040 \pm 449$ . Następnie w zależności od stosunku liczby kopii mRNA BR2 do BR1 pacjentów podzielono na dwie grupy: I (31 osób) —  $BR2:BR1 < 1,0$ ; II (20 osób) —  $BR2:BR1 > 1,0$ . Średnia liczba kopii mRNA receptora BR2 w grupie I wynosiła  $818 \pm 131$ , a w grupie II —  $4021 \pm 456$  ( $p < 0,001$ ). Średnia liczba kopii mRNA receptora BR1 w grupie I wynosiła  $3325 \pm 754$ , a w grupie II —  $2426 \pm 267$  (NS). Średnia liczba kopii mRNA kalistatyny w grupie I wynosiła  $1198 \pm 968$ , a w grupie II —  $3634 \pm 204$  ( $p < 0,0001$ ), zaś histonu H3: w grupie I —  $3869 \pm 366$ , a w grupie II —  $7795 \pm 532$  ( $p = 0,0063$ ). Średnie stężenie genu  $\beta$ -aktyny nie różniło się istotnie pomiędzy grupami i wynosiło: grupie I —  $11944 \pm 6463$ , a w grupie II —  $13710 \pm 1010$ . Ponadto stwierdzono dodatnią korelację między stosunkiem liczby kopii mRNA genów BR2 do BR1 a liczbą kopii mRNA genu kalistatyny ( $r = 0,6571$ ;  $p < 0,001$ ) oraz histonu H3 ( $r = 0,3519$ ;  $p = 0,0131$ ).

**Wnioski.** W śródbłonku naczyniowym fragmentów tętniaków aorty brzusznej zaobserwowano obecność obu receptorów bradykininowych BR1 i BR2. Zwiększeniu aktywności proliferacyjnej komórek śródbłonka naczyniowego ściany aorty towarzyszy wzrost ekspresji receptora bradykininowego BR2. Aktywacja kininogenezy i wzrost stężenia kalistatyny są istotnie większe w przypadku zwiększenia ekspresji receptora BR2 w porównaniu z BR1.

**Słowa kluczowe:** kininy, receptory bradykininowe, histon H3, miażdżycza, reakcja QRT-PCR, tętniak aorty

### Introduction

Previous studies have shown that the development of atherosclerosis is a complex process with multiple inflammatory and thrombotic mechanisms, as well as lipid disorders involved [1–3]. The endothelial dysfunction plays an important role in the progression of atherosclerosis. The most important factor influencing the paracrine activation of endothelium is shear stress. Mechanical activation of the endothelial cells induces a number of membrane receptors coupled with protein G

### Wstęp

W świetle dotychczasowych badań uważa się, że rozwój miażdżycy jest procesem złożonym, w którym biorą udział mechanizmy zapalne, zakrzepowe i lipidowe [1–3]. Podstawowe znaczenie w etiopatogenezie i rozwoju miażdżycy odgrywa upośledzenie czynności śródbłonka naczyniowego. Działanie śródbłonkowych mechanizmów regulujących prawidłowe funkcjonowanie układu krążenia jest procesem złożonym. Najważniejszym czynnikiem wpływającym na aktywa-

or other intracellular second-messenger systems [1]. Among the protein G-coupled receptors are bradykinin BR1 and BR2 receptors [4]. Both types can be detected on the same cells, however, different expression and pathophysiological effects of their activation is observed. Increased expression of BR1 is associated with chronic inflammatory response and BR2 activation may be detected in physiological conditions and in response to acute inflammatory factors [5]. Activation of the kinin synthesis secondary to the inflammatory factor stimulates the production of bradykinin and its metabolites and subsequently promotes local inflammatory processes [6]. Locally higher concentrations of bradykinin improve oxygenation and nutrition of cells and with participation of their growth factors stimulates the cell proliferation [7].

Recently published studies have demonstrated the presence of proliferation of endothelial and smooth muscle cells in patients with atherosclerosis and coronary artery disease [8–10]. Evaluation of proliferative activity of the endothelium is based on the measurement of expression of genes encoding histone proteins importantly influencing transcriptive and structural properties of chromatin [11]. H3 histone is considered a marker of cellular proliferation and was used as such in many studies because its biosynthesis occurs mainly in the S phase of the cellular cycle and is directly involved in DNA replication [9, 11].

Atherosclerosis is a generalized process leading to multiple organ damage. The development of abdominal aortic aneurysms resulting from atherosclerosis is promoted by the atherosclerotic plaque compression of the surrounding tissues, damaging the elastic fibers, promoting muscular atrophy and loss of elastic compliance [12]. Assuming the chronic inflammation is one of the factors triggering and promoting the development and progression of atherosclerosis, increased expression of BR1 bradykinin receptor and H3 histone in the endothelial cells of large and medium arteries is expected.

The aim of our study was to assess the expression of gene encoding for BR1 and BR2 receptors, kallistatin and H3 histone in the aortic wall of patients with generalized atherosclerosis operated on the abdominal aortic aneurysm.

## Material and methods

Fifty one patients aged  $63.9 \pm 6.7$  operated on abdominal aortic aneurysm were included in the study. The study material constituted the aortic tissue samples collected during the surgical repair. Isolation of mRNA encoding for BR1 and BR2 receptors, kallistatin and H3 histone from the tissue samples was performed.

cją czynności wydzielniczej śródbłonka jest działanie sił ścinających przepływającej krwi. Aktywacja mechaniczna komórek śródbłonka pobudza wiele różnych śródbłonkowych receptorów błonowych, działających za pośrednictwem białka G bądź innych przekaźników wewnątrzkomórkowych [1]. Jednym w wielu receptorów działających za pośrednictwem białka G są receptory dla bradykininy BR1 i BR2 [4]. Oba receptory występują w obrębie tych samych komórek, jednak ich ekspresja na powierzchni komórki i rola w organizmie jest odmienna. Wzrost ekspresji receptora BR1 towarzyszy przewlekłym procesom zapalnym, natomiast aktywacja receptora BR2 następuje w warunkach fizjologicznych oraz jako odpowiedź na ostry stan zapalny [5]. Aktywacja kininogenezy w odpowiedzi na czynnik zapalny powoduje wzrost produkcji bradykininy i jej metabolitów, co w konsekwencji powoduje nasilenie miejscowego procesu zapalnego [6]. Miejscowe podwyższenie stężenia bradykininy powoduje zwiększenie utlenowania i odżywienia komórek, a przy współdziałaniu innych czynników wzrostu stymuluje ich proliferację [7].

Wyniki przeprowadzonych ostatnio badań wykazały obecność zmian proliferacyjnych komórek śródbłonka naczyniowego i komórek mięśni gładkich ściany naczyniowej u chorych z miażdżycą i chorobą wieńcową [8–10]. Aktywność proliferacyjną komórek śródbłonka oceniana się na podstawie ekspresji genów kodujących białka histonowe, które odgrywają kluczową rolę w transkrypcyjnych i strukturalnych właściwościach chromatyny [11]. Histon H3 jako marker proliferacji został wykorzystany w wielu badaniach, gdyż jego biosynteza odbywa się głównie w fazie S cyklu komórkowego i jest bezpośrednio związana z replikacją DNA [9, 11].

Miażdżycę jako proces ogólnoustrojowy jest źródłem wielonarządowych powikłań. Rozwój tętniaków aorty brzusznej o etiologii miażdżycowej jest wynikiem ucisku przez blaszkę miażdżycową powstającą w ścianie aorty na otaczające ją elementy ściany tętnicy, co w konsekwencji powoduje uszkodzenie włókien elastycznych, zanik warstwy mięśniowej i utratę właściwości odwracalnego odkształcania ściany tętnicy [12]. Przyjmując przewlekły stan zapalny jako jeden z elementów sprzyjających rozwojowi i progresji miażdżycy, należy się spodziewać wzrostu ekspresji receptora bradykininowego BR1 oraz histonu H3 w śródbłonku naczyniowym dużych i małych tętnic.

Celem pracy była ocena ekspresji genów kodujących mRNA receptora bradykininowego BR1 i BR2 oraz kallistatyny i histonu H3 w ścianie aorty u pacjentów z uogólnioną miażdżycą, leczonych operacyjnie z powodu tętniaka aorty brzusznej.

The tissue samples were collected during the surgical procedure and stored in sterile containers at  $-70^{\circ}\text{C}$ . The samples of intima from aortic aneurysm were isolated for molecular analysis. RNA extraction was performed using a modified method of Chomczynski (Total RNA Prep Plus, A&A Biotechnology, catalogue number 031). The RNA obtained was used as a template for QRT-PCR reaction in quantitative analysis of selected mRNA for the examined genes.

QRT-PCR reaction was performed as a one-stage procedure using a sequence detector ABI PRISM™ 7700. The analysis was conducted in the following solution:  $1 \times$  TaqMan Perkin Elmer PCR buffer containing fluorochrome, providing adequate background for the fluorescence measurements performed after each thermal cycle,  $1 \times$  amplifier, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.5 mM  $\text{MnSO}_4$ , 200  $\mu\text{M}$  dATP, 200  $\mu\text{M}$  dTTP, 200  $\mu\text{M}$  dGTP, 200  $\mu\text{M}$  dCTP, 1–10 ng of total RNA, 5U Tth polimerase and 3  $\mu\text{M}$  of appropriate starters and 2  $\mu\text{M}$  of fluorochrome-labelled (FAM-6-carboxy-fluorescein and TAMRA-6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) probes. Simultaneously, samples of commercially available samples of  $\beta$ -actin gene in different concentrations (from  $1 \times 10^3$  to  $2 \times 10^4$ ) were amplified in three measurements (TaqMan Template Reagent and  $\beta$ -actin control reagent kit Applied Biosystems). The thermal conditions for amplification of selected genes were as follows:  $1 \times 95^{\circ}\text{C}$  — 10 min, 40 cycles:  $95^{\circ}\text{C}$  — 30 s,  $60^{\circ}\text{C}$  — 30 s, final elongation  $-72^{\circ}\text{C}$  for 10 min. The results obtained during amplification of five different concentrations of  $\beta$ -actine were used for standard curve in each analysis, required for automatic assessment of the number of examined genes cDNA copies by sequence detector ABI PRISM™ 7700. Beta-actine amplification in the examined samples served as quality control of the QRT-PCR reaction. Fluorescence measurement was performed after each amplification cycle and the number of cDNA copies in a sample was evaluated based on analysis of PCR reaction kinetics.

The sequence of nucleotide starters and probes was established using Primer Express™ ABI PRISM software, based on the sequence of examined genes derived from the GenBank database <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/irx/genbank>.

The specificity of QRT-PCR reaction was measured by electrophoresis in 6% poliacylamid gel using a DNA POINTER device (Kucharczyk TE, Poland) at a temperature of  $4^{\circ}\text{C}$  at 200 V. The total procedure time was 90 min. After electrophoresis was completed, the gel was stained with silver nitrate and the electrophoregrams obtained were analyzed using Biotec-Fisher electrophoresis documentation system and BAS SYS ID software.

## Materiał i metody

Do badania włączono 51 pacjentów poddanych operacyjnemu leczeniu tętniaka aorty brzusznej. Średni wiek badanych wynosił  $63,9 \pm 6,7$  roku. Materiałem badanym były fragmenty tętniaków aorty brzusznej, wycinane w trakcie zabiegu operacyjnego, natomiast docelowym materiałem badawczym — mRNA wyizolowane z tkanek, zawierające sekwencje nukleotydów dla receptorów bradykininowych BR1 i BR2, kalistatyny oraz histonu H3.

Fragmenty tkanek pobierano w trakcie zabiegu operacyjnego i przechowywano w jałowych pojemnikach w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$ . Z materiału tkankowego do oznaczeń molekularnych pobierano fragmenty błony wewnętrznej ściany tętniaka.

Do ekstrakcji RNA użyto zestawu, opierającego się na zmodyfikowanej metodzie Chomczyńskiego (Total RNA Prep Plus firmy A&A Biotechnology, nr katalogowy 031). Otrzymany kwas rybonukleinowy stanowił matrycę w reakcji QRT-PCR dla ilościowego oznaczenia wybranych fragmentów mRNA badanych genów.

Reakcję QRT-PCR prowadzono jednostopniowo, z zastosowaniem detektora sekwencji ABI PRISM™ 7700. Badania prowadzono w mieszaninie zawierającej:  $1 \times$  bufor TaqMan PCR Perkin Elmer (zawierający fluorochrom zapewniający odpowiednie tło dla pomiaru fluorescencji po każdym cyklu termicznym),  $1 \times$  wzmacniacz, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,5 mM  $\text{MnSO}_4$ , 200  $\mu\text{M}$  dATP, 200  $\mu\text{M}$  dTTP, 200  $\mu\text{M}$  dGTP, 200  $\mu\text{M}$  dCTP, 1–10 ng całkowitego RNA, 5U polimerazy Tth oraz po 3  $\mu\text{M}$  odpowiedniego startera i 2  $\mu\text{M}$  sondy wyznakowanej fluorochromami FAM-6-carboxy-fluorescein i TAMRA-6-carboxy-tetramethyl-rhodamine. Równocześnie z badanymi próbkami amplifikowano komercyjnie dostępny fragment genu  $\beta$ -aktyny w pięciu różnych stężeniach (od  $1 \times 10^3$  do  $2 \times 10^4$ ) w trzech powtórzeniach (TaqMan Template Reagent oraz  $\beta$ -actin control reagent kit Applied Biosystems). Warunki termiczne amplifikacji wybranych fragmentów genów były następujące:  $1 \times 95^{\circ}\text{C}$  — 10 min; 40 cykli:  $95^{\circ}\text{C}$  — 30 s,  $60^{\circ}\text{C}$  — 30 s; końcowa elongacja  $-72^{\circ}\text{C}$  — 10 min. Wyniki otrzymane podczas amplifikacji  $\beta$ -aktyny w 5 różnych stężeniach stanowiły podstawę do wykreślenia w każdej analizie krzywej standardowej, na podstawie której detektor sekwencji ABI PRISM™ 7700 automatycznie wyliczał liczbę kopii cDNA badanego genu w analizowanej próbce. Ampifikacja  $\beta$ -aktyny w badanych próbkach stanowiła kontrolę jakości reakcji QRT-PCR. Pomiaru fluorescencji dokonywano po każdym cyklu amplifikacji, a liczbę kopii cDNA w próbce wyliczano na podstawie analizy kinetyki reakcji PCR.

Sekwencję nukleotydów starterów i sond zaprojektowano, korzystając z programu komputerowego Pri-

## Statistical analysis

All numerical values were presented as mean values  $\pm$  standard deviation. The  $p$  value  $< 0.05$  was considered statistically significant. The  $\chi^2$  test was used to check if the distribution of the parameters was normal. For normally distributed values the  $t$ -Student test was used and for skewed distribution Mann-Whitney's  $U$  test was used. The Pearson test was used for analysis of correlations between tested parameters.

## Results

The obtained results allowed the analysis of the transcriptional activity of gene encoding for BR1 and BR2 bradykinin receptors to be performed, as well as kallistatin and H3 histone in study material and to compare the profile of the expression of the tested genes. All results were compared with the expression of  $\beta$ -actin gene constituting the endogenous control.

The results were expressed as the concentration of mRNA for tested genes per  $1 \mu\text{g}$  of total mRNA.

In all examined tissue samples, the presence of both BR1 and BR2 receptors in the intima of aortic aneurysms was found. The mean number of BR2 and BR1 receptor mRNA copies in all study groups was  $2721 \pm 980$  and  $3040 \pm 449$  respectively. The patients were subsequently divided into two groups based on the relative level of expression:

- group I — expression of BR2  $<$  BR1 ( $n = 31$ );
- group II — BR2  $>$  BR1 ( $n = 20$ ). In group I, the mean number of BR2; BR1 receptor mRNA copies was  $818 \pm 131$  and  $3325 \pm 754$  respectively (Table I). In group II, the mean number of BR2 and BR1 receptor mRNA copies was  $4021 \pm 456$  and  $2426 \pm 267$  respectively (Table I). A significantly higher

**Table I.** The number of mRNA bradykinin receptors BR1 and BR2 copies in examined samples of aortic aneurysm. The results are expressed as the concentration of mRNA for tested genes per  $1 \mu\text{g}$  of total mRNA

**Tabela I.** Liczba kopii mRNA receptora bradykininowego BR1 i BR2 we fragmentach tętniaków aorty. Stężenie RNA podano w przeliczeniu na  $1 \mu\text{g}$  RNA

	Receptor BR1	Receptor BR2
Group I Grupa I BR2/BR1 $<$ 1.0 n = 31	3325 $\pm$ 754	818 $\pm$ 131
p	NS	$<$ 0.0001
Group II Grupa II BR2/BR1 $>$ 1.0 n = 20	2426 $\pm$ 267	4021 $\pm$ 456

NS (non significant) — nieznamienna

mer Express™ ABI PRISM, na podstawie sekwencji badanych genów pochodzących z bazy danych GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/irx/genbank>).

Specyficzność reakcji QRT-PCR wyznaczano techniką elektroforezy w 6-procentowym żelu poliakrylamidowym z zastosowaniem aparatu DNA POINTER firmy Kucharczyk, w temperaturze  $4^\circ\text{C}$  przy napięciu 200 V. Czas trwania procesu wynosił 90 min. Po elektroforezie żel wybarwiano solami srebra, a otrzymane elektroforegramy analizowano w systemie dokumentacji żelowej firmy Biotec-Fisher w programie komputerowym BAS SYS ID.

## Analiza statystyczna

Wszystkie wartości liczbowe przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  odchylenie standardowe. W badaniach statystycznych stosowano poziom istotności  $p < 0,05$ . Za pomocą testu  $\chi^2$  sprawdzano, czy rozkład analizowanych parametrów jest zbliżony do normalnego. Jeśli potwierdzono hipotezę o rozkładzie normalnym, stosowano test  $t$ -Studenta dla zmiennych niepołączonych. W przypadku stwierdzenia, że rozkład analizowanych parametrów odbiega od normalnego, stosowano test  $U$  Manna-Whitney'a. Korelacje pomiędzy analizowanymi parametrami oceniano przy użyciu modelu Pearsona.

## Wyniki

Uzyskane wyniki pozwoliły na ocenę aktywności transkrypcyjnej genów kodujących receptor bradykininowy BR1 i BR2, kalistatynę i histon H3 w badanym materiale oraz przeprowadzenie analizy porównawczej profilu ekspresji badanych genów. Wszystkie wyniki porównano z aktywnością transkrypcyjną genu dla  $\beta$ -aktyny, stanowiącą w badaniu kontrolę endogenną.

Stężenie mRNA badanych genów przedstawiano w przeliczeniu na  $1 \mu\text{g}$  RNA.

We wszystkich badanych fragmentach tętniaków aorty stwierdzono obecność obu receptorów bradykininowych BR1 i BR2 w błonie wewnętrznej naczynia.

Średnia liczba kopii mRNA receptora BR2 w całej grupie badanej wynosiła  $2721 \pm 980$ , a receptora BR1 —  $3040 \pm 449$ . Następnie w zależności od stosunku liczby kopii mRNA genu BR2 do BR1 pacjentów podzielono na 2 grupy:

- grupa I (31 osób) — BR2:BR1  $<$  1,0 (przewaga kopii mRNA BR1);
- grupa II (20 osób) — BR2:BR1  $>$  1,0 (przewaga kopii mRNA BR2).

W grupie I średnia liczba kopii mRNA receptora BR2 wynosiła  $818 \pm 131$ , a receptora BR1 —  $3325 \pm 754$ , natomiast w grupie II odpowiednio  $4021 \pm 456$  i  $2426 \pm 267$  (tab. I).

number of mRNA copies for BR2 receptor were observed in group I ( $p < 0.0001$ ) and the number of mRNA copies for BR1 receptor was comparable in both groups. Secondly, the number of mRNA copies for kallistatin and H3 histone was evaluated. The mean number of mRNA genes for kallistatin in group I and II was:  $1198 \pm 968$  and  $3634 \pm 204$  respectively ( $p < 0.0001$ ) (Table II). The mean number of H3 histone genes in group I and II was:  $3869 \pm 366$  and  $7795 \pm 532$  respectively ( $p = 0.0063$ ) (Table II). The mean concentration of gene encoding for  $\beta$ -actin (endogenous control) was comparable in both groups, measuring  $11944 \pm 6463$  in group I and  $13710 \pm 1010$  in group II (Table II). There were a significantly higher number of mRNA copies of kallistatin gene and H3 histon in group II. A positive correlation between the ratio of BR1/BR2 mRNA copies and number of mRNA copies for kallistatin ( $r = 0.6571$ ;  $p < 0.001$ ) and H3 histone ( $r = 0.3519$ ;  $p = 0.01131$ ) was found. It is a proof that the increased number of mRNA copies for gene encoding for BR2 receptor and/or the decreased number of mRNA copies for gene encoding BR1 receptor within the wall of aortic aneurysm is accompanied by the increased expression of gene for kallistatin (Figure 1) and H3 histone (Figure 2).

## Discussion

The presence of both bradykinin receptors in the aortic wall intima signifies the evidence of local inflammatory process involved in atherosclerotic plaque, and consequently aneurysm formation. The increased concentrations of bradykinin at the site of tissue damage lead to up regulation of expression of appropriate BR1 and BR2 receptors, which may further promote the inflammatory response and stimulate a number of intracellular metabolic reactions. The activation of BR2 receptors occurs both in the physiological circumstances

Stwierdzono znamiennej statystycznie różnicę pomiędzy liczbą kopii mRNA receptora BR2 w grupie I i II ( $p < 0,0001$ ) oraz zbliżoną liczbę kopii receptora BR1 w obu podgrupach.

Następnie w obu podgrupach oceniano liczbę kopii mRNA genów kodujących kalistatynę i histon H3. Średnia liczba kopii mRNA genu kalistatyny wynosiła odpowiednio w grupie I:  $1198 \pm 968$ , a w grupie II:  $3634 \pm 204$  ( $p < 0,0001$ ) (tab. II).

Średnia liczba kopii genu histonu H3 wynosiła w grupie I:  $3869 \pm 366$ , a w grupie II:  $7795 \pm 532$  ( $p = 0,0063$ ) (tab. II).

Średnie stężenie genu  $\beta$ -aktyny (kontrola endogenna) nie różniło się istotnie pomiędzy grupami i wynosiło odpowiednio w grupie I:  $11944 \pm 6463$ , a w grupie II:  $13710 \pm 1010$ .

W grupie II stwierdzono istotnie większą liczbę kopii mRNA genów kalistatyny oraz histonu H3 niż w grupie I.

Ponadto zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy stosunkiem liczby kopii mRNA genów BR2 do BR1 a liczbą kopii mRNA genu kalistatyny ( $r = 0,6571$ ;  $p < 0,001$ ) oraz genu histonu H3 ( $r = 0,3519$ ;  $p = 0,0131$ ). Oznacza to, że wzrostowi liczby kopii mRNA receptora bradykininowego BR2 i/lub spadkowi liczby kopii mRNA BR1 w ścianie tętniaka towarzyszy wzrost ekspresji genu kalistatyny (ryc. 1) i histonu H3 (ryc. 2).

## Dyskusja

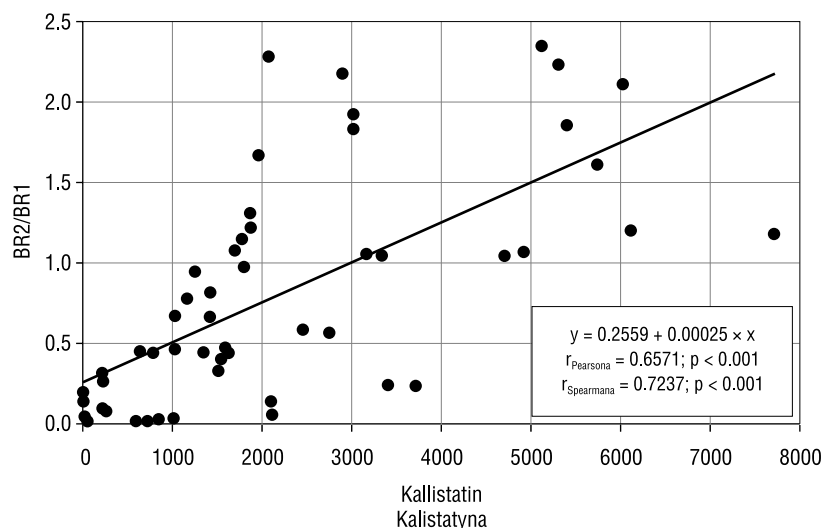
Stwierdzenie obu receptorów w błonie wewnętrznej ściany aorty wskazuje na obecność miejscowego procesu zapalnego towarzyszącego rozwojowi blaszki miażdżycowej, a w konsekwencji tętniaka. Wzrost stężenia bradykininy w miejscu uszkodzenia tkanki powoduje wzrost ekspresji odpowiednich receptorów BR1 i BR2, których aktywacja nasila miejscowy proces zapalny i stymuluje wiele komórkowych procesów metabolicznych. Ponieważ aktywacja receptora BR2 odbywa

**Table II.** The number of mRNA H3 histone, kallistatin and  $\beta$ -actin copies in examined samples of aortic aneurysm. The results are expressed as the concentration of mRNA for tested genes per  $1 \mu\text{g}$  of total mRNA. Group I ( $n = 31$ ) — BR2:BR1  $< 1.0$ ; group II ( $n = 20$ ) — BR2:BR1  $> 1.0$

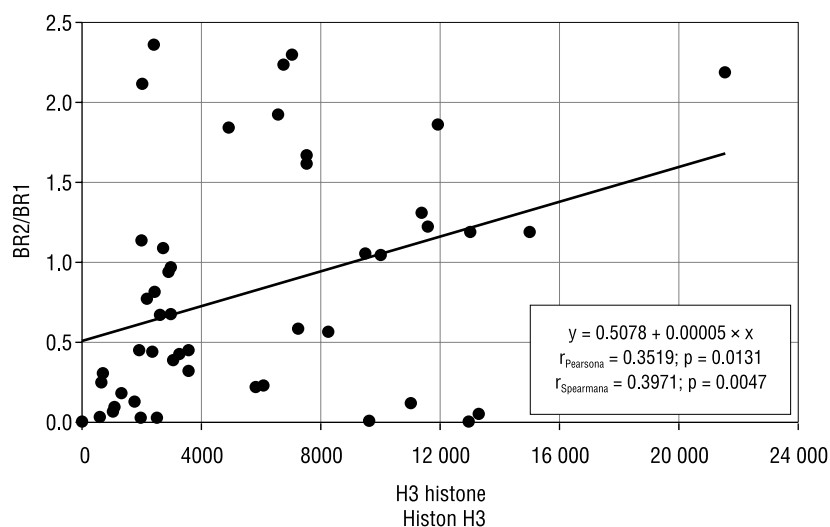
**Tabela II.** Liczba kopii mRNA histonu H3, kalistatyny i  $\beta$ -aktyny we fragmentach tętniaków aorty. Stężenie mRNA podano w przeliczeniu na  $1 \mu\text{g}$  RNA

	Kallistatin Kalistatyna	H3 histone Histon H3	$\beta$ -actin $\beta$ -aktyna
Group I Grupa I	$1198 \pm 968$	$3869 \pm 366$	$11944 \pm 6463$
p	$< 0.0001$	0.0063	NS
Group II Grupa II	$3634 \pm 204$	$7795 \pm 532$	$13710 \pm 1010$

NS (non significant) — nieznamienne



**Figure 1.** The correlation between the ratio of BR1/BR2 mRNA copies and number of mRNA copies for kallistatin  
**Rycina 1.** Korelacja pomiędzy stosunkiem receptora bradykininowego BR2/BR1 a stężeniem mRNA genu kalistatyny w śródbłonku badanych fragmentów tętniaków aorty brzusznej



**Figure 2.** The correlation between the ratio of BR1/BR2 mRNA copies and number of mRNA copies for H3 histone  
**Rycina 2.** Korelacja pomiędzy stosunkiem receptora bradykininowego BR2/BR1 a stężeniem mRNA genu histonu H3 w śródbłonku badanych fragmentów tętniaków aorty brzusznej

and in response to the inflammatory factors, therefore its presence in the studied material is obvious. The BR1 receptor, however, is expressed on normal cells in very small quantities. Its identification in the tissue samples of the abdominal aortic aneurysm signifies the presence of the inflammatory process associated with the aneurysm formation. The increased expression of BR1 receptor is caused by different forms of tissue injury and may be stimulated by some cytokines, endotoxins or bacterias [13]. BR1 receptor expression was assessed in rabbit aorta samples [13]. The authors found incre-

się zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i w odpowiedzi na stan zapalny oraz uszkodzenie tkanek, jego obecność w badanym materiale nie jest dyskusyjna. Receptor BR1 występuje natomiast w komórkach prawidłowych w śladowych ilościach. Stwierdzenie jego obecności w błonie wewnętrznej fragmentów tętniaków aorty brzusznej wskazuje na występowanie procesu zapalnego towarzyszącego rozwojowi tętniaka. Wzrost ekspresji receptora BR1 spowodowany jest między innymi przez niektóre typy uszkodzenia tkanek i może wzrastać pod wpływem działania niektórych cytokin,

ased synthesis of BR1 receptors in aortic smooth muscle cells in experimentally induced tissue damage after interleukin 1 (IL-1) and endothelial growth factor (EGF) administration [13]. Synthesis of BR1 receptor mRNA was preceded in this case by increased activity of mitogen activated protein (MAP) [13]. It is well established that bradykinin and its metabolites stimulate the proliferation of cells [7]. This process depends on improvement of perfusion and oxygen supply to cells subsequent to vasodilatory properties of bradykinin as well as on intracellular accumulation of cAMP and cGMP, leading to increased synthesis of DNA and cell division [14]. It is not clear which type of bradykinin receptors play the most important part in cellular proliferation. Some claim BR1 receptor activation influences DNA synthesis indirectly [15]. Others found BR2 receptors to be responsible for mitogenesis activation and cellular growth [16]. In our study, an increased expression of BR2 receptors was associated with increased expression of H3 histon mRNA confirming the proliferative processes taking place in the aneurysm wall. The expression of gene for H3 histon was frequently used by other authors for cellular proliferation assessment [8–11, 17]. The significant release of H3 histon mRNA in the S phase of the cell cycle and its decrease 2 hours after the S phase is finished proves the role H3 histon plays in cell division [9, 17]. The proliferation observed during vascular wall remodelling in response to extracellular matrix proteins accumulation is pivotal for the development of atherosclerotic plaque, as well as for restenosis mechanism [9]. O'Brien et al [9] demonstrated the evidence of proliferation both in primary atherosclerotic plaques and at site of restenosis in tissue samples collected during the atherectomy of coronary arteries. Similar studies were conducted by Veinot et al [10], showing evidence of proliferation of both smooth muscle cells and macrophages in tissue samples collected from coronary arteries of patients with stable and unstable angina.

The process of kininogenesis depends on the presence of tissue kallikrein responsible for the release of bradykinin from low molecular kininogen. Kallistatin evaluated in our study is the tissue kallikrein inhibitor. Inflammation being one of the factors promoting the progression of atherosclerosis, activates kininogenesis, increasing the concentration of tissue kallikrein. The half-life of the kallikrein-kallistatin complex is significantly longer than kallikrein itself, therefore it is suspected that kallistatin may regulate the bioavailability and catabolism of tissue kallikrein [18]. Our study showed the increased number of BR2 receptors is associated with the increased expression of kallistatin gene. The elevated concentrations of kallistatin in tissues proves the activa-

endotoksyn czy bakterii [13]. Larivee i wsp. [13] badali ekspresję receptora bradykininowego BR1 we fragmentach pierścienia aorty króliczej. Autorzy w doświadczalnie wywołanym uszkodzeniu tkanki stwierdzili wzrost syntezy receptora BR1 w komórkach mięśni gładkich aorty króliczej pod wpływem interleukiny 1 i nabłonkowego czynnika wzrostu (EGF) [13]. Pobudzenie syntezy mRNA BR1 było poprzedzone w tym przypadku wzrostem aktywności białka mitogenowego (MAP) [13]. Obecnie wiadomo, że bradykinina i jej metabolity za pośrednictwem receptorów pobudzają proliferację wielu komórek [7]. Wzrost aktywności proliferacyjnej komórek zależy od poprawy utlenowania i odżywienia komórek dzięki naczyniorozszerzającym właściwościom bradykininy oraz poprzez wpływ na wewnątrzkomórkową akumulację cyklicznego AMP i GMP, co prowadzi do wzrostu syntezy DNA i podziału komórki [14]. Zdania badaczy na temat roli poszczególnych receptorów w proliferacji komórek są podzielone. Część autorów uważa, że aktywacja receptora BR1 wpływa pośrednio na syntezę DNA komórkowego [15]. Inni natomiast stwierdzili, że za aktywację mitogenezy i wzrost komórek potencjalnie odpowiedzialny jest receptor BR2 [16]. Według autorów niniejszej pracy wzrostowi ekspresji mRNA receptora BR2 towarzyszy wzrost ekspresji mRNA histonu H3, co świadczy o obecności zmian proliferacyjnych w ścianie tętniaka. Ekspresję genu histonu H3 do oceny proliferacji komórkowej wykorzystują często inni autorzy [8–11, 17]. Istotny wzrost mRNA histonu H3 w fazie S cyklu komórkowego i spadek po 2 godzinach od zakończenia fazy S świadczy o roli, jaką odgrywa histon H3 w podziale komórki [9, 17]. Udział procesów proliferacyjnych w remodelingu ściany naczyniowej w odpowiedzi na nagromadzenie białek macierzy zewnątrzkomórkowej ma istotne znaczenie w rozwoju pierwotnej blaszki miażdżycowej oraz w mechanizmie restenozy [9]. O'Brien i wsp. [9] wykazali obecność zmian proliferacyjnych zarówno w pierwotnych blaszkach miażdżycowych, jak i w miejscu restenozy w materiale tętnic wieńcowych pobranych za pomocą aterektomii. Podobne badania przeprowadzili Veinot i wsp. [10], stwierdzając w materiale pobranym z tętnic wieńcowych pacjentów ze stabilną i niestabilną chorobą wieńcową obecność proliferacji komórek mięśni gładkich i makrofagów.

Proces kininogenezy w tkankach zależy od obecności enzymu kallikreiny tkankowej, której rola polega na odszczepianiu od kininogenu niskocząsteczkowego bradykininy. Inhibitorem kalikreiny tkankowej jest oznaczana w niniejszych badaniach kalistatyna. Proces zapalny, będący jednym z czynników sprzyjających rozwojowi i progresji miażdżycy, aktywuje proces kininogenezy,



tion of kinin complex in response to inflammatory processes within the aortic wall. Our results signify that activation of kinin complex and extensive cellular proliferation is present within the vascular endothelium in the setting of generalized atherosclerosis.

### Conclusions

This study confirmed the presence of both types of bradykinin receptors, BR1 and BR2, in the endothelium of the abdominal aortic aneurysm samples. It is associated with the proliferative activity of the endothelial cells found in the aneurysm wall. Increased endothelial proliferation is related to higher transcriptive activity of the BR2 bradykinin receptor gene. Proliferative activity of the kallistatin gene is increased proportionally to the elevated concentrations of mRNA of the BR2 bradykinin receptor.

### References

1. Chłopicki S, Gryglewski RP (2002) Farmakologia śródbłonna. *Kardiologia Pol*, 57: 5–15.
2. Libby P, Ridker PM, Maseri A (2002) Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 105: 1135–1143.
3. Libby P (2002) Prawdziwe oblicze miażdżycy. *Świat Nauki*, 7: 27–35.
4. Figueroa CF, Marchant A, Novoa U, Forstermann U, Jarnagin K, Scholkens B, Muller-Esterl W (2001) Differential distribution of bradykinin B2 receptors in the rat and human cardiovascular system. *Hypertension*, 37: 110–120.
5. Hall JM (1997) Bradykinin receptors. *Gen Pharmac*, 28: 1–6.
6. Dray A, Perkins M (1993) Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Neurosci*, 16: 99–104.
7. Walsh DA, Fan T-PD (1997) Bradykinin as a growth factor. In: *The Kinin System. The Handbook of Immunopharmacology*. The Academic Press, Amsterdam: 301–314.
8. Kawahara K, Watanabe S, Ohshima T et al (1999) Hyperacetylation in atherosclerotic lesions and activated vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 266: 417–424.
9. O'Brien ER, Urieli-Shoval S, Garvin MR et al (2000) Replication in restenotic atherectomy tissue. *Atherosclerosis*, 152: 117–126.
10. Veinot JP, Ma X, Jelley J, O'Brien ER (1998) Preliminary clinical experience with the pullback atherectomy catheter and the study of proliferation in coronary plaques. *Can J Cardiol*, 14 (12): 1457–1463.
11. Paul M, Mazurek U, Witek A, Graniczka M, Wilczok T (2001) Ekspresja mRNA histonu H3 jako marker aktywności proliferacyjnej komórek w rozroście prostym endometrium. *Gin Pol*, 72: 1434–1438.
12. Gacko M (2001) Tissue and plasmatic haemostatic system in aortic aneurysm. *Postępowanie Nauk Medycznych*, 2: 1–11.
13. Larivee JF, Bachvarov DR, Houle F, Landry J, Hout J, Matceau F (1998) Role of the mitogen-activated protein

kinases in the expression of the kinin B1 receptors induced by tissue injury. *J Immunol*, 160: 1419–1426.

zwiększając tym samym stężenie kallikreiny tkankowej. Kompleks kallikreina-kalostatyna charakteryzuje się znacznie dłuższym czasem półtrwania w porównaniu z samą kallikreina, co sugeruje, że kalostatyna reguluje dostępność i katabolizm kallikreiny tkankowej [18]. Wyniki badań przeprowadzonych przez autorów niniejszej pracy wykazały, że wzrost liczby receptorów bradykininowych BR2 wiąże się ze zwiększeniem ekspresji genu kalostatyny, natomiast wzrost stężenia kalostatyny w tkance świadczy o aktywacji układu kinin jako odpowiedzi na proces zapalny zachodzący w ścianie aorty. Uzyskane wyniki sugerują, że w śródbłoku naczyniowym pacjentów z rozсіяną wielopoziomą miażdżycą dochodzi zarówno do aktywacji układu kinin, jak i nasilenia procesów proliferacyjnych komórek.

### Wnioski

W śródbłoku naczyniowym fragmentów tętniaków aorty brzusznej występują receptory bradykininowe BR1 i BR2.

Aktywność proliferacyjna komórek śródbłoka naczyniowego ściany tętniaka wiąże się z obecnością obu receptorów bradykininowych i zwiększa się wraz ze wzrostem aktywności transkrypcyjnej genu receptora bradykininowego BR2.

Aktywność transkrypcyjna genu kalostatyny zwiększa się proporcjonalnie do wzrostu stężenia mRNA receptora bradykininowego BR2.

14. Roberts RA, Gullick WJ (1989) Bradykinin receptor number and sensitivity to ligand stimulation of mitogenesis is increased by expression of a mutant ras oncogene. *J Cell Sci*, 94: 527–535.
15. Taub JS, Gus R, Leeb-Lundberg LM, Hadden JF, Daaka Y (2003) Bradykinin receptor subtype 1 expression and function in prostate cancer. *Cancer*, 68 (9): 2037–2041.
16. Yang SW, Lee WK, Lee EJ et al (2001) Effect of bradykinin on cultured bovine corneal endothelial cells. *Ophthalmologica*, 215 (4): 303–308.
17. Glover Ch, Ma X, Chen JX et al (2002) Human in-stent restenosis tissue obtained by means of coronary atherectomy consists of an abundant proteoglycan matrix with a paucity of cell proliferation. *Am Heart J*, 144: 702–709.
18. Chao J, Schmaier A, Chen-Li-Mei, Zhirong Y, Chao L (1996) Kallistatin, a novel human tissue kallikrein inhibitor: levels in body fluids, blood cells, and tissue in health and disease. *J Lab Clin Med*, 127: 612–620.