

Ischemia and reperfusion-induced damage of the isolated mouse heart : involvement of type IIA secretory phospholipase A2

Citation for published version (APA):

de Windt, L. J. (1999). *Ischemia and reperfusion-induced damage of the isolated mouse heart : involvement of type IIA secretory phospholipase A2*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19991222lw>

Document status and date:

Published: 01/01/1999

DOI:

[10.26481/dis.19991222lw](https://doi.org/10.26481/dis.19991222lw)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Samenvatting

In **Hoofdstuk 1** worden de achtergrond en het doel van de huidige studie beschreven. Het hart is een holle spier die circa 70 maal per minuut samentrekt en daarmee het lichaam van bloed voorziet. Tijdens iedere contractie voorziet het hart zichzelf van zuurstof en voedingstoffen via de kransslagaderen. Tijdens een hartinfarct als gevolg van een vernauwing van een kransslagader of tijdens een kransslagader bypass operatie lijdt de hartspier onder een periode van zuurstoftekort (ischemie), wat kan leiden tot afsterving van de hartspiercellen. Herstel van de bloedtoevoer (reperfusie) kan slechts ten dele de afsterving van hartspiercellen voorkomen en in sommige gevallen zelfs het proces versterken. Dit fenomeen van ischemie en reperfusie geïnduceerde hartspiercelschade wordt ten dele veroorzaakt door veranderingen in de celmembraan, de natuurlijke barrière van de hartspiercel. Uit experimentele studies is gebleken dat enzymatische afbraak van de belangrijkste componenten van de celmembraan, namelijk de fosfolipiden, mogelijk een belangrijke factor speelt in ischemie en reperfusie geïnduceerde celschade. Het lichaam bevat een familie van enzymen, fosfolipases A₂ genaamd, die gespecialiseerd zijn in de afbraak van fosfolipiden en die verschillen in werking en lokalisatie. In het huidige proefschrift werd de rol van het type IIA secretoire fosfolipase A₂ enzym (type IIA sPLA₂) nader onderzocht. In **hoofdstuk 2** wordt ingegaan op de theoretische overwegingen voor de keuze van dit lid van de fosfolipase A₂ familie. Het type IIA sPLA₂ werd gekozen op basis van zijn werkingsprofiel en omdat dit bepaalde enzym gevoelig is voor calcium, een mineraal dat in verhoogde concentratie voorkomt in het hart tijdens ischemie en reperfusie.

In **hoofdstuk 3** werd via moleculair biologische technieken onderzocht of het type IIA sPLA₂ in het hart voorkomt. Daartoe werd het hart van de rat onderzocht op de aanwezigheid van de moleculaire voorloper van het enzym, het messenger RNA. Onderzoek wees uit dat het hart inderdaad het type IIA sPLA₂ messenger RNA bevat en dat de genetische code zeer sterk geconserveerd is vergeleken met diverse andere celtypen en diersoorten. Tevens bleek dat de hoeveelheid van het type IIA sPLA₂ messenger RNA in het hart zeer gering zijn.

In **hoofdstuk 4** werd de genetische code van het enzym zodanig aangepast dat het enzym in grote hoeveelheden in de *E. Coli* bacterie geproduceerd kon worden. Tegen dit recombinante type IIA sPLA₂ enzym werden vervolgens in de konijn polyclonale antistoffen opgewekt. De mogelijkheid van deze antilichaam fractie om het type IIA sPLA₂ enzym aan te tonen werd getest naast andere antilichamen die waren opgewekt tegen andere typen fosfolipase A₂. Al de geteste antilichamen bleken in meer of minder mate het type IIA sPLA₂ enzym te herkennen in diverse celtypen en organen. Geen van de geteste antilichamen konden het type IIA sPLA₂ enzym in het hart echter aantonen, waaruit geconcludeerd kon worden dat dat dit enzym in geringe hoeveelheden in het hart voorkomt, aangezien de onderste detectiegrens van het meetsysteem niet overschreden werd.

Hoofdstuk 5 beschrijft de ontwikkeling van een geïsoleerd, met buffer geperfundeed muizenhart model om de hemodynamische functie van het intacte hart in detail te bestuderen. Door speciale aandacht te besteden aan de aorta cannule, de temperatuur van het geïsoleerde hart en de samenstelling van de perfusiebuffer, bleek het mogelijk te zijn hemodynamische metingen te verrichten die vergelijkbare waarden opleverden met hartfunctiemetingen in de intacte, levende muis.

Dit model werd verder gebruikt in **hoofdstuk 6** om de ischemie tolerantie van het muizenhart te testen. Door metingen te verrichten aan de hoeveelheid intracellulaire eiwitten die verschijnen in de perfusiebuffer na een periode van ischemie, kon een schatting gemaakt worden van het percentage hartspiercellen dat onherstelbaar beschadigd was door de voorafgaande periode van ischemie. Ook werd na afloop van

het experiment in het hart de stapeling gemeten van o.a. arachidonzuur, een meervoudig onverzadigd vetzuur dat vrijkomt bij de afbraak van membraanfosfolipiden tengevolge van fosfolipase A₂ activiteit. Het bleek dat de afname in hemodynamische hartfunctie na een periode van ischemie gecorreleerd kon worden aan enerzijds het percentage beschadigde hartspiercellen en anderzijds aan de afbraak van membraan fosfolipiden. Ook wees deze studie uit dat al na een relatief korte periode van zuurstoftekort (circa 15 minuten) het muizenhart een sterke afname in hemodynamische functie vertoont, hetgeen duidt op een grote ischemie gevoeligheid van dit orgaan.

Verder werd in **hoofdstuk 7** de ischemie tolerantie gemeten van harten die afkomstig waren van muizen die zodanig genetische gemodificeerd waren dat ze verminderde hoeveelheden van de groeifactor insulin-like growth factor-1 (IGF-1) bevatten. Eerdere experimentele studies hebben uitgewezen dat IGF-1 een protectief effect heeft op het hart na een periode van zuurstoftekort. De verwachting is dat harten met een verminderde hoeveelheid IGF-1 gevoeliger zouden zijn voor een periode van zuurstoftekort. De harten van IGF-1 deficiënte muizen bleken inderdaad na een periode van ischemie en reperfusie slechter hemodynamisch te herstellen, en verhoogde celschade en grotere stapeling van vrij arachidonzuur in het hart te vertonen. Deze bevindingen tonen aan dat het model ontwikkeld en beschreven in hoofdstuk 5 en 6 inderdaad gevoelig genoeg is om subtiele verschillen in ischemie tolerantie aan te tonen van het geïsoleerde, intacte hart. Verder toont deze studie aan dat fosfolipase A₂-gemedieerde afbraak van celmembranen van de hartspiercel mogelijk een rol kan spelen in ischemie en reperfusie geïnduceerde harspierschade in de IGF-1 deficiënte muis.

Om de mogelijke rol van het type IIA sPLA₂ te testen in ischemie en reperfusie geïnduceerde afbraak van celmembranen, werd in **hoofdstuk 8** de ischemie tolerantie getest van muizen die een chromosomale mutatie bevatten in de genetische code voor het type IIA sPLA₂. Deze muizenstam bevat als gevolg van deze mutatie geen type IIA sPLA₂ in het hart. De ischemie tolerantie van harten van deze mutante muizenstam werd vergeleken met die van een nauw verwante muizenstam die normale hoeveelheden type IIA sPLA₂ in het hart bevat. Interessant genoeg werden geen verschillen gevonden in arachidonzuur stapeling in het hart, de hoeveelheid celschade of de afname in hemodynamische functie na een periode van ischemie gevolgd door reperfusie. Deze bevindingen tonen aan dat het type IIA sPLA₂ in het geïsoleerde muizenhart zeer waarschijnlijk geen dominante rol speelt in ischemie en reperfusie gemedieerde afbraak van celmembranen en dat andere leden van de fosfolipase A₂ familie mogelijk een belangrijkere rol in dit fenomeen vervullen.

Om meer inzicht te verkrijgen in de rol van fosfolipase A₂ activiteit op zich in ischemie en reperfusie geassocieerde membraanafbraak in het hart, werden in **hoofdstuk 9** pogingen ondernomen om een transgeen muismodel te creëren, dat zodanig genetisch gemodificeerd was dat het hart meer fosfolipase A₂ bevat. Dit resulteerde in een transgene muizenstam die weliswaar meer kopiën van het gen voor fosfolipase A₂, maar geen aantoonbare hogere hoeveelheden fosfolipase A₂ in het hart bevatte. Een vervolgpoging werd gedaan met andere DNA konstrukten en verscheidene transgene muizen werden gecreëerd die meerdere kopiën van het fosfolipase A₂ gen bevatten. Eén van de transgene muizen die een groot aantal kopiën bevatte stierf snel na geboorte, wat mogelijk inhoudt dat grote hoeveelheden fosfolipase A₂ niet verenigbaar zijn met normale hartfunctie. De beschikbaarheid van muismodellen met grotere of verminderde hoeveelheden fosfolipase A₂ in het hart, in combinatie met een geïsoleerd muizenhartmodel om de ischemie tolerantie van het hart van genetisch gemodificeerde muizen te testen, kan in toekomstige studies uitwijzen welk lid van de fosfolipase A₂ familie een dominante rol speelt in ischemie en reperfusie geïnduceerde hartspierschade.

Summary

In **chapter 1** the background to the present thesis and the general aim of our study are presented. The heart is a muscle that contracts approximately 70 times per minute and supplies the body with blood. During each contraction the heart supplies itself with oxygen and nutrients through the coronary arteries. During a myocardial infarction as a result of an occlusion of coronary arteries or during aorta-coronary bypass surgery, the heart is temporarily devoid of oxygen (ischemia), what eventually leads to cardiac muscle cell death. Restoration of the cardiac blood supply (reperfusion) is only partially able to reduce cardiac cell death and may even exacerbate the injuring process. This phenomenon of ischemia and reperfusion induced cardiac muscle cell death is partially caused by a disruption of the cellular membrane, which forms the natural barrier of the cardiac cell. Experimental studies have indicated that enzymatic breakdown of the major components of the cellular membrane, the phospholipids, might play an important role in the transition from ischemia and reperfusion induced reversible to irreversible cell damage, eventually leading to cardiac dysfunction. Our body contains a family of enzymes, phospholipases A₂, which are specialized in hydrolyzing membrane phospholipids and differ amongst each other in their activation profile and subcellular localization. In the present thesis the role of one particular member of this family, type IIA secretory phospholipase A₂ (type IIA sPLA₂) in ischemia and reperfusion induced cell damage was investigated in more detail. **Chapter 2** presents a review of literature and theoretical background of the rationale behind the choice for this particular enzyme. In brief, type IIA sPLA₂ was chosen on the basis of its activation profile and its dependency on calcium, a mineral the intracellular level of which is increased during cardiac ischemia and reperfusion.

In **chapter 3** it was investigated whether type IIA sPLA₂ is present in the heart using molecular biological techniques. To this end, the rat heart was investigated for the presence of the messenger RNA of type IIA sPLA₂, the molecular precursor of the protein itself. It was demonstrated that the heart indeed contains this messenger RNA and that the genetic code of cardiac type IIA sPLA₂ was highly conserved amongst different species and cell types. It was also demonstrated that the amount of type IIA sPLA₂ messenger RNA is very low in the heart.

In **chapter 4** high amounts of recombinant type IIA sPLA₂ were produced and purified from the *E. Coli* bacteria. Against this purified enzyme polyclonal antibodies were produced in the rabbit and used to detect type IIA sPLA₂ protein in different tissues. The ability of the latter antibody to detect type IIA sPLA₂ was compared with four other anti-phospholipase A₂ antibodies. It was found that all antibodies were able to detect the enzyme with different sensitivity. None of the antibodies, however, were able to detect the enzyme in cardiac tissue, providing further indication that the protein level of type IIA sPLA₂ is very low in cardiac muscle.

Chapter 5 describes the development and characterization of an isolated, buffer perfused mouse heart model to measure hemodynamic cardiac function devoid of neuro-humoral stimulation. By paying special attention to the artificial aortic outflow tract, the temperature of the isolated heart and the composition of the perfusion buffer, it was found that this model was able to sensitively monitor hemodynamic function, that resembled cardiac function of the mouse heart *in vivo*.

This model was subsequently used in **chapter 6** to study ischemia and reperfusion phenomena in the mouse heart. By measuring the leakage of intracellular enzymes into the coronary outflow an estimate could be obtained of the percentage cells irreversibly damaged during the preceding ischemic period. Biochemical analysis of cardiac tissue after experimentation allowed measurements of the accumulation of unesterified fatty acids such as arachidonic acid, which is a sensitive marker for phospholipase A₂ activity. A strong

correlation was found between the tissue accumulation of arachidonic acid on the one hand and the percentage irreversibly damaged cardiac cells or the post-ischemic recovery of hemodynamic function on the other. In addition, it was found that the mouse heart shows a relatively high sensitivity towards global ischemia and reperfusion.

This model was subsequently used in **chapter 7** to measure the ischemia tolerance of hearts derived from mice that were genetically engineered to contain less insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in their bodies. Previous studies provide evidence that IGF-1 has a potent protective effect on the cardiac muscle during ischemia and reperfusion. As such, IGF-1 deficient hearts would be expected to be more vulnerable towards ischemia and reperfusion induced damage. IGF-1 deficient hearts subjected to a period of ischemia followed by reperfusion indeed demonstrated a significant increase in cellular damage, lower hemodynamic recovery and increased accumulation of unesterified fatty acids, such as arachidonic acid. These findings provided further indications that the model described in chapter 5 and 6 was sensitive enough to detect subtle differences in ischemia tolerance of isolated mouse hearts. In addition, these observations further point toward a possible role of phospholipase A₂-mediated hydrolysis of membrane phospholipids in the sequelae of events leading to cardiac ischemia and reperfusion induced cell death.

To study the possible role of type IIA sPLA₂ in cardiac ischemia and reperfusion-induced membrane damage and cell death, in **chapter 8** the ischemia tolerance was tested of hearts derived from mice with a chromosomal mutation in the gene of type IIA sPLA₂. As a result of the mutation this mouse strain is unable to produce the type IIA sPLA₂ enzyme in the heart. The ischemia tolerance of mutant mouse hearts was compared with hearts derived from a mouse strain that was closely related but did not contain the mutation, and, hence, has normal cardiac type IIA sPLA₂ levels. Interestingly, following ischemia and reperfusion no differences were found in the accumulation of arachidonic acid, the amount of irreversible cell damage or recovery of hemodynamic function. These findings indicate that type IIA sPLA₂ activity most probably is not a major factor in cardiac ischemia and reperfusion-induced membrane damage in the isolated mouse heart and that other members of the phospholipase A₂ family may have more dominant roles in this phenomenon.

To gain more insight in the role of phospholipase A₂ activity during cardiac ischemia and reperfusion, attempts were made in **chapter 9** to create a transgenic mouse model that was genetically modified to contain increased type IIA secretory phospholipase A₂ activity in the heart. This resulted in a transgenic mouse strain that contained more copies of the phospholipase A₂ gene in its chromosomes, but did not demonstrate a detectable increase in the amount of the enzyme. In a follow up experiment other DNA constructs were used and multiple transgenic mice were obtained. Interestingly, one mouse that contained a high number of copies of the phospholipase A₂ gene died soon after birth, possibly indicating that large quantities of phospholipase A₂ may not be compatible with normal cardiac function. The availability of genetically engineered mice containing either more or less of the different members of the phospholipase A₂ in the heart, in combination with an isolated mouse heart model to test the cardiac ischemia tolerance, may indicate in the future whether or not phospholipase A₂ mediated membrane hydrolysis plays a role in the transition of reversible to irreversible cardiac myocyte injury and which of the members of the phospholipase A₂ family plays a dominant role in this process.