

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

EVA ČERNEC

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

EVA ČERNEC

**VPLIV RANOLAZINA IN TRIMETAZIDINA NA KONCENTRACIJO
KATEPSINA S V SERUMU BOLNIKOV S STABILNO ISHEMIČNO BOLEZNIJO
SRCA**

**INFLUENCE OF RANOLAZINE AND TRIMETAZIDINE ON CATHEPSIN S
CONCENTRATION IN SERUM OF PATIENTS WITH STABLE ISCHEMIC
HEART DISEASE**

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za klinično biokemijo pod mentorstvom prof. dr. Darka Černeta, mag. farm., spec. med. biokem., in somentorstvom izr. prof. dr. Mirana Šebeštjena, dr. med., spec. int. med.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Darku Černetu, mag. farm., spec. med. biokem., za strokovne nasvete pri raziskovalnem delu in pomoč pri izdelavi magistrske naloge. Zahvaljujem se tudi somentorju izr. prof. dr. Miranu Šebeštjenu, dr. med., spec. int. med., za strokovne nasvete pri pisanju magistrske naloge. Iskrena hvala vsem zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo, posebej Petri Ferkov, mag. lab. biomed., in Manji Cedilnik, mag. lab. biomed., ter doc. dr. Urši Pečar Fonović, univ. dipl. biol., za nesebično pomoč pri reševanju težav, načrtovanju in izvedbi eksperimentalnega dela.

Posebna zahvala gre moji dragi družini, fantu in prijateljem, ki so mi tekom študija nudili veliko podporo.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Darka Černeta, mag. farm., spec. med. biokem., in somentorstvom izr. prof. dr. Mirana Šebeštjena, dr. med., spec. int. med.

Ljubljana, avgust 2018

Eva Černec

VSEBINA

SEZNAM SLIK.....	III
SEZNAM PREGLEDNIC	IV
POVZETEK.....	V
ABSTRACT	VII
SEZNAM OKRAJŠAV	IX
1 UVOD.....	1
1.1 Ateroskleroza.....	1
1.2 Ishemična bolezen srca.....	3
1.3 Cisteinske peptidaze	5
1.3.1 Katepsin S	5
1.3.2 Katepsin S in ateroskleroza.....	6
1.4 Ranolazin.....	7
1.5 Trimetazidin.....	9
2 NAMEN DELA IN HIPOTEZA	12
3 PREISKOVANCI IN METODE.....	13
3.1 Preiskovanci.....	13
3.2 Določanje koncentracije katepsina S.....	13
3.2.1 Reagenti in kemikalije.....	13
3.2.2 Laboratorijska oprema in pripomočki.....	14
3.2.3 Pufri.....	14
3.2.4 Princip postopka.....	15
3.2.5 Opis postopka.....	16
3.2.6 Izračun rezultatov meritev.....	19
3.3 Določanje aktivnosti katepsina S.....	20
3.3.1 Reagenti in kemikalije.....	20
3.3.2 Laboratorijska oprema in pripomočki.....	20
3.3.3 Pufri.....	20
3.3.4 Princip postopka.....	21

3.3.5	Opis postopka.....	21
3.3.6	Izračun rezultatov meritev.....	23
3.4	Priporočila za izvedbo postopka določitve koncentracije in aktivnosti katepsina S	24
3.5	Statistična analiza rezultatov	25
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	27
5	SKLEP	40
6	LITERATURA	41

SEZNAM SLIK

Slika 1: Katepsin S (13).....	6
Slika 2: Strukturna formula ranolazina (21).....	7
Slika 3: Strukturna formula trimetazidina (28).....	10
Slika 4: Čitalec mikrotitrskih ploščic Tecan Safire 2	18
Slika 5: Standardna krivulja za test ELISA	19
Slika 6: Graf časovnega naraščanja fluorescence kot posledica aktivnosti katepsina S	24

SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica I: Pufri za test ELISA za določitev koncentracije Katepsina S	15
Preglednica II: Osnovni koraki testa ELISA	16
Preglednica III: Shematski prikaz postopka določanja koncentracije Katepsina S s testom ELISA	18
Preglednica IV: Osnovni in aktivacijski pufer	21
Preglednica V: Shematski prikaz postopka določanja aktivnosti Katepsina S.....	23
Preglednica VI: Rezultati meritev koncentracije in aktivnosti Katepsina S v serumskih vzorcih bolnikov	29
Preglednica VII: Rezultati Wilcoxonovega testa predznačenih rangov – razlika v mediani koncentracije Katepsina S, izmerjene pred in po terapiji z ranolazinom	32
Preglednica VIII: Rezultati Wilcoxonovega testa predznačenih rangov – razlika v mediani koncentracije Katepsina S, izmerjene pred in po terapiji s trimetazidinom.....	32
Preglednica IX: Rezultati Wilcoxonovega testa predznačenih rangov – razlika v mediani aktivnosti Katepsina S, izmerjene pred in po terapiji z ranolazinom	33
Preglednica X: Rezultati Wilcoxonovega testa predznačenih rangov – razlika v mediani aktivnosti Katepsina S, izmerjene pred in po terapiji s trimetazidinom.....	33
Preglednica XI: Rezultati neparametričnega parnega t-testa za ranolazin	33
Preglednica XII: Rezultati neparametričnega parnega t-testa za trimetazidin	34
Preglednica XIII: Spearmanova koeficienta korelacije med koncentracijo oziroma aktivnostjo Katepsina S pred in po terapiji z ranolazinom.....	35
Preglednica XIV: Spearmanova koeficienta korelacije med koncentracijo oziroma aktivnostjo Katepsina S pred in po terapiji s trimetazidinom	36
Preglednica XV: Spearmanova koeficienta korelacije med koncentracijo in aktivnostjo Katepsina S pred terapijo in po terapiji z ranolazinom	37
Preglednica XVI: Spearmanova koeficienta korelacije med koncentracijo in aktivnostjo Katepsina S pred terapijo in po terapiji s trimetazidinom	37
Preglednica XVII: Spearmanova koeficienta korelacije za koncentracijo in aktivnost Katepsina S za obe zdravili skupaj.....	39

POVZETEK

V današnjem razvitem svetu je ateroskleroza glavni vzrok srčno-žilnih zapletov, obolevnosti in smrtnosti. Pri razvoju ateroskleroze sodelujejo različni procesi, ki so med sabo povezani. Eden izmed procesov je razgradnja zunajceličnega matriksa, ki naj bi jo povzročile različne peptidaze. Dokazano je, da kot cisteinska peptidaza pri razgradnji zunajceličnega matriksa sodeluje katepsin S, ki ima močno elastolitično in kolagenolitično aktivnost.

Ena izmed simptomatskih posledic ateroskleroze je porušeno ravnovesje med ponudbo in porabo kisika. Ishemična bolezen srca je bolezen razvitega sveta. Novejši metabolni antiishemični zdravili sta ranolazin in trimetazidin, ki se uporabljata v kombinaciji z drugimi antianginoznimi zdravili, če so bolniki še vedno simptomatski. Glede na njun mehanizem delovanja in vpletenost katepsina S v aterogenezo smo v naši raziskavi kot prvi želeli preučiti, ali obstaja kakršnakoli povezava med ranolazinom oziroma trimetazidinom in katepsinom S.

Preučevali smo naslednjo hipotezo: Pri bolnikih z ishemično boleznijo srca se po terapiji z ranolazinom oziroma trimetazidinom koncentracija in aktivnost katepsina S zniža.

Da bi hipotezo potrdili ali ovrgli, smo v serumu bolnikov, ki so prejeli ranolazin oziroma trimetazidin, določili koncentracijo in aktivnost katepsina S pred in po dvanajstih tednih zdravljenja. Koncentracijo katepsina S smo določili z encimsko-immunskim testom ELISA, aktivnost katepsina S pa s kinetično meritvijo spremembe koncentracije substrata v produkt v časovni enoti. Ugotovili smo, da ni bilo razlike med koncentracijo katepsina S pred terapijo in koncentracijo katepsina S po terapiji niti z ranolazinom niti s trimetazidinom (za ranolazin $p = 0,694$, za trimetazidin $p = 0,420$). Prav tako ni bilo razlike med aktivnostjo katepsina S pred terapijo in aktivnostjo katepsina S po terapiji z ranolazinom oziroma trimetazidinom (za ranolazin $p = 0,375$, za trimetazidin $p = 0,646$). Z izračunom Spearmanovega koeficienta smo želeli dokazati povezave med koncentracijo pred in po terapiji oziroma aktivnostjo pred in po terapiji z ranolazinom oziroma trimetazidinom. Ugotovili smo, da koncentracija katepsina S pred terapijo korelira s koncentracijo katepsina S po terapiji. Enako smo ugotovili tudi za aktivnost katepsina S.

Nasprotno pa koncentracija katepsina S ni korelirala z aktivnostjo encima katepsina S, niti pred terapijo niti po terapiji in pri nobenem od obeh proučevanih zdravil.

Ob navedenih dejstvih lahko zaključimo, da zdravili ne vplivata na koncentracijo in aktivnost katepsina S.

Ključne besede: ateroskleroza, ishemična bolezen srca, ranolazin, trimetazidin, katepsin S

ABSTRACT

In today's developed world, atherosclerosis is the main cause of cardiovascular complications, morbidity and mortality. Various interconnected processes contribute towards atherosclerosis. One of such processes is the degradation of the extracellular matrix, which is supposedly enabled through various proteases. It has been proven that cathepsin S, which has a strong elastolytic and collagenolytic activity, contributes to the degradation of the extracellular matrix as a cysteine peptidase.

One of the symptomatic consequences of the atherosclerosis is the ruined balance between the supply and demand of oxygen. Ischemic heart disease is the disease of the developed world. Newer metabolic anti-ischemic drugs such as ranolazine and trimetazidine are used in combination with other antianginous drugs, insofar the patients remain symptomatic. In view of their effect mechanisms and involvement of cathepsin S into atherogenesis, we wanted to, as first, study a possible correlation between ranolazine or trimetazidine and cathepsin S.

We studied the following hypothesis: In patients with ischemic heart disease, the concentration and activity of cathepsin S decreases after a treatment with ranolazine or trimetazidine.

In order to confirm or reject the hypothesis, we determined the concentration and activity of cathepsin S in the patient's serum, prior to and after twelve weeks of treatment. We determined the concentration of cathepsin S with the help of the enzyme-linked immunosorbent assay ELISA and the activity of the cathepsin S by a kinetic measurement of the change in the concentration of the substrate in the product in a time unit. We discovered that there was no difference between the concentration of cathepsin S before the treatment and the concentration of the cathepsin S after the treatment with either ranolazine or trimetazidine (for ranolazine $p = 0.694$, for trimetazidine $p = 0.420$). There was also no difference between the activity of cathepsin S before the treatment and the activity of cathepsin S after the treatment with either ranolazine or trimetazidine (for ranolazine $p = 0.375$, for trimetazidine $p = 0.646$). By calculating the Spearman's rank correlation coefficient, we wanted to prove the correlation between the concentration

before and after the treatment, as well as the activity before and after a treatment with ranolazine or trimetazidine. We discovered that the concentration of the cathepsin S before the treatment correlates with the concentration of the cathepsin S after the treatment. The same was determined for the activity of cathepsin S. On the contrary, the concentration of cathepsin S did not correlate with the activity of cathepsin S, neither before the treatment or after with none of the studied drugs.

We may conclude that both drugs have no influence on concentration and activity of cathepsin S.

Keywords: atherosclerosis, ischemic heart disease, ranolazine, trimetazidine, cathepsin S

SEZNAM OKRAJŠAV

3-KAT – 3-ketoacil koencim A tiolaza

ACE – zaviralci angiotenzin-konvertaze

ADP – adenzindifosfat

AMI – akutni miokardni infarkt

AP – angina pektoris

ATP – adenzin trifosfat

BSA – goveji serumski albumin

CTSS – katepsin S

ELISA – encimsko-imunski test

ER – endoplazmatski retikulum

FGF-2 – rastni dejavnik fibroblastov

GA – Golgijev aparat

HADHA – hidroksiacil-koencim A dehidrogenaza/3-ketoacil-koencim A tiolaza/enoil-koencim A hidrataza, podenota alfa

IL-1 – interlevkin-1

INF – interferon gama

LDL – lipoproteini

MCSF – makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik

MHC – molekule poglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa

mRNA – informacijska ribonukleinska kislina

oxLDL – oksidirani lipoproteini

P-GP – P-glikoprotein

ROS – reaktivne kisikove spojine

TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin

TNF – dejavnik tumorske nekroze

VEGF – vaskularni endotelijski rastni dejavnik

VLDL – lipoproteini zelo nizke gostote

ZCM – zunajcelični matriks

1 UVOD

1.1 Ateroskleroza

Ateroskleroza je kompleksna, kronična vnetna degenerativna bolezen velikih in srednje velikih arterij mišičnega in elastičnega tipa, vključno z aorto, koronarnimi arterijami, perifernimi in možganskimi arterijami. V današnjem razvitem svetu je glavni vzrok srčno-žilnih zapletov, obolevnosti in umrljivosti. Je sistemska bolezen, kar pomeni, da imajo bolniki z določeno aterosklerotično boleznijo hkrati tudi asimptomatsko ali simptomatsko aterosklerozo v drugih organskih sistemih. Pri razvoju ateroskleroze sodelujejo različni procesi, ki so med sabo povezani: kopičenje lipidov, veziva, netopnih kalcijevih soli in celičnih ostankov v intimi, aktivacija trombocitov, tromboza, endotelijska disfunkcija, oksidativni stres, preoblikovanje žilne stene in spremljajoče vnetje. Vnetje je verjetno skupni imenovalac škodljivega delovanja različnih dejavnikov tveganja na žilno steno, ki zajame tudi medio in adventicio. (1, 2, 3)

Patomorfološka značilnost ateroskleroze je leha ali aterom, ki je posledica kopičenja lipidov v notranji plasti arterijske stene, intimi, ki ga spremlja kronično vnetje z infiltracijo makrofagov in limfocitov T, migracijo in proliferacijo gladkomišičnih celic ter povečano sintezo kolagena, elastina in proteoglikanov, makromolekul vezivnega matriksa. (3)

O nastanku in poteku aterosklerotičnega procesa obstajajo številne razlage in teorije, vodilno vlogo pa ima še vedno teorija o poškodbi žilne stene, ki ji sledi vnetni odgovor. (1, 4)

Teorija o poškodbi žilne stene se v prvi fazi začne s poškodbo žilnega endotelija, ki je ves čas izpostavljen številnim mehanskim in kemičnim poškodbam. Žilni endotelij ima ključno vlogo pri vzdrževanju žilne integritete in homeostaze. Dejavniki, ki lahko poškodujejo žilni endotelij, delujejo na različne načine in jih delimo na: fizikalne (povišan krvni tlak, turbulentni tok krvi), kemične (ogljikov monoksid, nikotin), presnovne (holesterol, homocistin) in biološke (bakterije, virusi, kompleksi antigen-protitelo, aktivirani trombociti in levkociti). Zaradi poškodbe pride do okvare obrambne sposobnosti endotelija in posledično se poveča njegova prepustnost. Pospeši se vstopanje lipoproteinov z nizko

gostoto (LDL) v arterijsko steno in njihova oksidacija, vstopanje monocitov in limfocitov T v arterijsko steno, proliferacija gladkomišičnih celic, sinteza zunajceličnega matriksa (ZCM) in povečanje tonusa gladke mišičnine v žilni steni oziroma vazokonstrikcija, ki povzroči zoženje žil. (1, 3, 5)

V drugi fazi aterosklerotičnega procesa se monociti v subendoteliju žilne stene pod vplivom makrofagne kolonije stimulirajočega dejavnika (MCSF) preobrazijo v makrofage, ki preko receptorske endocitoze fagocitirajo lipoproteine, ki jo posredujejo odstranjevalni receptorji, ki z veliko afiniteto vežejo oksidirane LDL (oxLDL), lipoproteine zelo nizke gostote (VLDL), kot tudi neoksidirane lipoproteine. Poglavitni produkt razgradnje oksidiranih delcev LDL je znotrajcelični holesterol, ki se v obliki kapljic kopiči v citosolu makrofagov. Takim z maščobami zapolnjenim tkivnim makrofagom zaradi posebnega mikroskopskega izgleda pravimo penaste celice. (1, 3) Ko količina lipidov, ki vstopajo v žilno steno, preseže količino lipidov, ki jo lahko makrofagi odstranijo, se aterosklerotična leha oziroma aterom poveča. Sčasoma nekatere penaste celice odmrejo in oblikuje se lipidna sredica lehe z izvenceličnim holesterolom, nastane maščobna leha. (3)

Pod vplivom okvare se v napredovanju bolezni, v tretji fazi aterosklerotičnega procesa pričnejo razmnoževati gladkomišične celice in potovati iz srednje plasti arterijske stene, medie, v notranjo plast arterijske stene, intimo. Poveča se tudi sinteza zunajceličnega matriksa. Potovanje in razmnoževanje gladkomišičnih celic spodbujajo različni kemokini in rastni dejavniki, ki se sproščajo iz celic v žilni steni. Pomembni so tudi trombociti, ki se lepijo na poškodovani endotelij in sproščajo snovi, ki pospešujejo razmnoževanje gladkomišičnih celic v steni arterije in njihovo potovanje iz medije v intimo. V intimi žilne stene gladkomišične celice izločajo predvsem kolagen, fagocitirajo oxLDL in se podobno kot makrofagi preobrazijo v penaste celice in tvorijo vezivno medceličnino, nastane vezivna leha. K preobrazbi v penaste celice spodbujajo tudi limfociti T. (1, 3)

Z rastjo aterosklerotične lehe se v njej razraščajo žile, ki preko vnetnih posrednikov, ki pri tem nastajajo, vplivajo na stabilnost lehe. Kopičijo se tudi kalcijeve soli s prostimi maščobnimi kislinami, zaradi katerih postane arterijska stena trda in neelastična. (3)

Aterosklerotična leha oziroma aterom zoži svetlino arterije za okoli 50 % in večinoma ne ovira arterijskega dotoka krvi v organe v mirovanju. Na površini aterosklerotične lehe lahko pride do kakršnekoli spremembe, kot so razpoka ali razjeda ali vnetje. Razpad aterosklerotične lehe je posledica razpokanja fibrozne kapice, ki vodi do izpostavljenosti zunajceličnega matriksa, ki izzove trombocitno adhezijo, agregacijo in aktivacijo. Za razpad so predvsem ranljive tiste aterosklerotične lehe, ki vsebujejo velika lipidna jedra in tanke fibrozne kapice. Aktivacija trombocitov vodi do sproščanja aktivnih mediatorjev (tromboksana A₂, 5-hidroksitriptamina in adeno-zindifosfata (ADP)), ki povzročijo aktivacijo koagulacijske kaskade. Nastanejo trombi, ki še dodatno zmanjšajo lumen arterije. Dodatno vazoaktivne snovi, kot sta 5-hidroksitriptamin in tromboksan A₂, ki se sproščata iz agregiranih trombocitov, povzročijo lokalno vazokonstrikcijo. (6, 7)

Simptomi in znaki se razvijejo, ko pride do zapletov z nastankom tromba na spremenjeni aterosklerotični lehi. Poruši se ravnovesje med dotokom in porabo kisika. Najpomembnejše simptomatske oblike ateroskleroze so ishemična bolezen srca, periferna okluzivna arterijska bolezen in ishemična možganska kap. (7)

1.2 Ishemična bolezen srca

Srce je organ, ki je v celoti odvisen od aerobne presnove, saj poraba kisika v srčni mišici uravnava koronarni pretok. Normalen koronarni pretok uravnava predvsem potrebe srčne mišice po kisiku, tako da je ponudba sorazmerna s porabo. Kadar pride do porušanja ravnovesja med ponudbo in porabo kisika, to vodi do zmanjšanja prekrvavljenosti oziroma ishemije srčne mišice. Celični primanjkljaj kisika in hranil v ishemičnem tkivu vodi v okvaro tkiva ali organa. (7)

V razvitih deželah sveta je ishemična bolezen srca najpogostejši vzrok obolevnosti in umrljivosti tako za moške kot tudi za ženske. Gre za skupino patofiziološko povezanih sindromov, ki izhajajo iz srčne ishemije, neravnovesja med dobavo in potrebo srca po kisiku, ki zmanjšajo razpoložljivost hranil in zmožnost odstranjevanja metabolitov. V večini primerov je za ishemično bolezen srca odgovorna ateroskleroza koronarnih arterij. Razvoj aterosklerotičnega procesa je različen, pogosto pa se kroničnemu poteku pridružijo

še številni akutni zapleti, kot so tromboza, krvavitev, spazem oziroma krč koronarnih žil itd. (1, 8)

Brez predvidljivega poteka kronični bolezni sledijo akutni klinični pojavi. Najpomembnejša oblika ishemične bolezni srca je akutni miokardni infarkt (AMI), kjer ishemija povzroči smrt večjega ali manjšega dela srčne mišice. Med akutne klinične pojave sodijo tudi bolečina za prsnico oziroma angina pectoris (AP), ki je nezadostna, da povzroči infarkt, lahko pa je tiha napovednica infarkta, kronična ishemična bolezen srca s srčnim popuščanjem in nenadna srčna smrt, ki je pogosto prvi in edini znak hude ishemične bolezni srca. (1, 8)

Prva značilna sprememba v razvoju ishemične bolezni srca je aterosklerotični plak, ki oži svetlino koronarne arterije in odvisno od stopnje zožitve ovira pretok krvi. Do ishemije srčne mišice pride sprva le pri večji porabi kisika v srcu, značilno med telesnim naporom ali razburjenjem, če se svetlina žile zoži nad 75 % preseka žile. Z napredovanjem aterosklerotičnega procesa, pri zožitvi svetline žile na 90 % ali več, se ishemija pojavi že med mirovanjem. (1)

Pri nastanku ishemije srčne mišice je pomemben tudi koronarni krč oziroma spazem, ki se pogosteje pojavlja v področju aterosklerotično spremenjenih koronarnih žil. Vzrok nastanka nenadne ishemije srčne mišice je lahko tudi tromboza koronarnih arterij, ki veliko pogosteje nastane na aterosklerotično spremenjeni žili. Tromb pomembno zoži koronarno arterijo ali jo nenadno popolnoma zapre in s tem povzroči propad pripadajočega predela srčne mišice. (1)

Brstenje novih malih žil in okrepitve anastomoz oziroma prečnih povezav med žilami postopne zožitve koronarnih žil sprotno popravljajo, zato bolniki z obolelim koronarnim žiljem v mirovanju ali pri manjših naporih nimajo večjih težav. Bolnik ishemično dogajanje v srčni mišici občuti kot topo, stiskajočo bolečino za prsnico, ki se lahko širi v vrat, levo ramo in žličko. (1)

O sindromu angine pectoris govorimo, ko bolniku ob uporabi zdravila za širjenje bolečina hitro popusti. Kadar bolečina kljub uporabi zdravila ne popusti in je ishemija hujša in povzroči odmrtje srčne mišice, pa govorimo o miokardnem infarktu. (1)

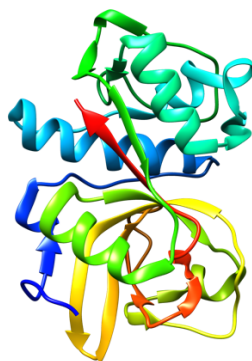
1.3 Cisteinske peptidaze

Peptidaze so encimi, ki ireverzibilno katalizirajo hidrolizo peptidne vezi. Ker različne peptidaze katalizirajo po različnih mehanizmih, jih po načinu katalize razdelimo na sedem glavnih družin. To so: aspartatne, cisteinske, glutaminske, asparaginske, serinske, treoninske peptidaze in metalopeptidaze. Obstajajo še peptidaze z mešanim in neznanim mehanizmom katalize. Cisteinske peptidaze lahko razdelimo na več klanov. Najpogostejše so papainu podobne cisteinske peptidaze. Klan sestavljajo papain in lizosomalni katepsini B, C, F, H, K, L, O, S, V, W in X. (9)

Katepsini se sintetizirajo kot preproencimi. Prokatepsini nastanejo po odstranitvi prepeptida med prehodom v endoplazmatski retikulum (ER). Aktivna oblika nastane po proteolitični odstranitvi propeptida v kislem okolju poznih endosomov ali lizosomov. Večina katepsinov, kot so katepsini B, F, H, K, L in V, so optimalno aktivni v kislem pH in šibko aktivni v nevtralnem pH. Izjema je katepsin S, ki je aktiven pri nevtralnem pH. (10)

1.3.1 Katepsin S

Katepsin S spada v družino lizosomskih cisteinskih peptidaz, ki so običajno prisotne v lizosomih. Po zaporedju aminokislin je v 57 % podoben katepsinoma K in L in v 31 % katepsinu B. Je enoverižni monomerni protein iz 217 aminokislin. Sintetizira se v zrnatem endoplazmatskem retikulumu kot prokatepsin S (proCatS), se prenese preko Golgijevega aparata z manoza-6-fosfatno potjo in se shranjuje v lizosomskih predelkih v neaktivni obliki. Aktivna oblika katepsina S nastane po odstranitvi propeptida z drugimi peptidazami in avtokatalitsko cepitvijo pri nizkem lizosomalnem pH. Za razliko od drugih cisteinskih peptidaz, ki imajo optimalno aktivnost v rahlo kislem pH in so večinoma nestabilne pri nevtralnem pH, je katepsin S stabilen pri nevtralnem ali rahlo alkalnem pH in pri tem stanju ohrani večino svoje aktivnosti. (11, 12, 13)



Slika 1: Katespsin S (14)

Pod fiziološkimi pogoji je močna peptidaza, ki skupaj z ostalimi katepsini sodeluje pri razgradnji znotrajceličnih proteinov. Poleg vloge pri razgradnji proteinov je pomemben tudi za imunski odziv. Ima ključno vlogo pri predstavitvi antigena z molekulami pglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa (MHC) razreda II. Odgovoren je za razgradnjo invariantne verige II, ki se nahaja v antigen vezavnem mestu molekule MHC razreda II. Samo po tem koraku so molekule MHC razreda II kompetentne za vezavo antigena. (11, 12)

Številne študije so pokazale vpletenost katepsina S v različne patološke procese. Dokazali so, da ima aktivni katepsin S, ki je skupaj z integrinom 3 lokaliziran kot receptor na površini gladkomišičnih celic, pomembno vlogo pri razgradnji ZCM. Na celični površini tako lokaliziran katepsin S lahko deluje na kontaktne površine srčnomišičnih celic in celic, povezanih z aterosklerozo. Ti predeli se lahko pogosto zakisajo in s tem ustvarijo pogoje, ki so ugodni za aktivacijo izločenih neaktivnih oblik katepsinov v aktivne. Dokazano je bilo, da lahko aktivni katepsin S razgradi proteinske komponente membran in intersticijski vezni matriks, vključno z lamininom, fibronektinom, elastinom in kolagenom. (11, 15)

1.3.2 Katespsin S in ateroskleroz

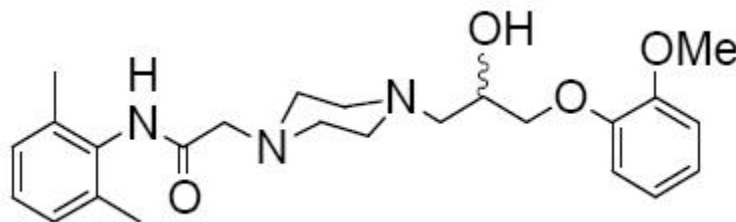
Pri aterosklerozi razgradnjo ZCM v žilni steni omogočajo gladkomišične celice, ko preidejo iz medie v intimo, in vnetne celice, ki preidejo iz lumna žile v arterijsko steno. Razgradnja zunajceličnega matriksa naj bi bila omogočena preko različnih peptidaz, kot so serinske peptidaze, metalopeptidaze in cisteinske peptidaze, ki jih gladkomišične celice izražajo. (16, 17)

Katepsin S kot cisteinska peptidaza razgrajuje proteine zunajceličnega matriksa, študije pa so pokazale, da ima tudi močno elastolitično in kolagenolitično aktivnost. Ugotovili so, da je pri aterosklerozi njegovo izražanje povečano v številnih celicah, ki jih najdemo v ateromu (makrofagi in gladkomišične celice). (17)

Katepsini so regulirani z endogenimi zaviralci katepsinov, imenovanimi cistatini. Cistatini na splošno delujejo kot zaščita pred nepravilnim sproščanjem peptidaz, kot so katepsini, iz lizosoma med apoptozo ali degranulacijo fagocitov. Cistatin C zavira katepsin S. Aterosklerotične lezije imajo znižano vrednost cistatina C, kar nakazuje na neravnovesje med katepsinom S in njegovim zaviralcem in vpliva na celovitost in homeostazo žilja. V razvoju ateroskleroze je predvsem pomemben zunajcelični katepsin S, katerega aktivnost je močno proaterogena. Vaskularne gladkomišične celice in endotelne celice lahko izločajo katepsin S, ki razgradi zunajcelični elastin in kolagen, kadar so izpostavljene provnetnim citokinom in ravnim dejavnikom, kot so interleukin-1 (IL-1), interferon gama (INF), dejavnik tumorske nekroze (TNF), rasti dejavnik fibroblastov (FGF-2) in vaskularni endotelijski rasti dejavnik (VEGF). (16, 18)

1.4 Ranolazin

Ranolazin je zdravilo z antianginalnimi in antiishemičnimi učinki, ki vpliva na presnovo srčne mišice. Je aktivni piperizinski derivat in racemna zmes z IUPAC imenom (*RS*)-*N*-(2,6-dimetilfenil)-2-[4-[2-hidroksi-3-(2-metoksifenoksi)-propil]piperazin-1-il]acetamid, z empirično formulo $C_{24}H_{33}N_3O_4$ in molekulska masa 427,54 g/mol. (19, 20, 21)



Slika 2: Strukturna formula ranolazina (21)

Srčna ishemija spremeni pretok ATP-ja, kar povzroči funkcionalno zmanjšanje energije, ki je na voljo proteinom, odgovornim za krčenje in sproščanje srca. Nekateri od teh so

sestavni del vzdrževanja ionskega ravnovesja v celicah srčne mišice, zato med ishemijo pride do motenj homeostaze natrija in kalcija. (22)

Povečanje znotrajceličnega Na^+ vodi v povečanje znotrajceličnega kalcija (Ca^{2+}), kar privede do povečane togosti levega prekata med diastolo, povečane potrebe in porabe srca po kisiku, zmanjšanja zalog ATP-ja, zmanjšane srčne prekrvavitve ishemičnega področja in zmanjšane dostave hranil. Zdravilna učinkovina ranolazin zavira pozni tok natrijevih ionov (Na^+) v celice srčne mišice. To ovira delovanje posebnih kanalčkov na površini celice, imenovanih »od natrija odvisni kalcijevi kanalčki«, skozi katere kalcijevi ioni (Ca^{2+}) običajno vstopajo v celico. Tako se zniža število kalcijevih ionov (Ca^{2+}), ki vstopajo v celice. Zmanjšanje pretoka kalcija v celice pripomore k sprostitvi srca in izboljššanemu pretoku krvi v srčno mišico. Ker ranolazin preprečuje ishemijo brez vpliva na hemodinamske parametre, za razliko od antagonistov beta adrenergičnih receptorjev, zaviralcev kalcijevih kanalčkov ter zaviralcev angiotenzinske konvertaze (ACE) ali sartanov, je učinkovito dopolnilo sedanji anginalni terapiji. (20, 23, 24)

Po peroralnem odmerjanju ranolazina so najvišje koncentracije zaznavne po 2 do 6 urah. Zaužita hrana na obseg in hitrost absorpcije nima večjega vpliva. Po absorpciji se več kot 60% ranolazina veže na proteine v plazmi, predvsem na alfa-1 kisli glikoprotein in šibko na albumin. Hitra in obsežna presnova ranolazina poteka v jetrih in črevesju, manj kot 5 % pa se ga nespremenjenega izloča preko ledvic ali z blatom. V večji meri se presnavlja s pomočjo citokroma P450 (CYP) 3A4, v manjši meri pa s pomočjo citokroma CYP 2D6. V plazmi, urinu in blatu so odkrili veliko presnovkov in primarnih presnovnih poti ranolazina. Med najpomembnejšimi presnovnimi potmi sta O-demetiliranje in N-dealkiliranje. Očistek ranolazina je odvisen od odmerka in se s povečanjem odmerka manjša. Zaradi izločanja, ki je omejeno s hitrostjo absorpcije je biološka razpolovna doba ranolazina po peroralni uporabi približno 7 ur. (20, 25)

Po podatkih farmakokinetičnih študij na podlagi starosti in spola bolnika niso ugotovili nobenih klinično pomembnih učinkov na farmakokinetične parametre ranolazina, vendar pa je lahko izpostavljenost ranolazinu pri starejših bolnikih večja zaradi slabšega delovanja ledvic, povezanega s starostjo. Pri bolnikih z različnimi stopnjami ledvične odpovedi so ugotovili povečanje ranolazina v plazmi za 50 %. Povečane koncentracije so bile prisotne

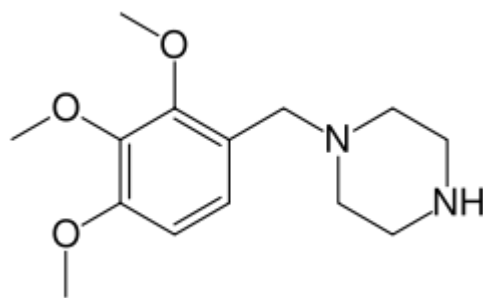
tudi pri bolnikih z jetrno okvaro oziroma oslABLJENO funkcijo jeter. Pri bolnikih s srčnim popuščanjem in bolnikih s sladkorno boleznijo niso opazili nobenih učinkov na farmakokinetiko ranolazina. (20)

Ranolazin je relativno močan zaviralec P-glikoproteina (P-GP), zato ga je treba previdno uporabljati, ker se lahko tkivna porazdelitev zdravil (npr. verapamila), ki jih prenaša P-GP, poveča. Ranolazin poveča tudi serumske vrednosti digoksina za 1,5-krat, zato se pri bolnikih, ki jemljejo obe zdravili, odmerki digoksina spremenijo. Ker pa je ranolazin tudi blag zaviralec encima CYP3A4, lahko sočasna uporaba različnih zdravil vpliva na njegov očistek. (22, 25)

Čeprav velja ranolazin za varno zdravilo, se lahko pojavijo številni neželeni učinki. Le ti so načeloma blagi do zmerni in se pogosteje pojavijo na začetku zdravljenja. Najpogostejši neželeni učinki so omotica, glavobol, zaprtje, bruhanje, navzeja (slabost) in astenija (oslabeledost). Občasno do redko se lahko pojavijo različne presnovne in prehranske motnje, lahko se pojavijo psihiatrične motnje in motnje v živčnem sistemu, očesne in ušesne bolezni, vključno z motnjami labirinta, žilne bolezni, bolezni dihal, vključno s prsnim košem in mediastinalnem prostoru, bolezni prebavil, bolezni kože in podkožja, ohromi lahko tudi mišično-skeletni sistem, občasno se lahko pojavijo bolezni sečil, redkeje pa pride do motnje reprodukcije in dojk. (24, 25)

1.5 Trimetazidin

Trimetazidin je antiishemično zdravilo z IUPAC imenom *1-(2,3,4-trimetoksibenzil)-piperazin*, empirično formulo $C_{14}H_{22}N_2O_3$ in molekulska masa 266,336 g/mol. Je presnovno zdravilo, katerega mehanizem delovanja je delno posledica učinka na celično presnovo. (26, 27)



Slika 3: Strukturna formula trimetazidina (28)

V fizioloških pogojih srce uporablja proste maščobne kisline kot primarni vir energije, ker so le-te sposobne tvoriti več ATP v primerjavi z oksidacijo glukoze. Oksidacija prostih maščobnih kislin v srcu je zapleten proces, ki zagotavlja skoraj 70 % srčne ATP na tešče, medtem ko se preostali del pridobi z oksidacijo konkurenčnih substratov, kot so laktat, piruvat in glukoza. Presnova prostih maščobnih kislin zahteva tudi večjo porabo kisika in je zato manj učinkovit vir energije v primerjavi s presnovo glukoze, ki teoretično zahteva 11–12 % manj kisika za dano količino proizvedenega ATP. (29)

V stanju ishemije, ko kisika primanjkuje, sta procesa oksidacije prostih maščobnih kislin in oksidacije glukoze motena. To vodi v še povečano oksidacijo prostih maščobnih kislin s še večjo porabo kisika, medtem ko se presnova glukoze zmanjša. Posledica teh dogodkov je akumulacija laktata, ki se v skrajnih primerih razvije do pojava metabolične acidoze. (29)

Trimetazidin selektivno zavira β -oksidacijo maščobnih kislin preko zaviranja dolgoverižne 3-ketoacil koencima A tiolaze (3-KAT), kar posledično poveča oksidacijo glukoze. 3-KAT katalizira končno stopnjo v β -oksidaciji maščobnih kislin. Okrepitev oksidacije glukoze izboljša energijske procese v celici, s čimer se v času ishemije ohranja ustrezna presnova energije. Trimetazidin tudi poveča aktivnost piruvat dehidrogenaze, ki je odgovorna za homeostazo med oksidacijo glukoze in glikolizo, ki je med ishemijo neuravnovešena. To se kaže v zmanjšani porabi kisika med sintezo ATP, proizvodnji protonov (H^+) in zmanjšani akumulaciji kalcijevih ionov (Ca^{2+}). Popravljen zaloga energije povzroči zmanjšano kopičenje natrija (Na^+) v citoplazmi kardiomiocitov, zmanjšano tvorbo reaktivnih kisikovih spojin (ROS) in zmanjšano infiltracijo nevtrofilcev. Celična membrana se stabilizira. (29, 30, 20, 31)

Zavrtje 3-KAT je pri terapevtskih koncentracijah trimetazidina približno 20- do 40-odstotno, zato je zdravilo varno in ga bolniki dobro prenašajo. Pogosti možni neželeni učinki so omotica, glavobol, bolečine v trebuhu, driska, prebavne motnje, slabost, bruhanje, izpuščaj, srbenje, koprivnica in občutek šibkosti. Med redke možne neželene učinke spadajo hitri ali nepravilni srčni utripi (palpitacije), dodatni srčni utripi, pospešen utrip srca, padec krvnega tlaka pri vstajanju, ki lahko povzroči omotico, vrtoglavico ali omedlevico, splošno slabo počutje, omotica, padec, zardevanje. Pri starejših bolnikih je izpostavljenost trimetazidinu lahko večja zaradi starostno pogojenega poslabšanja delovanja ledvic, zato so resni neželeni učinki pri tej populaciji ljudi tudi pogostejši. (26, 32, 33)

Trimetazidin se uporablja v kombinaciji z drugimi antianginoznimi zdravili. Za razliko od drugih antiishemičnih zdravil nima vpliva na krvni pretok, kontraktilnost, krvni tlak, srčni utrip in nivo glukoze, zato se priporoča tudi starejšim in srčnim bolnikom s sladkorno boleznijo in oslabljenim delovanjem levega prekata. (31, 32)

2 NAMEN DELA IN HIPOTEZA

Namen magistrske naloge bo preučevanje vpliva ranolazina in trimetazidina na koncentracijo in aktivnost katepsina S v serumu bolnikov s stabilno ishemično boleznijo srca.

V nalogi smo predpostavili naslednjo hipotezo: Pri bolnikih s stabilno ishemično boleznijo srca se po terapiji z ranolazinom ali trimetazidinom koncentracija in aktivnost katepsina S zniža.

Da bi hipotezo potrdili ali ovrgli, bomo določili koncentracijo in aktivnost katepsina S v serumu dveh skupin bolnikov. V prvi skupini bodo bolniki, ki bodo prejeli ranolazin, in v drugi skupini bolniki, ki bodo prejeli trimetazidin. Omenjena parametra bomo merili pred samo terapijo in po dvanajstih tednih zdravljenja.

3 PREISKOVANCI IN METODE

3.1 Preiskovanci

Preiskovanci so bili od 32 do 65 let stari moški z diagnozo stabilne koronarne bolezni, ki so že prejeli antiagregacijsko terapijo, zaviralce ACE oziroma sartane in kalcijeve antagoniste, zaviralce adrenergičnih receptorjev beta in statine oziroma druga antilipemična zdravila. Izključitveni kriteriji so bili: povišane vrednosti transaminaz nad trikratno normalno vrednostjo, huda ledvična insuficienca z vrednostjo kreatinina nad 200 $\mu\text{mol/L}$, akutno obolenje v obdobju 6 tednov pred vključitvijo, podaljšan interval QT v EKG ali motnje ritma torsade de pointes in preobčutljivost na ranolizin oziroma trimetazidin ali katero drugo kontraindikacijo za jemanje zdravila.

Raziskava je trajala 12 tednov. Preiskovanci so bili naključno razdeljeni v dve skupini. Ena skupina je prve 4 tedne prejela ranolizin v odmerku 375 mg dvakrat dnevno in naslednjih 8 tednov 500 mg dvakrat dnevno, druga skupina pa je vseh 12 tednov prejela trimetazidin dvakrat dnevno v odmerku 35 mg.

Preiskovancem smo na začetku terapije in po koncu terapije, po 12 tednih, odvzeli vzorce krvi za laboratorijske meritve koncentracije in aktivnosti katepsina S.

3.2 Določanje koncentracije katepsina S

3.2.1 Reagenti in kemikalije

- Monoklonska protitelesa proti (pro)katepsinu S (mAb 1E3; darilo prof. dr. Janka Kosa, UL-FFA, Ljubljana, Slovenija)
- Sekundarna protitelesa proti (pro)katepsinu S, označena s hrenovo peroksidazo (HRP) (anti-katS; darilo prof. dr. Janka Kosa, UL-FFA, Ljubljana, Slovenija)
- Standard katepsina S ((pro)katS; Enzo Life Sciences, Farmingdale, New York)
- Na_2CO_3
- NaHCO_3
- NaN_3

- NaCl
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- Tween 20
- Goveji serumski albumin (BSA; SIGMA-ALDRICH, St. Louis, Misuri, ZDA)
- Kromogeni substrat 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB; SIGMA-ALDRICH, St. Louis, Misuri, ZDA)
- Citronska kislina
- Destilirana voda (dH_2O)
- Klorovodikova kislina (HCl)
- Natrijev hidroksid (NaOH)

3.2.2 Laboratorijska oprema in pripomočki

- Pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- Sterilni nastavki za pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- Mikrocentrifugirke (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- Centrifugirke
- Mikrotitrna ploščica (Thermo Fisher Scientific, Waltham, ZDA)
- Aparat za spiranje mikrotitrskih ploščic (TECAN, Männedorf, Švica)
- Inkubator
- Vortex mešalo
- Tecan Safire 2 s programsko opremo Magellan (TECAN, Männedorf, Švica)

3.2.3 Pufri

Za določanje koncentracije katepsina S s testom ELISA smo morali pripraviti puffer A (za vezavo Ab/Ag na mikrotitrsko ploščico), puffer B (za spiranje), puffer C (za blokado in redčenje protiteles) in substratni puffer za TMB.

Preglednica I: Pufri za test ELISA za določitev koncentracije katepsina S

puffer A (pH = 9,6)	<ul style="list-style-type: none">• Na₂CO₃ 1,6 g• NaHCO₃ 2,94 g• NaN₃ 0,2 g• dH₂O 1 L
puffer B (pH = 7,2)	<ul style="list-style-type: none">• NaCl 8,5 g• Na₂HPO₄ · 2H₂O 1,34 g• NaH₂PO₄ · 2H₂O 2,94 g• Tween 20 0,5 g• dH₂O 1 L
puffer C	<ul style="list-style-type: none">• BSA 2 g• puffer B 100 mL
substratni puffer za TMB (pH = 6,0)	<ul style="list-style-type: none">• citronska kislina 21 g• Na₂HPO₄ · 2H₂O 17,8 g• dH₂O 1 L

Za pripravo pufra A, pufra B in substratnega pufra za TMB smo zahtevane sestavine za posamezen puffer (glej preglednico I) zatehtali in jih postopoma z mešanjem z magnetnim mešalom raztopili v 1 L destilirane vode. Za pripravo pufra C smo zahtevano količino BSA raztopili v pripravljenem pufri B.

Na pH-metru smo pomerili vrednost pH pripravljenih pufrov in zahtevano vrednost pH posameznega pufra dosegli z dodajanjem HCl in NaOH. Puffer A in substratni puffer za TMB smo nato hranili v hladilniku na 4–8 °C, puffer C v zamrzovalniku na –20 °C in puffer B na sobni temperaturi.

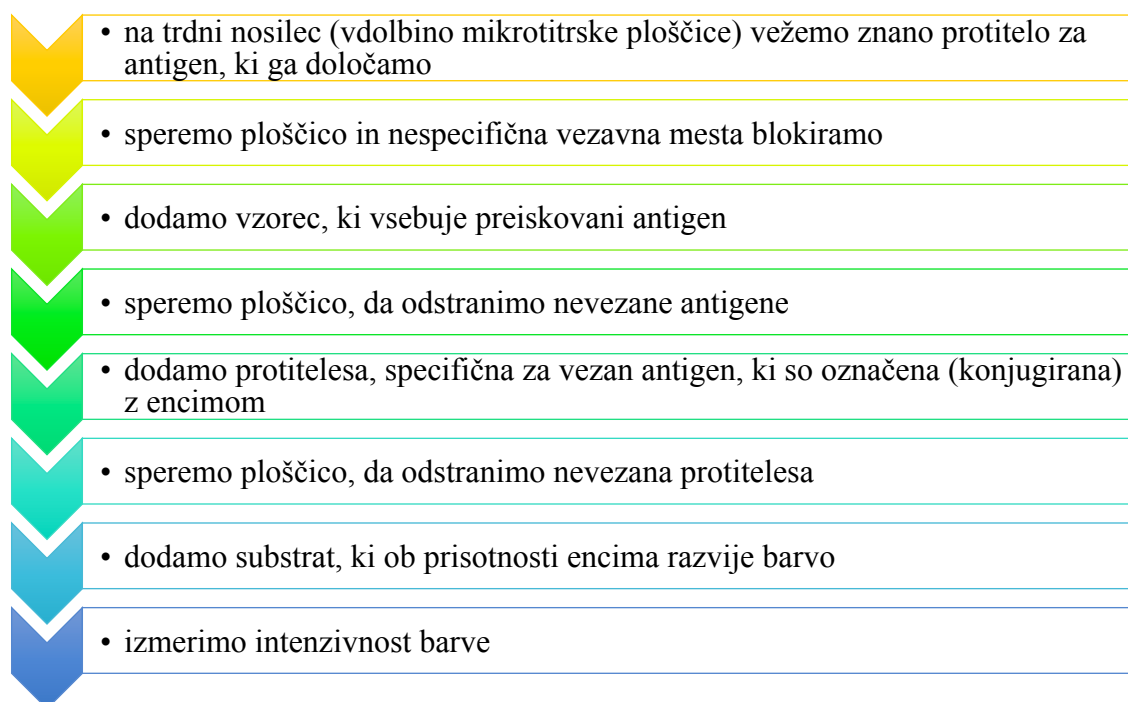
3.2.4 Princip postopka

Za določitev smo uporabili encimsko-immunski test ELISA. Ta se uporablja za zaznavanje protiteles ali antigenov v biološkem vzorcu. Za merjenje koncentracije protiteles se uporablja posredna ELISA, neposredna oziroma tudi tako imenovana »sendvič« ELISA pa

je prirejena za določanje antigenov. Pri obeh načinih ELISE je na zadnje dodano protitelo vezan encim, ki omogoči spremembo barve substrata in tako zaznavanje prisotnosti preiskovanega protitelesa ali antigena. V proučevanem primeru smo uporabili neposredno oziroma »sendvič« ELISO, kjer je kot antigen nastopal katepsin S.

OSNOVNI KORAKI NEPOSREDNE »SENDVIČ« ELISE

Preglednica II: Osnovni koraki testa ELISA



3.2.5 Opis postopka

Dan pred izvedbo testa ELISA smo na ledu odmrznili mAb 1E3 in jih v pufri A redčili v razmerju 1 : 640. V vsako luknjico na mikrotitrski plošči smo odpipetirali 50 μL ustrezno redčenih protiteles, ploščo pokrili z zaščitno folijo in jo preko noči inkubirali v hladilniku na 4–8 $^{\circ}\text{C}$.

Naslednji dan smo na avtomatskem spiralcu mikrotitrskih ploščic ploščo trikrat sprali s 100 μL pufra B in ploščo otresli na papirnato brisačo. Nespecifična vezavna mesta v luknjicah, prekritih z mAb 1E3, smo blokirali s 130 μL pufra C in inkubirali 30 min na sobni temperaturi.

Med časom inkubacije smo v čaši s toplo vodo odmrznili pufer C, na ledu pa standard katepsina S in serumske vzorce bolnikov. Pripravili smo redčitveno lestvico standarda in ustrezno redčene serumske vzorce bolnikov. Redčitveno lestvico standarda smo pripravili v pufru C z naslednjimi koncentracijami katepsina S: 132,2 µg/L (standard 1), 61,6 µg/L (standard 2), 30,8 µg/L (standard 3), 15,4 µg/L (standard 4), 7,7 µg/L (standard 5), 3,85 µg/L (standard 6) in 1,93 µg/L (standard 7). Kot negativno kontrolo smo uporabili pufer C. Serumske vzorce bolnikov smo v pufru C redčili v razmerju 1 : 1.

Po blokadi nespecifičnih vezavnih mest smo iz mikrotitrne ploščice odlili pufer C, ploščo otresli na papirnato brisačo in ponovno trikrat spirali s pufrom B. Po spiranju smo v luknjice odpipetirali 100 µL pripravljenih standardov in vzorcev in ploščo 2 uri inkubirali na 37 °C. Po 2 urah smo iz plošče odlili standarde in vzorce, ploščo otresli na papirnato brisačo in ponovno trikrat spirali s pufrom B.

V naslednjem koraku smo na ledu odmrznili protitelesa anti-katS, konjugirana s hrenovo peroksidazo, in jih v razmerju 1 : 9000 redčili v pufru C. Na ploščo smo v vdolbinice odpipetirali 100 µL ustrezno redčenih protiteles in jo ponovno 2 uri inkubirali na 37 °C v inkubatorju. Po zaključeni inkubaciji smo protitelesa iz plošče odlili, ploščo otresli na papirnato brisačo in še zadnjič trikrat spirali s pufrom B.

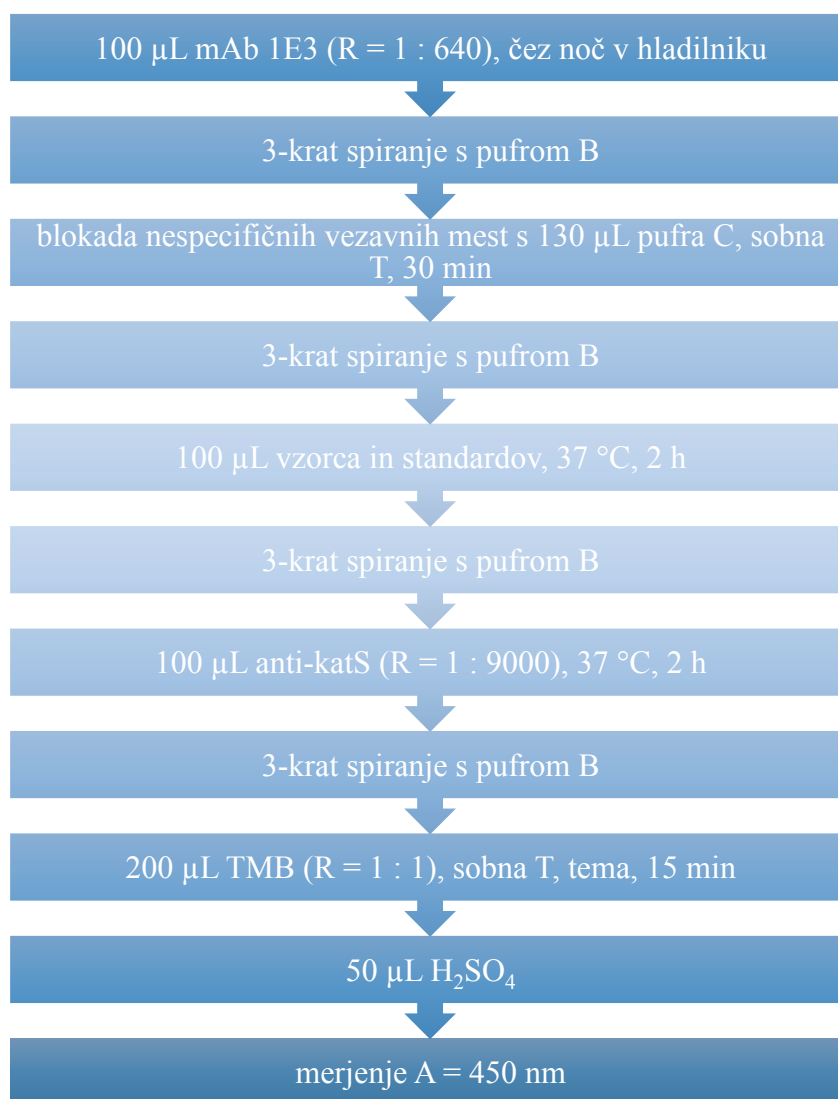
Substrat TMB in substratni pufer za TMB smo predhodno segreli na sobno temperaturo. Reagenta smo zmešali v razmerju 1 : 1. V luknjice smo odpipetirali 200 µL pripravljenega substrata in inkubirali 15 min na sobni temperaturi. Po 15 min smo reakcijo ustavili z dodatkom 50 µL 2 M H₂SO₄.

Prisotnost našega antigena, katepsina S, smo po izvedbi testa ELISA in končni spremembi barve substrata na mikrotitrskih ploščah določili spektrofotometrično s čitalcem mikrotitrskih ploščic Tecan Safire 2 in programsko opremo Magellan.



Slika 4: Čitalec mikrotitrskih ploščic Tecan Safire 2

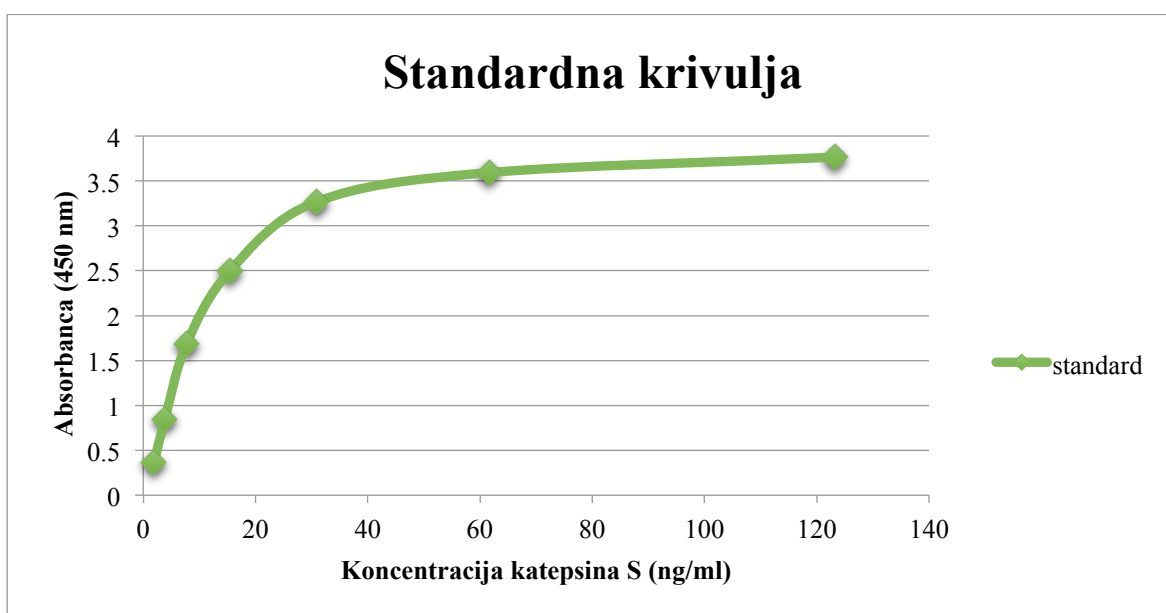
Preglednica III: Shematski prikaz postopka določanja koncentracije katepsina S s testom ELISA



3.2.6 Izračun rezultatov meritev

Čitalec mikrotitrskih ploščic Tecan Safire 2 smo sprogramirali tako, da nam je analizator izmeril absorbance pri valovni dolžini 450 nm. Iz izmerjenih absorbanc nam je program izračunal povprečje absorbanc duplikata vzorca in povprečje absorbanc duplikata vzorca z odšteto absorbanco slepega vzorca.

Koncentracijo katepsina S v posameznem vzorcu bolnika je program določil na podlagi povprečja absorbanc duplikata vzorca z odšteto absorbanco slepega vzorca in odčitanih sedmih redčitev standarda in iz njih izrisane standardne krivulje. Za končni rezultat smo dobljeno koncentracijo množili z 2, ker smo vzorce redčili v razmerju 1 : 1.



Slika 5: Standardna krivulja za test ELISA

Na osi X so nanešene znane koncentracije standarda katepsina S, na osi Y pa njihove povprečne absorbance z odšteto absorbanco slepega vzorca pri 450 nm.

3.3 Določanje aktivnosti katepsina S

3.3.1 Reagenti in kemikalije

- Sintetični fluorogeni substrat za katepsin S (Z-VVR-AMC; Enzo Life Sciences, Farmingdale, New York)
- Standard katepsina S ((pro)katS; Enzo Life Sciences, Farmingdale, New York)
- Dimetil sulfoksid (DMSO)
- Na₂HPO₄
- NaH₂PO₄ · H₂O
- Polietilen glikol 8000
- L-cistein
- Etilendiamintetraocetna kislina (EDTA; Sigma-Aldrich, St. Louis, Misuri, ZDA)
- Destilirana voda (dH₂O)

3.3.2 Laboratorijska oprema in pripomočki

- Pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- Sterilni nastavki za pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- Mikrocentrifugirke (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- Centrifugirke
- Črna mikrotitrna ploščica Nunc-Immuno™ MicroWell™ (Sigma-Aldrich, St. Louis, Misuri, ZDA)
- Vortex mešalo
- Vodna kopel
- Tecan Safire 2 s programsko opremo Magellan (TECAN, Männedorf, Švica)

3.3.3 Pufri

Za določanje aktivnosti katepsina S smo morali pripraviti osnovni in aktivacijski puffer.

Preglednica IV: Osnovni in aktivacijski pufer

osnovni pufer (pH = 6,5)

- Na₂HPO₄ 0,46885 g
- NaH₂PO₄ · H₂O 3,339 g
- polietilenglikol 8000 275 µL
- dH₂O 275 mL

aktivacijski pufer

- L-cistein 0,0302 g
- 0,5 M EDTA 150 µL
- osnovni pufer 50 mL

3.3.4 Princip postopka

Test aktivnosti katepsina S je kinetična meritev, pri kateri merimo hitrost pretvorbe substrata v produkt. Aktivnost encima podaja hitrost reakcije, ki je definirana kot sprememba koncentracije substrata v produkt v časovni enoti.

Za določanje aktivnosti katepsina S smo uporabili sintetični fluorogeni substrat Z-VVR-AMC. Z-VVR-AMC v svoji sestavi vsebuje kratko peptidno zaporedje aminokislin valin-valin-arginin, ki je označeno s fluorescenčnim 7-amino-metilkumarinom (AMC). Po cepitvi z encimom se AMC sprosti in sproščeni AMC kontinuirano kvantificiramo vsakih 15 sekund z merjenjem fluorescence na spektrofotometru Tecan Safire 2 pri temperaturi 37 °C.

3.3.5 Opis postopka

V prvem koraku smo substrat Z-VVR-AMC, (pro)katS in serumske vzorce bolnikov odmrznili na ledu. Za pripravo substrata Z-VVR-AMC smo uporabili 50 mM Z-VVR-AMC, ki smo ga z DMSO redčili na 10 mM Z-VVR-AMC, nato pa smo le-tega petdesetkrat redčili v osnovnem pufru. Pripravljeni substrat smo z aluminijevo folijo zaščitili pred svetlobo. Za pripravo pozitivne in negativne kontrole ter ustrezno redčenih serumskih vzorcev bolnikov smo uporabili aktivacijski pufer, ki smo ga predhodno segreli

na 37 °C. Za pozitivno kontrolo smo pripravili 30 nM koncentracijo (pro)katS, ki smo ga razredčili v aktivacijskem pufu. Za negativno kontrolo pa nam je služil aktivacijski puffer sam. Serumske vzorce bolnikov smo v aktivacijskem pufu redčili štirikrat.

Na mikrotitrsko ploščico smo odpipetirali 5 µL pripravljenega substrata in ploščo pokrili z aluminijevo folijo. Nato smo pripravljeno pozitivno kontrolo in serumske vzorce bolnikov, razredčene v aktivacijskem pufu, inkubirali 5–10 min na 37 °C v vodni kopeli. Po zaključeni inkubaciji v vodni kopeli smo na mikrotitrsko ploščico v najkrajšem možnem času odpipetirali 95 µL redčenih pripravljenih kontrol in serumskih vzorcev bolnikov ter ploščico takoj vstavili v analizator. Na čitalcu mikrotitrskih ploščic Tecan Safire 2 smo nastavili program za merjenje aktivnosti, ki poteka na 37 °C. Čitalec je meril 100 kinetičnih krogov s kinetičnim intervalom 15 s.

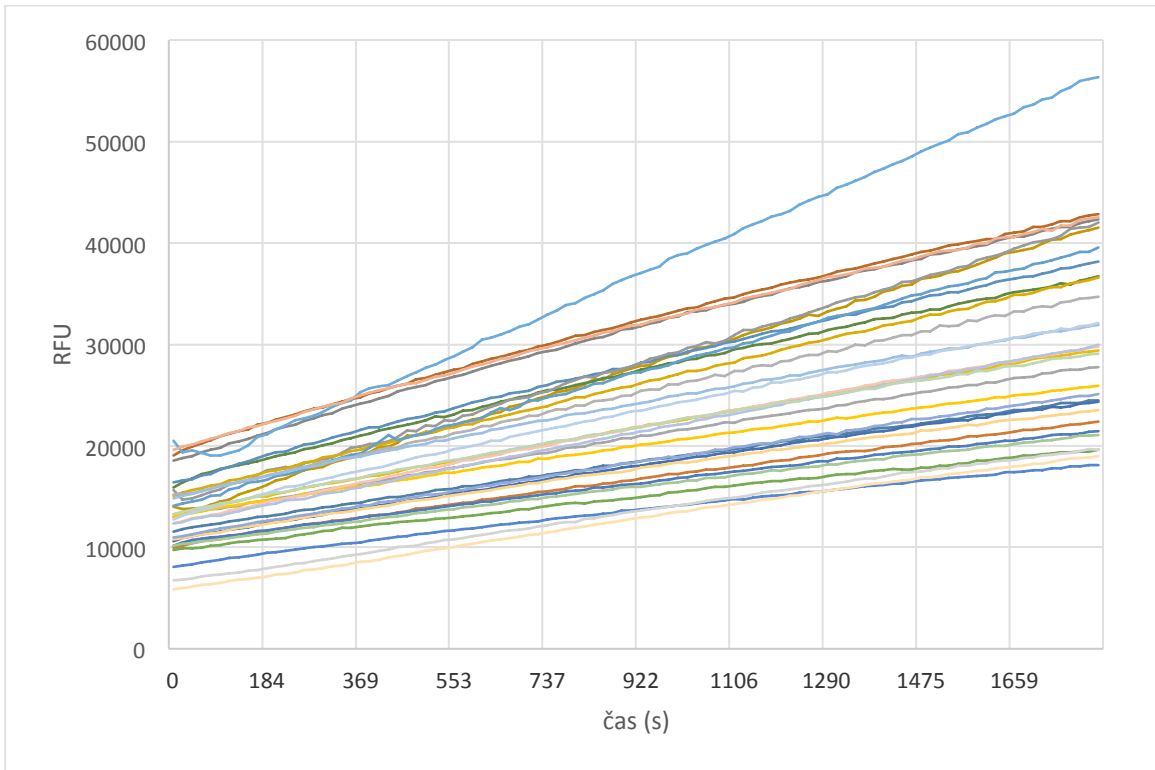
Čitalec je aktivnost katepsina S v serumskih vzorcih bolnikov pred in po terapiji podal v obliki naraščanja relativnih frekvenčnih enot na sekundo (RFU/s).

Preglednica V: Shematski prikaz postopka določanja aktivnosti katepsina S



3.3.6 Izračun rezultatov meritev

Čitalec mikrotitrskih ploščic smo sprogramirali tako, da je meril fluorescenco 100 kinetičnih krogov s kinetičnim intervalom 15 s. Po zaključeni meritvi smo narisali grafe hiperbolične časovne odvisnosti intenzitete fluorescence. Rezultate smo podali kot naklon krivulje v linearnem delu z enotami RFU/s.



Slika 6: Graf časovnega naraščanja fluorescence kot posledica aktivnosti katepsina S

3.4 Priporočila za izvedbo postopka določitve koncentracije in aktivnosti katepsina S

Za izvedbo postopka določitve koncentracije in aktivnosti katepsina S smo si pripravili načrt analize vzorcev. Določili smo, da bomo vzorce analizirali v dveh sklopih. V prvi sklop smo vključili 10 bolnikov, ki so prejeli ranolazin, in 10 bolnikov, ki so prejeli trimetazidin, v drugi sklop pa 11 bolnikov, ki so prejeli ranolazin, in 12 bolnikov, ki so prejeli trimetazidin. Za vsakega smo določili oznake vzorcev.

V posameznem sklopu smo analizo sočasno izvajali na dveh mikrotitrskih ploščicah, na katerih smo določali koncentracijo katepsina S, in na dveh mikrotitrskih ploščicah, na katerih smo določali aktivnost katepsina S. Na vsaki mikrotitrski ploščici smo vedno hkrati določili koncentracijo oziroma aktivnost katepsina S v serumu pred terapijo in v serumu po terapiji istega bolnika. Na vsaki mikrotitrski ploščici smo koncentracijo oziroma aktivnost katepsina S določili tudi kontrolnemu serumu, s katerim smo zagotovili ponovljivost med posameznimi meritvami. Vsak vzorec smo na mikrotitrsko ploščico nanašali v duplikatu.

V postopku določanja koncentracije katepsina S s testom ELISA smo bili še pozorni, da smo:

- mAb 1E3, ki so bili hranjeni v zamrzovalniku na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, pred redčenjem s pufrom A odmrznili na ledu,
- na ledu odmrznili tudi (pro)katepsin S, ki se je hranil v zamrzovalniku na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, serumske vzorce in sekundarna protitelesa proti (pro)katepsinu S, označena s hrenovo peroksidazo, hranjena v zamrzovalniku na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$,
- pufer C odmrznili v čaši s toplo vodo,
- substratni pufer za TMB pred uporabo segreli na sobno temperaturo (substratni pufer za TMB hranimo v hladilniku).

Prav tako smo pri izvedbi testa aktivnosti katepsina S pazili, da smo:

- uporabili aktivacijski pufer znotraj 14 dni od njegove priprave,
- po redčenju substrata Z-VVR-AMC z osnovnim pufrom pripravljen substrat zavili v ALU-folijo,
- uporabili črno mikrotitrsko ploščico,
- po odpipetiranju ustrezno redčenega substrata Z-VVR-AMC v vdolbinice na mikrotitrski ploščici ploščico pokrili z ALU-folijo,
- pred merjenjem preverili ustrezno temperaturo na čitalcu ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$),
- v vdolbinice na mikrotitrski ploščici čim hitreje odpipetirali ustrezno redčene kontrole in serumske vzorce ter pričeli z merjenjem.

3.5 Statistična analiza rezultatov

Rezultate meritev smo statistično obdelali s programsko opremo SPSS Statistic 23.

Najprej smo z Wilcoxonovim testom predznačenih rangov preverili, ali obstaja razlika v mediani koncentracije oziroma aktivnosti katepsina S, izmerjene pred in po terapiji z ranolazinom oziroma trimetazidinom. Naša ničelna hipoteza je bila, da je mediana razlike med izmerjeno koncentracijo oziroma aktivnostjo katepsina S pred terapijo in izmerjeno koncentracijo oziroma aktivnostjo katepsina S po terapiji z ranolazinom oziroma trimetazidinom enaka 0.

V nadaljevanju smo izvedli neparametrični parni t-test, s katerim smo poskušali ugotoviti, ali obstajajo dokazi, da je razlika v povprečnih vrednostih koncentracije oziroma aktivnosti katepsina S pred terapijo in koncentracije oziroma aktivnosti katepsina S po terapiji z ranolazinom oziroma trimetazidinom bistveno drugačna od nič. Test nam kot rezultat poda tri tabele, v prvi je zbrana opisna statistika (srednja vrednost, velikost vzorca, standardni odklon in standardna napaka), v drugi je prikazana korelacija in v tretji tabeli je rezultat testa hipoteze. Za statistično pomembno je vzeta vrednost $p < 0,05$.

S statističnim programom SPSS smo želeli ugotoviti tudi povezanost oziroma zvezo med dvema spremenljivkama. Naredili smo bivariantno statistično analizo, s katero smo določili Spearmanov koeficient. Spearmanov koeficient je statistični test, s katerim merimo moč monotonosti med pari podatkov. Koeficient lahko zavzame vrednosti med -1 in 1 . Bližje kot je povezanost eni izmed vrednosti, močnejša je monotona povezanost.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Cilj naše raziskave je bil ugotoviti, ali dodatno zdravljenje z ranolazinom oziroma trimetazidinom pri bolnikih s stabilno kronično ishemično boleznijo, ki že prejemajo vsa zdravila po veljavnih smernicah, in urejenimi dejavniki tveganja vpliva na koncentracijo oziroma aktivnost katepsina S. Ugotovili smo, da nobeno izmed navedenih zdravil ne vpliva na koncentracijo oziroma aktivnost katepsina S.

Katepsin S je lizosomski encim. Lizosomski encimi razgrajujejo poškodovane ali nepotrebne proteine v endolizosomski poti. Lizosomski katepsini pomagajo vzdrževati homeostazo presnove celice s sodelovanjem pri razgradnji heterofagičnega in avtofagičnega materiala. (34, 35)

Zunajcelična aktivnost katepsina S je močno proaterogena. Katepsini ne delujejo samo pri razgradnji endolizosomnih proteinov, temveč tudi pri preoblikovanju tkiv z razgradnjo ZCM. Sinteza katepsina S je zvečana pri osebah s prekomerno telesno težo. Povečanje katepsina S v maščobnem tkivu povzroča lokalno razgradnjo fibronektinskega omrežja, ki je ključna komponenta ZCM in podpira razvoj maščobne mase. Glede na razširjene funkcije katepsinov v različnih patoloških procesih ni presenetljivo, da imajo katepsini ključno vlogo tudi pri srčno-žilnih boleznih.

V arterijah katepsine izraža večina celic aterosklerotičnega plaka, vključno z makrofagi, endotelijskimi celicami in gladkomišičnimi celicami. Različne študije so pokazale, da je izražanje informacijske ribonukleinske kisline (mRNA) za katepsina S povečano v mišjih, kot tudi v človeških aterosklerotičnih lezijah, ne pa tudi v normalnih arterijah (36). Ugotovili so tudi, da pomanjkanje katepsina S pri pomanjkanju LDL receptorjev zaščiti miši pred aterosklerozo z zmanjšano hitrostjo nastajanja aterosklerotičnega plaka in zmanjšanjem aktivnosti elastaze. Poleg tega je pomanjkanje katepsina S povzročilo zmanjšano vsebnost gladkomišičnih celic in kolagena ter zmanjšalo debelino fibroznega pokrova aterosklerotičnega plaka. (16)

Aterosklerotične lezije imajo pri miših, kot tudi pri človeku, nizko vsebnost cistatina C, naravnega inhibitorja katepsina S, medtem ko so normalne arterije bogate s cistatinom C.

Pomanjkanje cistatina C pri miših znatno poveča velikost aterosklerotičnega plaka in elastolično aktivnost, kar kaže na pomembno vlogo cistatina C pri aterosklerozi. (16)

Z namenom iskanja kakršnekoli, tudi najmanjše možne povezave ranolazina in trimetazidina z mehanizmi delovanja katepsina S, smo pregledali vso objavljeno literaturo. Zasedili smo nekaj študij, ki sledijo, žal pa nobene, ki bi preučevala povezavo ranolazina oziroma trimetazidina s katepsinom S. (37-40)

V razpoložljivi literaturi smo odkrili študijo o ranolazinu v povezavi z razgradnjo ZCM, ki je pokazala, da je ranolazin zaviral pozni tok natrijevih ionov v celicah raka dojke in zmanjšal invazivnost rakavih celic. Natrijevi kanali so prekomerno izraženi v tumorjih dojke in njihova raven izražanja je povezana s pojavom metastaz in smrtjo bolnikov. Ugotovljeno je bilo, da povečano izražanje natrijevih kanalov zveča razgradnjo ZCM in zveča invazivnost metastaziranja pri raku dojke. Ranolazin tako predstavlja farmakološko orodje za zaviranje metastatskega razvoja in izboljša zdravljenje raka. (37)

Prav tako je bilo v eni izmed študij dokazano, da katepsin S aktivira epiteljske Na kanale, ki so lokalizirani v apikalni membrani aldosteronsko občutljivega distalnega nefrona, distalnega kolona, v respiratornem epiteliju ter kanalih znojnih žlez in slin. Neustrezna aktivacija teh kanalov s peptidazami, kot je katepsin S, lahko prispeva k razvoju cistične fibroze in bi lahko bila vključena v zadrževanje natrija in patogenezo arterijske hipertenzije v okviru ledvične bolezni. Žal pa v tem primeru ne gre za iste Na kanalčke, na katere deluje ranolazin. (38)

Raziskav o trimetazidinu, natančneje o povezavah tiolaze s katepsinom S, ni. Jih je pa kar nekaj o povezavi tiolaze z rakom. Več predhodnih študij je poročalo, da je v patogenezo, prognozo in terapevtsko odpornost človeškega raka vključen gen HADHA, ki kodira alfa podenoto mitohondrijskega trifunkcijskega proteina (hidroksiacil koencim A dehidrogenaza/3-ketoacil koencim A tiolaza/enoil koencim A hidrataza), ki katalizira zadnje tri korake mitohondrijske beta-oksidacije maščobnih kislin z dolgimi verigami. Mitohondrijski membransko vezan heterokompleks je sestavljen iz štirih alfa in štirih beta podenot, pri čemer beta podenota katalizira aktivnost 3-KAT. V raziskavi, ki so jo izvedli Mamtani in sod., so preučevali izražanje genov, vključenih v metabolizem maščob in

lipidov, med njimi tudi gena HADHA, in odkrili njegovo vpletenost v karcinogenezo raka dojke. (39, 40) V nobeni izmed objavljenih raziskav o trimetazidinu in tiolazi pa nismo odkrili povezave s katepsinom S.

V literaturi nismo našli, da bi kdo raziskoval povezavo ranolazina oziroma trimetazidina s katepsinom S. Naša raziskava je po do sedaj znanih podatkih prva primerjala vpliv ranolazina in trimetazidina na koncentracijo katepsina S v serumu bolnikov s stabilno ishemično boleznijo srca.

V serumskih vzorcih bolnikov so bile določene naslednje koncentracije in aktivnosti katepsina S:

Preglednica VI: Rezultati meritev koncentracije in aktivnosti katepsina S v serumskih vzorcih bolnikov

Bolnik	Zdravilo	Koncentracija katepsina S (ng/mL) pred terapijo	Koncentracija katepsina S (ng/mL) po terapiji	Aktivnost katepsina S (RFU/s) pred terapijo	Aktivnost katepsina S (RFU/s) po terapiji
Bolnik 1	ranolazin	5,62	6,33	11,53	8,65
Bolnik 2	trimetazidin	7,34	5,86	10,68	12,28
Bolnik 3	ranolazin	6,06	5,54	7,50	7,06
Bolnik 4	trimetazidin	9,21	8,91	12,59	11,64
Bolnik 5	ranolazin	10,09	13,43	7,22	5,83
Bolnik 6	trimetazidin	12,33	7,27	5,23	6,74
Bolnik 7	ranolazin	37,53	19,63	9,29	9,44
Bolnik 8	trimetazidin	11,35	25,29	15,26	14,79
Bolnik 9	ranolazin	41,86	56,29	premalo vzorca	13,78
Bolnik 10	trimetazidin	11,66	12,27	premalo vzorca	21,15
Bolnik 11	ranolazin	9,19	7,23	9,81	10,41

Bolnik 12	trimetazidin	6,14	6,79	18,48	11,96
Bolnik 13	ranolazin	10,48	12,97	14,23	14,66
Bolnik 14	trimetazidin	5,12	5,22	16,14	16,04
Bolnik 15	ranolazin	10,96	7,02	18,47	24,02
Bolnik 16	trimetazidin	9,49	7,83	16,97	20,23
Bolnik 17	ranolazin	11,31	16,12	19,30	18,09
Bolnik 18	trimetazidin	14,20	10,08	16,09	16,32
Bolnik 19	ranolazin	12,03	5,59	22,39	36,79
Bolnik 20	trimetazidin	11,43	11,59	19,25	13,42
Bolnik 21	ranolazin	9,07	7,30	11,66	24,25
Bolnik 22	trimetazidin	5,81	9,57	8,98	10,44
Bolnik 23	ranolazin	9,86	8,76	15,89	39,53
Bolnik 24	trimetazidin	11,42	11,98	29,27	11,22
Bolnik 25	ranolazin	7,69	6,38	18,66	17,37
Bolnik 26	trimetazidin	6,48	6,41	31,22	17,29
Bolnik 27	ranolazin	6,62	5,70	20,97	16,28

Bolnik 28	trimetazidin	7,96	8,68	32,67	26,65
Bolnik 29	ranolazin	5,31	4,83	22,53	20,34
Bolnik 30	trimetazidin	7,13	7,57	12,31	19,22
Bolnik 31	ranolazin	10,06	9,25	42,16	19,80
Bolnik 32	trimetazidin	5,68	6,70	20,95	19,14
Bolnik 33	ranolazin	10,15	9,99	26,60	47,35
Bolnik 34	trimetazidin	10,93	33,82	13,31	14,36
Bolnik 35	ranolazin	10,05	11,69	19,04	14,49
Bolnik 36	trimetazidin	10,75	10,21	18,76	21,75
Bolnik 37	ranolazin	5,22	5,84	21,67	23,50
Bolnik 38	trimetazidin	13,04	5,18	14,23	35,48
Bolnik 39	ranolazin	7,43	9,09	11,79	19,03
Bolnik 40	trimetazidin	9,41	9,89	31,74	19,06
Bolnik 41	ranolazin	7,66	4,85	28,98	23,92
Bolnik 42	trimetazidin	14,45	12,56	17,91	21,34
Bolnik 43	trimetazidin	11,15	12,97	11,85	11,52

Rezultate meritev smo nato statistično ovrednotili in pokazali, da razliki v mediani koncentracije katepsina S, izmerjene pred in po terapiji z ranolazinom oziroma trimetazidinom, nista statistično značilni ($p > 0,05$). Rezultati so zbrani v preglednicah VII in VIII.

Preglednica VII: Rezultati Wilcoxonovega testa predznačenih rangov – razlika v mediani koncentracije katepsina S, izmerjene pred in po terapiji z ranolazinom

Ničelna hipoteza	Vrednost p	Rezultat
Mediana razlik med koncentracijo katepsina S pred terapijo in koncentracijo katepsina S po terapiji je enaka 0	0,543	Ohranimo ničelno hipotezo

Legenda: p – statistična značilnost

Preglednica VIII: Rezultati Wilcoxonovega testa predznačenih rangov – razlika v mediani koncentracije katepsina S, izmerjene pred in po terapiji s trimetazidinom

Ničelna hipoteza	Vrednost p	Rezultat
Mediana razlik med koncentracijo katepsina S pred terapijo in koncentracijo katepsina S po terapiji je enaka 0	0,638	Ohranimo ničelno hipotezo

Legenda: p – statistična značilnost

Prav tako nismo pokazali razlik v mediani aktivnosti katepsina S izmerjene pred in po terapiji z ranolazinom oziroma trimetazidinom ($p > 0,05$) (glej preglednici IX in X).

Preglednica IX: Rezultati Wilcoxonovega testa predznačenih rangov – razlika v mediani aktivnosti katepsina S, izmerjene pred in po terapiji z ranolazinom

Ničelna hipoteza	Vrednost p	Rezultat
Mediana razlik med aktivnostjo katepsina S pred terapijo in aktivnostjo katepsina S po terapiji je enaka 0	0,709	Ohranimo ničelno hipotezo

Legenda: p – statistična značilnost

Preglednica X: Rezultati Wilcoxonovega testa predznačenih rangov – razlika v mediani aktivnosti katepsina S, izmerjene pred in po terapiji s trimetazidinom

Ničelna hipoteza	Vrednost p	Rezultat
Mediana razlik med aktivnostjo katepsina S pred terapijo in aktivnostjo katepsina S po terapiji je enaka 0	0,970	Ohranimo ničelno hipotezo

Legenda: p – statistična značilnost

Vrednosti koncentracije oziroma aktivnosti katepsina S pred in po terapiji smo primerjali tudi s parnim t-testom. Rezultati so zbrani v preglednicah XI in XII.

Preglednica XI: Rezultati neparametričnega parnega t-testa za ranolazin

	Povprečje razlik	Standardna deviacija	Standardna napaka	Vrednost t	Vrednost p
kCTSSpred kCTSSpo	0,496190	5,688202	1,241267	0,400	0,694
aCTSSpred aCTSSpo	-2,05600	10,11640	2,26210	-0,909	0,375

Legenda: kCTSSpred – koncentracija katepsina S pred terapijo z ranolazinom, kCTSSpo – koncentracija katepsina S po terapiji z ranolazinom, aCTSSpred – aktivnost katepsina S pred terapijo z ranolazinom, aCTSSpo – aktivnost katepsina S po terapiji

Preglednica XII: Rezultati neparametričnega parnega t-testa za trimetazidin

	Povprečje razlik	Standardna deviacija	Standardna napaka	Vrednost t	Vrednost p
kCTSSpred kCTSSpo	-1,098636	6,269960	1,336760	-0,822	0,420
aCTSSpred aCTSSpo	0,85850	8,23321	1,84100	0,466	0,646

Legenda: **kCTSSpred** – koncentracija Katepsina S pred terapijo s trimetazidinom, **kCTSSpo** – koncentracija Katepsina S po terapiji s trimetazidinom, **aCTSSpred** – aktivnost Katepsina S pred terapijo s trimetazidinom, **aCTSSpo** – aktivnost Katepsina S po terapiji s trimetazidinom

Pričakovano smo tudi v tem primeru pokazali, da ni bilo razlik med koncentracijo Katepsina S pred terapijo in koncentracijo Katepsina S po terapiji z ranolazinom ($p > 0,05$) oziroma trimetazidinom ($p > 0,05$). Prav tako ni bilo razlike med aktivnostjo Katepsina S pred terapijo in aktivnostjo Katepsina S po terapiji z ranolazinom ($p > 0,05$) oziroma trimetazidinom ($p > 0,05$).

Iz predhodno nanizanih podatkov lahko zaključimo, da terapija z ranolazinom oziroma trimetazidinom ne spreminja koncentracije oziroma aktivnosti Katepsina S pri bolnikih z diagnozo stabilne koronarne bolezni, ki so bili 12 tednov na terapiji z ranolazinom oziroma trimetazidinom in so že prejeli antiagregacijsko terapijo, zaviralce ACE oziroma sartane in kalcijeve antagoniste, zaviralce adrenergičnih receptorjev beta in statine oziroma druga antilipemična zdravila.

Vsi bolniki, ki so bili vključeni v našo raziskavo, so bili že predhodno zdravljeni z vsemi antiishemičnimi zdravili po veljavnih smernicah in so imeli urejene vse dejavnike tveganja za aterosklerozo. Te terapije med preiskavo nismo spreminjali. Ravno to je mogoče eden izmed vzrokov zakaj ni prišlo do razlik v koncentraciji in aktivnosti Katepsina S pred in po zdravljenju z ranolazinom in trimetazidinom. Ena izmed raziskav (41) je namreč pokazala, da zdravljenje z atorvastatinom zmanjša tako koncentracijo kot tudi aktivnost Katepsina S. Vendar je bilo tudi v tej raziskavi znižanje opazno samo pri bolnikih s fenotipom B LDL holesterola. Že na začetku te raziskave sta bili koncentracija in aktivnost Katepsina S povezani s povečano koncentracijo majhnih, gostih delcev LDL. Izboljšanje LDL podrazreda po terapiji z atorvastatinom je bilo povezano z zmanjšanjem koncentracije in

aktivnosti Katepsina S. Z veliko verjetnostjo lahko sklepamo, da so imeli naši bolniki že na začetku raziskave nizke vrednosti tako koncentracije kot aktivnosti Katepsina S, saj so bili povprečno zdravljeni z večjimi odmerki statinov kot v prej omenjeni raziskavi. Vsi naši bolniki so bili predhodno zdravljeni tudi že z antagonisti beta adrenergičnih receptorjev in ACE zaviralci ali sartani, tako da bi lahko bil tudi to vzrok, da nismo zaznali vpliva preučevanih zdravil na koncentracijo in aktivnost Katepsina S, vendar kliničnih raziskav o tem nimamo.

Predvidevamo, da z merjenjem koncentracije in aktivnosti Katepsina S ni mogoče spremljati učinkovitosti terapije z ranolazinom oziroma trimetazidinom. Je pa to področje, ki omogoča še veliko raziskovanja, morda v povezavi z mehanizmom delovanja VEGF, ki prav tako aktivno sodeluje v procesu aterogeneze in razvoju ishemične bolezni srca (42).

Želeli smo tudi preveriti povezave oziroma korelacije med koncentracijo oziroma aktivnostjo Katepsina S pred terapijo in koncentracijo oziroma aktivnostjo Katepsina S po terapiji z ranolazinom oziroma trimetazidinom. Rezultati so zbrani v preglednicah XIII in XIV.

Preglednica XIII: Spearmanova koeficienta korelacije med koncentracijo oziroma aktivnostjo Katepsina S pred in po terapiji z ranolazinom

	vrednost	kCTSSpo	aCTSSpo
kCTSSpred	r	0,710	
	p	0,000	
aCTSSpred	r		0,647
	p		0,002

Legenda: **r** – koeficient korelacije, **p** – statistična značilnost, **kCTSSpred** – koncentracija Katepsina S pred terapijo z ranolazinom, **kCTSSpo** – koncentracija Katepsina S po terapiji z ranolazinom, **aCTSSpred** – aktivnost Katepsina S pred terapijo z ranolazinom, **aCTSSpo** – aktivnost Katepsina S po terapiji z ranolazinom

Preglednica XIV: Spearmanova koeficienta korelacije med koncentracijo oziroma aktivnostjo Katepsina S pred in po terapiji s trimetazidinom

	vrednost	kCTSSpo	aCTSSpo
kCTSSpred	r	0,512	
	p	0,015	
aCTSSpred	r		0,517
	p		0,020

Legenda: **r** – koeficient korelacije, **p** – statistična značilnost, **kCTSSpred** – koncentracija Katepsina S pred terapijo s trimetazidinom, **kCTSSpo** – koncentracija Katepsina S po terapiji s trimetazidinom, **aCTSSpred** – aktivnost Katepsina S pred terapijo s trimetazidinom, **aCTSSpo** – aktivnost Katepsina S po terapiji s trimetazidinom

Iz rezultatov v preglednici XIII je razvidno, da obstaja močna korelacija med koncentracijo Katepsina S pred terapijo in koncentracijo Katepsina S po terapiji z ranolazinom ($r = 0,710$, $p < 0,001$). To pomeni, da če smo določili visoko oziroma nizko koncentracijo Katepsina S pred terapijo, smo visoko oziroma nizko koncentracijo določili tudi po terapiji z ranolazinom. Prav tako je močna povezava med aktivnostjo Katepsina S pred terapijo in aktivnostjo Katepsina S po terapiji z ranolazinom ($r = 0,647$, $p = 0,002$).

Iz rezultatov v preglednici XIV je razvidno, da obstaja šibka pozitivna korelacija med koncentracijo Katepsina S pred terapijo in koncentracijo Katepsina S po terapiji s trimetazidinom ($r = 0,512$, $p = 0,015$). Šibka pozitivna korelacija obstaja tudi med izmerjeno aktivnostjo Katepsina S pred terapijo in izmerjeno aktivnostjo Katepsina S po terapiji s trimetazidinom ($r = 0,517$, $p = 0,020$).

Katepsin S smo izmerili z dvema različnima pristopoma, skozi koncentracijo proteina in skozi njegovo aktivnost kot encima. Zato nas je zanimalo, ali obstaja povezava med izmerjeno koncentracijo in aktivnostjo pred terapijo in izmerjeno koncentracijo in aktivnostjo po terapiji za obe zdravili. Rezultati so zbrani v preglednicah XV in XVI.

Preglednica XV: Spearmanova koeficienta korelacije med koncentracijo in aktivnostjo Katepsina S pred terapijo in po terapiji z ranolazinom

	vrednost	aCTSSpred	aCTSSpo
kCTSSpred	r	-0,035	
	p	0,885	
kCTSSpo	r		-0,262
	p		0,251

Legenda: r – koeficient korelacije, p – statistična značilnost, **kCTSSpred** – koncentracija Katepsina S pred terapijo z ranolazinom, **kCTSSpo** – koncentracija Katepsina S po terapiji z ranolazinom, **aCTSSpred** – aktivnost Katepsina S pred terapijo z ranolazinom, **aCTSSpo** – aktivnost Katepsina S po terapiji z ranolazinom

Preglednica XVI: Spearmanova koeficienta korelacije med koncentracijo in aktivnostjo Katepsina S pred terapijo in po terapiji s trimetazidinom

	vrednost	aCTSSpred	aCTSSpo
kCTSSpred	r	-0,090	
	p	0,699	
kCTSSpo	r		-0,106
	p		0,646

Legenda: r – koeficient korelacije, p – statistična značilnost, **kCTSSpred** – koncentracija Katepsina S pred terapijo s trimetazidinom, **kCTSSpo** – koncentracija Katepsina S po terapiji s trimetazidinom, **aCTSSpred** – aktivnost Katepsina S pred terapijo s trimetazidinom, **aCTSSpo** – aktivnost Katepsina S po terapiji s trimetazidinom

Iz rezultatov v preglednicah XV in XVI je razvidno, da ni mogoče dokazati povezave med izmerjeno koncentracijo in aktivnostjo Katepsina S pred terapijo z ranolazinom ($p > 0,05$) oziroma trimetazidinom ($p > 0,05$) niti povezave med izmerjeno koncentracijo in aktivnostjo Katepsina S po terapiji z ranolazinom ($p > 0,05$) oziroma trimetazidinom ($p > 0,05$).

Vzroka za odsotnost povezave med koncentracijo in aktivnostjo Katepsina S nismo pojasnili. Možne razlage bi lahko bile v značilnostih sinteze in aktivacije Katepsina S. Katepsin S se sintetizira kot preproencim. Po vstopu v ER se prepeptid odstrani. Prokatepsin S se nato transportira v Golgijev aparat (GA), kjer se modificira z

glikozilacijo, fosforilacijo, sestavijo se tudi disulfidne vezi. Po modifikaciji se usmeri v lizosom preko manoza-6-fosfatnega receptorja. N-terminalni propeptid deluje kot avtoinhibitor in substratom onemogoča dostop do aktivnega mesta encima. Prokatepsin S se lahko avtokatalitsko aktivira pri pH 4,5 z odstranitvijo N-terminalnega peptida. Nastane aktiven, zrel katepsin S, ki je enoverižen polipeptid. Aktiven katepsin S je mogoče nadzorovati s prisotnostjo znanih endogenih inhibitorjev iz družine cistatinov, natančneje cistatina C, ki ima pomembno vlogo pri uravnavanju proteolitske aktivnosti v fizioloških pogojih. (43)

Na podlagi tega lahko sklepamo, da z določitvijo koncentracije katepsina S poleg aktivne oblike določimo tudi neaktivno obliko katepsina S, zato pričakovane povezave ne moremo dokazati. Povezavo bi morda lahko dobili z bolj specifično izbiro monoklonskih protiteles proti katepsinu S, s katerimi bi detektirali samo aktivno obliko encima, ali pa z izračunom deleža aktivnega katepsina S glede na izmerjeno celokupno koncentracijo, tako pred terapijo, kot tudi po terapiji. Povezavo bi lahko morda našli tudi samo po terapiji z ranolazinom in trimetazidinom, če bi terapija kakorkoli vplivala na sintezo ali aktivacijo katepsina S, vendar tega žal ni bilo mogoče dokazati.

Zdravili, kot sta ranolazin in trimetazidin, najverjetneje ne spreminjata sinteze in poti aktivacije katepsina S in verjetno niti prehajanja katepsina S v zunajcelični prostor. Katepsin S je sicer lizosomski encim, ki deluje znotraj lizosomov, v različnih patoloških stanjih, ki lahko izzovejo nekrozo celic, ali pa pride do pospešene fiziološke apoptoze celic, pa so zaznali njegovo prehajanje iz endosomalnih in lizosomalnih veziklov v zunajcelični prostor. Ranolazin in trimetazidin po vsej verjetnosti ne spreminjata niti izražanja gena katepsina S, ki z zvečanim izražanjem v žilni steni spremlja ali aktivno sodeluje pri razvoju in destabilizaciji koronarne aterosklerotične lehe. Stern in sod. so v plazmi bolnikov s koronarno aterosklerozo želeli z neinvazivnim diagnostičnim pristopom preučiti zunajcelično izražanje gena katepsina S. Dokazano je bilo, da so bolniki s koronarno aterosklerozo imeli zvišan plazemski nivo mRNA CTSS, kar potrjuje pomembno vlogo katepsina S v aterogenezi. (44)

Preglednica XVII: Spearmanova koeficienta korelacije za koncentracijo in aktivnost katepsina S za obe zdravili skupaj

	vrednost	aCTSSpred	aCTSSpo
kCTSSpred	r	-0,055	
	p	0,730	
kCTSSpo	r		-0,238
	p		0,129

Legenda: **r** – koeficient korelacije, **p** – statistična značilnost, **kCTSSpred** – koncentracija katepsina S pred terapijo, **kCTSSpo** – koncentracija katepsina S po terapiji, **aCTSSpred** – aktivnost katepsina S pred terapijo, **aCTSSpo** – aktivnost katepsina S po terapiji

V preglednici XVII sta prikazani korelaciji med koncentracijo in aktivnostjo katepsina S pred oziroma po terapiji, tokrat za vse bolnike skupaj, torej ne ločeno po posameznem zdravilu. Analizo smo naredili, da bi povečali število preiskovancev in s tem verodostojnost statističnega testa. Pričakovano tudi tokrat nismo našli korelacije med koncentracijo in aktivnostjo katepsina S. Možne vzroke za odsotnost povezave pa smo pojasnili že v prejšnjem odstavku.

5 SKLEP

V magistrski nalogi smo želeli preučiti vpliv ranolazina in trimetazidina na koncentracijo oziroma aktivnost katepsina S v serumu bolnikov z ishemično boleznijo srca.

Glavne ugotovitve magistrske naloge so:

- Zdravljenje z ranolazinom (dvakrat dnevno 375 mg prve 4 tedne in dvakrat dnevno 500 mg naslednjih 8 tednov) in trimetazidinom (dvakrat dnevno 35 mg 12 tednov) ne vpliva na koncentracijo in aktivnost katepsina S v serumu.
- Koncentracija in aktivnost katepsina S, izmerjeni pred terapijo (tako v skupini bolnikov, zdravljenih z ranolazinom, kot tudi v skupini bolnikov, zdravljenih s trimetazidinom), sta povezani s koncentracijo in aktivnostjo katepsina S, izmerjenima po terapiji.
- Pri zdravljenju z ranolazinom in trimetazidinom koncentracija katepsina S ni korelirala z aktivnostjo encima v serumu, tako pred kot po terapiji.

Iz zgoraj naštetih glavnih ugotovitev lahko zaključimo, da zdravlili ne znižujeta koncentracije in aktivnosti katepsina S v serumu bolnikov z diagnozo stabilne koronarne bolezni, ki so bili 12 tednov na terapiji z ranolazinom oziroma trimetazidinom, in s tem ovržemo v uvodnem delu naloge postavljeno hipotezo.

6 LITERATURA

- (1) Bajrović F: Temelji patofiziologije s fiziologijo za študente zdravstvenih ved, Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta Ljubljana, 2015: 55-56.
- (2) Kozak M, Blinc A: Obravnava bolnikov z aterosklerotično boleznijo arterij, Združenje za žilne bolezni, Slovensko zdravniško društvo, Maribor, 2012: 1-11.
- (3) Ribarič S: Temelji patološke fiziologije, Inštitut za patološko fiziologijo, Medicinska fakulteta Ljubljana, 2009: 176-179.
- (4) Košnik M, Mrevlje F, Štajer D: Interna medicina, Littera picta, Ljubljana, 2011: 241-264.
- (5) Blinc A, Kozak M, Šabovič M: Žilne bolezni pri osebah z ogrožajočimi spremljajočimi bolezenskimi stanji, Medicinski razgledi, 2003: 1-8.
- (6) Kumar P, Clark M: Clinical medicine, Fourth edition, W. B. Saunders, London, 1998: 685-686.
- (7) Gorjup V, Kamenik B, Kanič V, Lainščak M, Letonja M, Lobnik A, Nedog V, Pehnc Z, Pirnat M, Puklavc L, Sinkovič A, Šeruga T, Voga G, Štajer D, Vadnjak DS, Vokač D: Izbrana poglavja o srčno-žilnih boleznih, Prva izdaja, Medicinska fakulteta Maribor, 2015: 118-133.
- (8) Mitchell RN, Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Eight Edition, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2010: 545-558.
- (9) Rawlings ND, Waller M, Barrett AJ, Bateman A: MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. Nucleic Acids Research 2014; 42: 503-509.
- (10) Lutgens PMS, Cleutjens BJMK, Daemen JAPM, Heeneman S: Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease. Cardiovascular Research Institute Maastricht, Maastrich University 2017.
- (11) Xu J, Wang H, Ding K, Lu X, Li T, Wang J, Wang C, Wang J: Inhibition of Cathepsin S Produces Neuroprotective Effects after Traumatic Brain Injury in Mice. Mediators of inflammation 2013.
- (12) McGrath ME, Palmer JT, Brümme D, Somoza JR: Crystal structure of human cathepsin S. Protein Science 1998; 7 (6): 1294-1302.

- (13) Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, Renko M, Sun T, Turk B, Turk D: Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *BBA – Proteins and Proteomics* 2012;1824 (1): 68-88.
- (14) <https://drugdesigndata.org/about/grand-challenge/964>. Dostopno: September 2017.
- (15) Wu Cheng X, Huang Z, Kuzuya M, Okumura K, Murohara T: Cysteine Protease Cathepsins in Atherosclerosis-Based Vascular Disease and Its Complications. *Hypertension* 2011;58:978-986.
- (16) George JS, Johnson J: *Atherosclerosis: Molecular and Cellular Mechanisms*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2010: 173-185.
- (17) Wu Cheng X, Kuzuya M, Nakamura K, Di Q, Liu Z, Sasaki T, Kanda S, Jin H, Shi G, Murohara T, Yokota M, Iguchi A: Localization of Cysteine Protease, Cathepsin S, to the Surface of Vascular Smooth Muscle Cells by Association with Integrin $\alpha\beta3$. *The American Journal of Pathology* 2006; 168 (2): 685-694.
- (18) Liu J, Ma L, Yang J, Ren A, Sun Z, Yan G, Sun J, Fu H, Xu W, Hu C, Shi G: Increased serum cathepsin S in patients with atherosclerosis and diabetes. *Atherosclerosis* 2006; 186 (2): 411-419.
- (19) Rehberger-Likozar A, Šebeštjen M: Influence of trimetazidine and ranolazine on endothelial function in patients with ischemic heart disease. *Coronary artery disease* 2015; 26 (8).
- (20) Antonopoulos MS, Lee JN, Chang AV: Ranolazine (Ranexa): First-in-Class Therapy for Stable Angina. *P&T* 2007; 32 (9): 488-490.
- (21) https://theodora.com/drugs/ranexa_ranolazine_extended_release_tablets_cv_therapeutics.html Dostopno: Avgust 2018.
- (22) Reddy BM, Weintraub HS, Schwartzbard AZ: Ranolazine: A New Approach to Treating an Old Problem. *Texas Heart Institute Journal* 2010; 37(6): 641-647.
- (23) Nash DT, Nash SD: Ranolazine for chronic stable angina. *Lancet* 2008; 372: 1335-1336.
- (24) http://www.ema.europa.eu/docs/sl_SI/document_library/EPAR-Summary_for_the_public/human/000805/WC500045940.pdf. Dostopno: September 2017.
- (25) http://www.ema.europa.eu/docs/sl_SI/document_library/EPAR-Product_Information/human/000805/WC500045937.pdf. Dostopno: September 2017.

- (26) http://www.ema.europa.eu/docs/sl_SI/document_library/Referrals_document/Trimetazidine_31/WC500133921.pdf. Dostopno: September 2017.
- (27) Dezsi CA: Trimetazidine in Practice: Review of the Clinical and Experimental Evidence. *American journal of therapeutics* 2016; 23 (3): 871-872.
- (28) <https://www.omicsonline.org/open-access/comparative-steady-state-crossover-bioequivalence-study-of-mg-trimetazidine-extended-release-tablets-jbb.1000203.php?aid=32915>. Dostopno: Junij 2018.
- (29) Chrusciel P, Rysz J, Banach M: Defining the role of trimetazidine in the treatment of cardiovascular disorders: some insights on its role in heart failure and peripheral artery disease. *Drugs* 2014; 74 (9): 971-972.
- (30) Kanič V: Novejši načini zdravljenja stabilne AP z zdravili, Univerzitetni klinični center Maribor, 2007: 289-291.
- (31) http://www.ema.europa.eu/docs/sl_SI/document_library/Referrals_document/Trimetazidine_31/WC500133922.pdf. Dostopno: September 2017.
- (32) Stanley WC, Marzilli M: Metabolic therapy in the treatment of ischemic heart disease: the pharmacology of trimetazidine. *Fundamental & clinical pharmacology* 2003; 17 (2): 133-145.
- (33) http://www.ema.europa.eu/docs/sl_SI/document_library/Referrals_document/Trimetazidine_31/WC500133923.pdf. Dostopno: September 2017.
- (34) Wilkinson RD, Williams R, Scott CJ, Burden RE: Cathepsin S: therapeutic, diagnostic, and prognostic potential. *Biological chemistry* 2015; 396(8): 867-882.
- (35) Repnik U, Stoka V, Turk V, Turk B: Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death. *BBA – Proteins and Proteomics* 2012; 1824 (1): 22-33.
- (36) Sukhova GK, Shi GP, Simon DI, Chapman HA, Libby P: Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells. *The Journal of clinical investigation* 1998; 102 (3): 576-583.
- (37) Driffort V, Gillet L, Bon E, Marionneau-Lambot S, Oullier T, Joulin V, Collin C, Pages JC, Jourdan ML, Chevalier S, Bougnoux P, Le Guennec JY, Besson P, Roger S: Ranolazine inhibits Nav1.5-mediated breast cancer cell invasiveness and lung colonization. *Molecular Cancer* 2014; 13: 264.
- (38) Haerteis S, Krappitz M, Bertog M, Krappitz A, Baraznenok V, Henderson I, Lindstrom E, Murphy JE, Bunnett NW, Korbmacher C: Proteolytic activation of the

epithelial sodium channel (ENaC) by cysteine protease cathepsin-S. *Pflugers Archiv, European journal of physiology* 2012; 464(4): 353-365.

- (39) <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000138029-HADHB/pathology>. Dostopno: Junij 2018.
- (40) Mamtami M, Kulkarni H: Association of HADHA expression with risk of breast cancer: targeted subset analysis and meta-analysis of microarray data. *BMC Research Notes* 2012; 5: 25.
- (41) Mirjanic-Azaric B, Vekic J, Zeljkovic A, Jelic-Ivanovic Z, Djeric M, Milivojac T, Pecar-Fonovic U, Marc J, Kos J, Cerne D: Interrelated Cathepsin S-Lowering and LDL Subclass Profile Improvements Induced by Atorvastatin in the Plasma of Stable Angina Patients. *J Atheroscler Thromb* 2014; 21: 868-877.
- (42) Li X, Cheng XW, Hu L, Wu H, Guo-Ping, Hao CN, Jiang H, Zhu E, Huang Z, Inoue A, Sasaki T, Du Q, Takeshita K, Okumura K, Murohara T, Kuzuya M: Cathepsin S activity controls ischemia-induced neovascularization in mice. *International Journal of Cardiology* 2015; 183: 198-208.
- (43) Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF: *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Third edition, Academic Press, London, 2013: 1824-1826.
- (44) Stern I, Marc J, Kranjec I, Zorman D, Cerne A, Cerne D: Increased plasma levels of CATS mRNA but not CATB mRNA in patients with coronary atherosclerosis. *Clinical Biochemistry* 2010; 43(18).