

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA BONEŠ

**PREUČEVANJE PROGNOŠTIČNE VREDNOSTI  
KATEPSINA S V KRVI ZA RESTENOZO  
FEMOROPOPLITEALNE ARTERIJE**

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA BONEŠ

**PREUČEVANJE PROGNOŠTIČNE VREDNOSTI  
KATEPSINA S V KRVI ZA RESTENOZO  
FEMOROPOPLITEALNE ARTERIJE**

**INVESTIGATION OF PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF  
CATHEPSIN S IN BLOOD FOR RESTENOSIS OF  
FEMOROPOPLITEAL ARTERY**

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2016

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 doc. dr. Mojce Božič Mijovski, spec. med. biokem.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Darku Černetu, mag. farm., spec. med. biokem. za strokovne nasvete in pomoč pri izdelavi magistrske naloge. Prav tako se zahvaljujem somentorici doc. dr. Mojci Božič Mijovski, spec. med. biokem. za pomoč pri zbiranju vzorcev in pisanju magistrske naloge. Hvala vsem zaposlenim na Katedri za klinično biokemijo. Zahvaljujem se tudi vsem na Katedri za farmacevtsko biologijo za prijaznost in pomoč pri reševanju težav, še posebej doc. dr. Urši Pečar Fonović, univ. dipl. biol. Hvala tudi gospe Veri iz Laboratorija za encime in elemente v sledovih, KIKKB za pomoč pri določanju cistatina C.

Posebna zahvala pa gre moji družini in prijateljem za vso podporo in spodbudne besede v času študija. Hvala.

## **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Darka Černeta, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom doc. dr. Mojce Božič Mijovski, spec. med. biokem.

Ana Boneš

# KAZALO VSEBINE

<b>KAZALO VSEBINE</b> .....	I
<b>KAZALO SLIK</b> .....	III
<b>KAZALO PREGLEDNIC</b> .....	III
<b>POVZETEK</b> .....	V
<b>ABSTRACT</b> .....	VII
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....	VIII
<b>1 UVOD</b> .....	1
<b>1.1 Ateroskleroza</b> .....	1
1.1.1 Vloga lipidov pri aterosklerozi.....	4
<b>1.2 Perkutana transluminalna angioplastika femoropoplitealne arterije</b> .....	4
<b>1.3 Restenoza</b> .....	6
<b>1.4 Katepsin S</b> .....	7
1.4.1 Cisteinski katepsini.....	7
1.4.2 Zgradba katepsina S.....	7
1.4.3 Vloga katepsina S v telesu.....	8
1.4.4 Vloga katepsina S pri aterosklerozi.....	9
1.4.5 Merjenje koncentracije in aktivnosti katepsina S.....	9
<b>1.5 Cistatin C</b> .....	9
1.5.1 Fiziološka in patološka vloga cistatina C.....	10
1.5.2 Vloga cistatina C v razvoju ateroskleroze.....	10
1.5.3 Uporaba v klinični diagnostiki.....	10
1.5.4 Merjenje koncentracije cistatina C.....	11
<b>2 NAMEN DELA IN HIPOTEZA</b> .....	12
<b>3 PREISKOVANCI IN METODE</b> .....	13
<b>3.1 Preiskovanci</b> .....	13

<b>3.2</b>	<b>Aktivnost Katepsina S</b> .....	14
3.2.1	Reagenti in kemikalije .....	14
3.2.2	Laboratorijska oprema in pripomočki .....	14
3.2.3	Pufri .....	14
3.2.4	Potek dela .....	15
<b>3.3</b>	<b>Koncentracija Katepsina S</b> .....	16
3.3.1	Reagenti in kemikalije .....	16
3.3.2	Laboratorijska oprema in pripomočki .....	16
3.3.3	Pufri .....	17
3.3.4	Potek dela .....	17
<b>3.4</b>	<b>Koncentracija Cistatina C</b> .....	19
3.4.1	Analizator in reagenti .....	19
3.4.2	Potek dela .....	19
3.4.3	Princip metode .....	19
<b>3.5</b>	<b>Statistična obdelava podatkov</b> .....	20
<b>4</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA</b> .....	21
<b>4.1</b>	<b>Klinične značilnosti bolnikov</b> .....	21
<b>4.2</b>	<b>Primerjava bolnikov z restenozo in brez nje</b> .....	22
4.2.1	Neodvisnost ostalih dejavnikov tveganja za restenozo od Katepsina S .....	28
<b>5</b>	<b>SKLEPI</b> .....	31
<b>6</b>	<b>LITERATURA</b> .....	32

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Zgradba arterije.....	1
<b>Slika 2:</b> Prva in druga stopnja razvoja aterosklerotičnega plaka.....	3
<b>Slika 3:</b> Tretja stopnja in nastanek aterosklerotičnega plaka.....	3
<b>Slika 4:</b> 1. Vstavljanje balonskega katetra na mesto zožitve. 2. Napihovanje balonskega katetra. 3. Razširjen del žile po končani PTA.....	5
<b>Slika 5:</b> Mesto femoropoplitealne arterije v telesu.....	6
<b>Slika 6:</b> Zgradba Katepsina S.....	8
<b>Slika 7:</b> Zgradba Cistatina C.....	9
<b>Slika 8:</b> Mikrotitrski čitalec Tecan Safire 2.....	15
<b>Slika 9:</b> Umeritvena krivulja standardov Katepsina S .....	18
<b>Slika 10:</b> Princip metode PETIA .....	20

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica I:</b> Osnovni in aktivacijski pufer.....	14
<b>Preglednica II:</b> Pufri za ELISO Katepsina S.....	17
<b>Preglednica III:</b> Klinične značilnosti bolnikov.....	21
<b>Preglednica IV:</b> Primerjava med bolniki z restenozo in brez nje dan pred PTA.....	23
<b>Preglednica V:</b> Primerjava med bolniki z restenozo in brez nje takoj po PTA.....	23
<b>Preglednica VI:</b> Izmerjena koncentracija in aktivnost Katepsina S ter koncentracija Cistatina C dan pred PTA pri bolnikih z razvojem restenoze.....	24
<b>Preglednica VII:</b> Izmerjena koncentracija in aktivnost Katepsina S ter koncentracija Cistatina C dan pred PTA pri bolnikih brez razvoja restenoze.....	24
<b>Preglednica VIII:</b> Izmerjena koncentracija in aktivnost Katepsina S ter koncentracija Cistatina C takoj po PTA pri bolnikih z razvojem restenoze.....	25
<b>Preglednica IX:</b> Izmerjena koncentracija in aktivnost Katepsina S ter koncentracija Cistatina C takoj po PTA pri bolnikih brez razvoja restenoze.....	26

<b>Preglednica X:</b> Primerjava izmerjenih parametrov med skupino bolnikov z restenozo in brez restenoze dan pred PTA.....	27
<b>Preglednica XI:</b> Primerjava izmerjenih parametrov med skupino bolnikov z restenozo in brez restenoze takoj po PTA.....	27
<b>Preglednica XII:</b> Odvisnost katepsina S od ostalih dejavnikov tveganja za restenozo preverjena z večkratno logistično regresijo.....	29

## POVZETEK

Ateroskleroza danes predstavlja enega izmed glavnih vzrokov smrti v razvitem svetu. Pri razvoju aterosklerotičnega plaka sodeluje cisteinska proteaza katepsin S, ki razgrajuje zunajcelični matriks, zato monociti in limfociti T lažje prehajajo iz krvi v notranjo plast žilne stene, kjer se začne aterosklerotični proces. Njegovo funkcijo zavira cistatin C, ki je naravni inhibitor katepsina S.

Ena od oblik zdravljenja žilnih zožitev je perkutana transluminalna angioplastika (PTA). Čeprav gre za varno in tehnično zelo uspešno metodo zdravljenja zožitev žil, glavni zaplet po posegu predstavlja restenozo (ponovno zoženje na mestu širjenja plaka), ki se v šestih mesecih po posegu pojavi pri 40 – 60 % bolnikov. Z določanjem koncentracije in aktivnosti katepsina S pred PTA bi lahko prepoznali bolnike z večjim tveganjem za restenozo, ki bi bili zato po posegu deležni agresivnejše terapije in večjega nadzora. V ta namen smo v naši raziskavi preučevali prognostično vrednost katepsina S v krvi za restenozo femoropoplitalne arterije.

Preučevali smo naslednjo hipotezo: Bolniki z razvojem restenoze v šestih mesecih po PTA imajo dan pred in takoj po posegu zvišane vrednosti katepsina S v serumu.

Katepsin S ter cistatin C smo izmerili v krvi bolnikov odvzeti dan pred in takoj po posegu. Koncentracijo katepsina S smo določili z metodo ELISA Kvantitativni test za katepsin S s protitelesi 1E3 mAb in 2B4 mAbs, njegovo aktivnost pa z merjenjem razgradnje sintetičnega substrata. Koncentracijo cistatina C smo določili s turbidimetrično metodo imuno delcev za cistatin C. Ugotovili smo, da je bila pred PTA koncentracija katepsina S v serumu višja pri bolnikih z razvojem restenoze kot pri bolnikih brez nje ( $p < 0,015$ ). Prav tako so imeli bolniki z restenozo pred posegom zvišane aktivnosti katepsina S v serumu ( $p < 0,038$ ). Po posegu so imeli bolniki z restenozo zvišane aktivnosti katepsina S v serumu ( $p < 0,003$ ), pri koncentracijah pa razlik nismo opazili. Med koncentracijama cistatina C bolnikov z restenozo in brez nje nismo našli razlik. Z večkratno logistično regresijo smo dokazali, da sta koncentraciji katepsina S oziroma njegova encimska aktivnost povezani z razvojem restenoze neodvisno od priznanih dejavnikov tveganja za restenozo, kot so sladkorna bolezen, ledvična obolenja in stopnja razvoja periferne arterijske bolezni. Prav tako smo ugotovili, da aktivnost katepsina S v serumu ni bila povezana s koncentracijo cistatina C v serumu. Na podlagi potrjene hipoteze lahko zaključujemo, da je smiselno nadaljnje



proučevanje prognostičnega pomena katepsina S za restenozo femoropoplitealne arterije po PTA. Tako bi prepoznali bolnike z večjim tveganjem za restenozo in jo z natančnejšo obravnavo teh bolnikov poskušali preprečiti oziroma zmanjšati.

#### KLJUČNE BESEDE

Ateroskleroza, perkutana transluminalna angioplastika, restenozo, katepsin S, cistatin C

## ABSTRACT

Atherosclerosis represents one of the leading causes of death in the Western world. Cysteine proteases Cathepsin S is involved in the pathogenesis of atherosclerotic plaque by destroying extracellular matrix, which mitigates monocytes and lymphocytes T entering into the inner layer of the artery wall, where the atherosclerosis begins. Its function is inhibited by cystatin C, which is endogenous cathepsin S inhibitor.

Arterial stenosis due to atherosclerotic plaque formation can be treated with percutaneous transluminal angioplasty (PTA). Restenosis occurs in 40 – 60 % of patients six months after the procedure. By determining Cathepsin S concentration and activity before PTA, patients with a higher risk of restenosis could be identified. These patients could receive more aggressive therapy and more intense follow up. That is why we studied the prognostic significance of Cathepsin S in blood for restenosis of femoropopliteal artery. Concurrently we have presumed lower level of cystatin C concentration in blood of patients with restenosis.

We tested the hypothesis that increased cathepsin S in serum one day before and after PTA associates with 6-months restenosis of femoropopliteal artery.

Cathepsin S and cystatin C have been evaluated in patients' blood, taken the day before and immediately after the procedure. Cathepsin S concentration has been determined with Quantitative Cathepsin S ELISA with combination of 1E3 mAb and 2B4 mAbs and its activity with measurement of degradation of synthetic substrate. Cystatin C concentration has been determined by Cystatin C Immunoparticles (Dako, Glostrup, Denmark). Our results revealed higher concentration and activity of cathepsin S before PTA in patients with than in patients without restenosis ( $p < 0.015$  and  $p < 0.038$ , respectively). After the procedure, only its activity had higher values among the both patients' group ( $p < 0,003$ ). Cystatin C concentration in patients with or without restenosis showed no difference. Multiple logistic regression indicated that Cathepsin S concentration and activity are independent risk factors for restenosis development. To sum it up, cathepsin S concentration and activity determined before PTA could be of prognostic significance for restenosis of femoropopliteal artery.

**KEY WORDS:** Atherosclerosis, percutaneous transluminal angioplasty, restenosis, cathepsin S, cystatin C

## **SEZNAM OKRAJŠAV**

**ACE** – angiotenzin-pretvarjajoči encim

**apoB**- apolipoprotein B

**BSA** – goveji serumski albumin

**CLIP** – invariantna polipeptidna veriga HLA razreda II (ang. Class II-associated invariant chain peptide)

**CRP** – C-reaktivni protein

**EDTA** - Etilendiamintetraocetna kislina

**ELISA** – encimski imunski test (enzyme-linked immunosorbent assay)

**ER** – endoplazmatski retikulum

**HLA** – poglavitni histokompatibilni kompleks (PHK)

**LDL** – lipoprotein z nizko gostoto

**MCP-1** – monocitni kemotaktični protein 1

**PAR 2** – s proteazo aktiviran receptor 2

**PENIA** – z delci izboljšan nefelometrični imunski test (particle-enhanced nephelometric immunoassay)

**PETIA** – z delci izboljšan turbidimetrični imunski test (particle-enhanced turbidimetric immunoassay)

**PTA** - perkutana transluminalna angioplastika

**RFU** – relativna fluorescentna enota (relative fluorescence unit)

**TMB** - tetrametil benzidin

**VCAM-1** – žilnocelični adhezijski protein 1

**VLDL** – lipoprotein z zelo majhno gostoto

**ZCM** – zunajcelični matriks

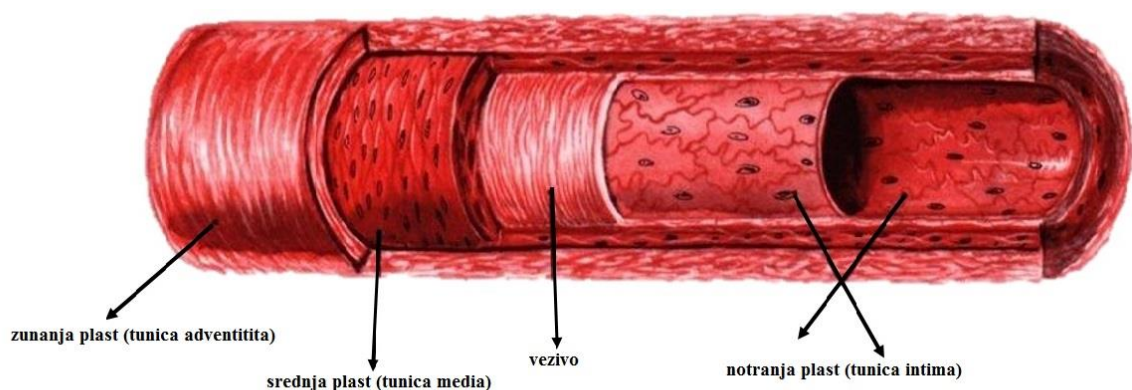
# 1 UVOD

## 1.1 Ateroskleroza

Ateroskleroza je kronična bolezen sten arterijskih žil mišičnega in elastičnega tipa. Zaradi kopičenja maščob v notranji plasti žilne stene na tem mestu nastane maščobna leha, ki se boči v notranjost svetline žile in s tem otežuje pretok krvi in povzroči oslabeleost žilne stene (1, 2).

Bolezni do katerih privede ateroskleroza so koronarna srčna bolezen, možgansko-žilna in periferna arterijska bolezen. Te bolezni so eden od najpogostejših vzrokov smrti v razvitem svetu (3, 4). Najpomembnejši dejavniki tveganja za razvoj ateroskleroze so zvišana raven lipoproteinov, arterijska hipertenzija, inzulinska rezistenca ter sladkorna bolezen, kajenje, debelost, telesna neaktivnost, starost, moški spol, pomenopavzalno obdobje in genetski dejavniki (5).

Proces ateroskleroze se pojavi v velikih in srednje velikih arterijah. Arterije so žile elastičnega in mišičnega tipa, ki so sestavljene iz treh plasti: zunanje plasti (tunica adventitia), ki je sestavljena iz veziva in elastičnih vlaken, srednje plasti (tunica media), ki je sestavljena iz gladkih mišičnih celic in membrane ter notranje plasti (tunica intima), ki je sestavljena iz veziva, gladkih mišičnih celic in endotelija (slika 1) (1, 6).



**Slika 1:** Zgradba arterije. Prirejeno po (7).

Zaradi turbulentnega toka krvi, ki poškoduje žilno steno, se aterosklerotični plak najpogosteje razvije na razvejišču žil. Največkrat se pojavi na abdominalni aorti, koronarnih arterijah in poplitealni arteriji (8).

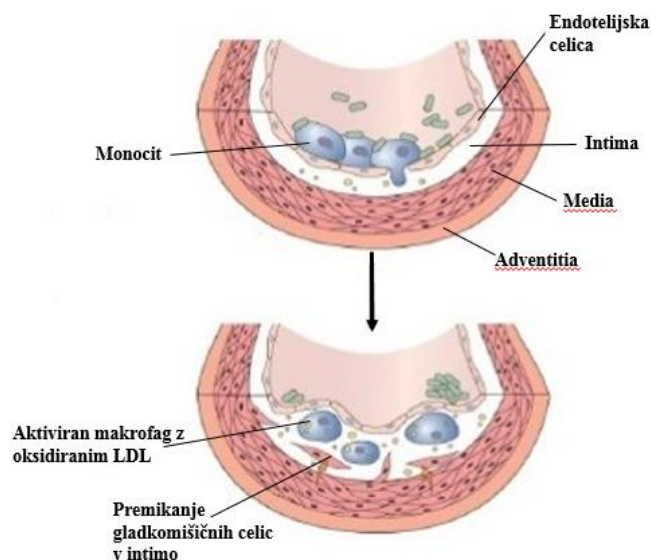
Točnega vzroka nastanka ateroskleroze še ne poznamo. Dobro preučen pa je proces razvoja aterosklerotičnega plaka. Priznani sta humoralna in celična teorija (odgovor na poškodbo) (9).

Humoralna teorija trdi, da do razvoja ateroskleroze pride zaradi sprememb v okolju arterije. Osrednjo vlogo pri aterosklerotičnih spremembah naj bi imel fibrin (9).

Teorija odgovora na poškodbo (najbolj razširjena teorija razvoja ateroskleroze) predpostavlja, da do začetka procesa ateroskleroze privede poškodba žilnega endotelija (1).

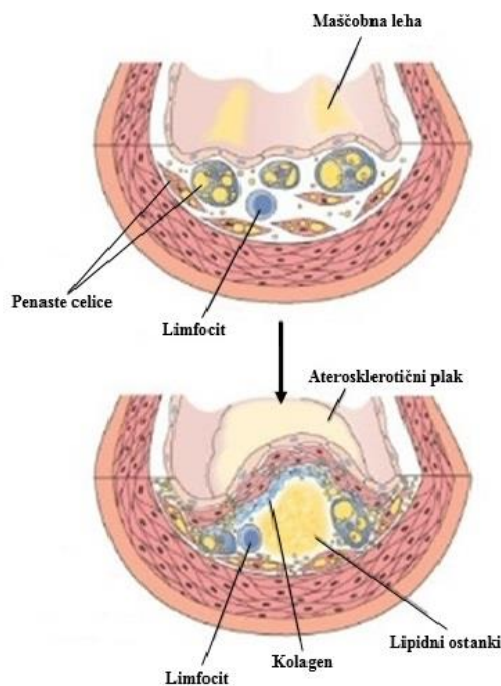
**Prva stopnja** je poškodba endotelijske celice. Do poškodbe žilnega endotelija lahko pride zaradi turbulentnega toka krvi (predvsem na razvejišču žil), hiperlipidemije (visoke koncentracije lipoproteinov z nizko gostoto (LDL) in lipoproteinov z zelo majhno gostoto (VLDL) v krvi), fizične poškodbe zaradi hipertenzije, prostih radikalov, ki nastajajo zaradi kajenja in onesnaženega zraka, dolgotrajno povišane koncentracije glukoze v krvi in hiperhomocisteinemije (previsoke vrednosti homocisteina v krvi na endotelij delujejo toksično) (11). S poškodbo endotelija se spremeni mehanska vloga endotelijskih celic, ki preprečujejo nekontroliran prehod snovi med žilno steno in krvjo (1).

**Druga stopnja** se prične, ko poškodovane endotelijske celice na svoji površini izpostavijo žilnocelični adhezijski protein-1 (VCAM-1), ki privablja monocite in limfocite T. Ti prehajajo poškodovani endotelij in vstopijo v subendotelijski prostor, kjer se monociti preobrazijo v makrofage. Ker se razrahljajo tudi povezave med endotelijskimi celicami, v subendotelijski prostor vstopajo levkociti, lipidi in krvna plazma. Lipoproteini, predvsem LDL, se zaradi makrofagov, nekaterih encimov in dušikovega monoksida (NO), ki se nahaja v žilni steni, oksidirajo. Makrofagi nato fagocitirajo oksidirane LDL in nastanejo tako imenovane penaste celice. Skupek teh celic tvori maščobno leho (slika 2) (1, 11).



**Slika 2:** Prva in druga stopnja razvoja aterosklerotičnega plaka. Prirejeno po (10).

V **tretji stopnji** limfociti T, ki se nahajajo v intimi, izločajo citokine, ki spodbudijo gladkomišične celice žilne stene, da se začnejo premikati iz medie v intimo. Rastni faktorji še dodatno spodbudijo razraščanje gladkomišičnih celic. V maščobni lehi se tako začnejo kopičiti penaste celice in gladkomišične celice, ki prav tako fagocitirajo oksidirane LDL, da nastaja še več penastih celic. Ker se maščobna leha večja, kmalu nastane aterosklerotični plak, ki vidno zoži lumen žile (slika 3) (1, 11).



**Slika 3:** Tretja stopnja in nastanek aterosklerotičnega plaka. Prirejeno po (10).

Če aterosklerotični plak nastaja počasi, se sprti stabilizira in ni nagnjen k razpadu. Nevarnejši so plaki, ki nastanejo hitro, saj vsebujejo več lipidov in jih prekriva tanjša fibrinska plast, ki lahko hitro počí. Ko pride do razpoka aterosklerotičnega plaka, se v lumen žile sprostijo ostanki kolagena, gladkomišičnih celic in lipidov. To privablja trombocite, ki se na mestu razlitja aktivirajo in sprožijo koagulacijsko kaskado. Nastane strdek, ki lahko zamaši žilo na mestu aterosklerotičnega plaka ali se sprostí v krvni obtok in obtíči na ožjem delu žile. Tako pride do tromboze oz. nekroze tkiva, ki zaradi zapore ni prekrvljeno (11, 12).

### **1.1.1 Vloga lipidov pri aterosklerozi**

Spremenjene vrednosti lipidov (predvsem zvišane vrednosti LDL in znižane vrednosti HDL) v serumu so eden od glavnih vzrokov za nastanek ateroskleroze. LDL holesterol ima na svoji površini apolipoprotein B (apoB), s katerim se veže na LDL-receptor na celici in preko katerega vstopi vanjo. Ko se začne LDL v celici kopičiti, se vključi negativna povratna zanka, ki utiša LDL-receptor. Težava nastane, ko se LDL oksidira. Oksidacijo povzročijo prosti radikali, aldehidi, ki se nahajajo v krvi. Aldehidi reagirajo s skupino NH v aminokislini apoB, zato apoB razpade. Oksidirani LDL tako v celico ne prehaja več preko kompleksa apoB-receptor-LDL, ampak preko receptorjev čistilcev (veliko jih imajo na svoji površini makrofagi v žilni steni). Pri tem prehodu se negativna povratna zanka ne vključi, zato se oksidirani LDL nenadzorovano kopičijo v celici, dokler celica ne počí (13).

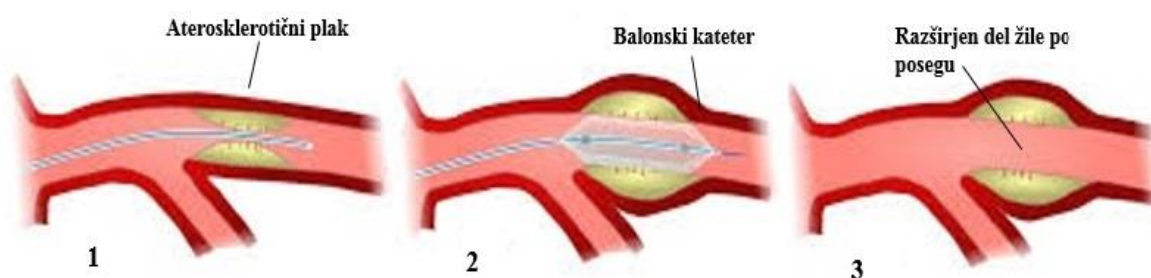
V nasprotju z LDL ima HDL holesterol pri razvoju ateroskleroze zaščitno vlogo. Iz penastih celic odstranjuje holesterol in ga prenaša nazaj v jetra, zavira oksidacijo LDL, adhezijo monocitov iz plazme in izražanje monocitnega kemotaktičnega proteina 1 (MCP-1), ki privablja monocite iz krvi v žilno steno. Prav tako omejuje proces vnetja, ki spremlja aterosklerozo (14).

## **1.2 Perkutana transluminalna angioplastika femoropoplitealne arterije**

Perkutana transluminalna angioplastika (PTA) je poseg s katerim ponovno vzpostavimo pretok krvi skozi arterijo. Z njo zdravimo zožitve (stenoze) in zapore arterij, ki so krajše od 10 cm. Na začetku posega zdravnik v krvni obtok vbrizga kontrastno sredstvo. Z njim med posegom rentgensko ugotavlja, kakšen je položaj zožitve in prehodnost arterije. Nato skozi arterijo na zoženo mesto vstavi balonski kateter, ga napolni s fiziološko raztopino in spusti,

da potisne aterosklerotični plak ob steno arterije. S tem povzroči kontrolirano disekcijo (raztrganino) arterijske intime in medie. Na mestu disekcije nastane trombogena površina, ki jo zavremo z acetilsalicilno kislino, ki jo bolnik prejme pred posegom. Med samim posegom trombogeno površino zavremo s heparinom. Ko se zdravnik s pomočjo kontrastnega sredstva in rentgenskega slikanja prepriča, da je pretok krvi skozi žilo ponovno vzpostavljen, odstrani balonski kateter (slika 4) (15, 16).

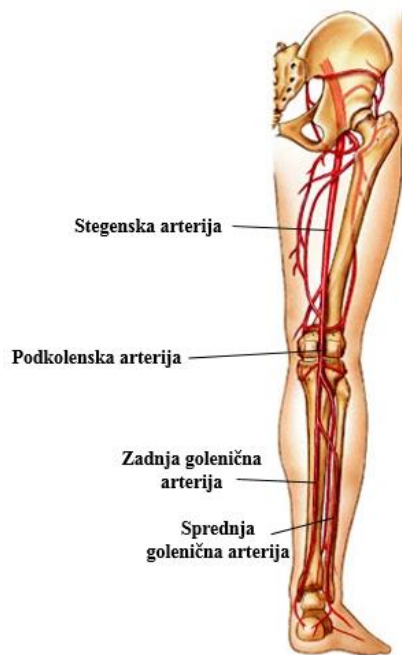
PTA je varen in tehnično zelo uspešen poseg. Najpogostejši zapleti po posegu so podplutba na mestu vboda, nastanek strdka, razširitev žile in razpok žile, vendar zapleti nastopijo le pri 5 % bolnikov (17).



**Slika 4:** Potek PTA. 1. Vstavljanje balonskega katetra na mesto zožitve. 2. Napihovanje balonskega katetra. 3. Razširjen del žile po končani PTA. Prirejeno po (18).

PTA je primeren poseg za razširitev perifernih arterij. Najpogosteje se uporablja za povečanje pretoka krvi skozi femoropoplitealno arterijo. To je arterija, ki je neposredno nadaljevanje stegenske (femoralne) arterije in poteka skozi kolensko (poplitealno) jamo. Pod kolenom se razdeli na sprednjo in zadnjo golenično (tibialno) arterijo, ki vsaka oskrbuje s krvjo svoj del goleni (slika 5) (19).





**Slika 5:** Mesto femoropoplitealne arterije v telesu. Prirejeno po (20).

### 1.3 Restenoza

Kljub temu, da so PTA skozi leta razvili do te mere, da pri posegu prihaja do malo zapletov, še vedno največjo težavo predstavlja restenoza, ki se pojavi v 6 - 12 mesecih po posegu pri 40 – 60 % bolnikov. Restenoza je pojav ponovne zožitve žile na mestu posega. Na njen razvoj vpliva veliko različnih dejavnikov. Med najpogostejšimi so morfološke spremembe na arteriji (kalciniranost arterije, dolžina zožitve), funkcionalne značilnosti arterije, stadij periferne arterijske bolezni, sladkorna bolezen, kronična ledvična odpoved in napredovanje ateroskleroze (21).

Med samo PTA zaradi disekcije žilne stene in raznih medicinskih instrumentov, ki se uporabljajo med posegom, nastanejo poškodbe žilne stene. Pride do akutnega odgovora na poškodbo. Aktivira se koagulacijska kaskada, ki zatesni mesto poškodbe. Kasneje se s premikanjem, proliferacijo in sintezo novih endotelijskih celic poškodba zaceli in skozi žilo ponovno nemoteno teče kri. Če je akutni odgovor na poškodbo prevelik, lahko privede do tromboze, ki ovira tok krvi. Pretiran proces celjenja v nekaj mesecih privede do proliferacije gladkomišičnih celic in s tem hiperplazije intime in ponovne obstrukcije svetline žile, kar imenujemo restenoza (22).

## 1.4 Katepsin S

### 1.4.1 Cisteinski katepsini

Cisteinski katepsini so encimi, ki jih uvrščamo med proteaze. Glavna naloga proteaz je razgradnja poškodovanih in neželenih proteinov, a sodelujejo tudi v kostni resorpciji, presnovi proteinov in predstavitvi antigenov na površini celice. Katepsine nadalje delimo v tri skupine glede na aminokislino v aktivnem mestu: serinske katepsine (katepsin A in G), aspartatne katepsine (katepsin D in E) in cisteinske katepsine (katepsin B, C, F, H, K, L, O, S, V, W in X). Cisteinske katepsine razvrščamo še naprej v tri skupine glede na njihovo proteolitično delovanje. Endopeptidazno delujejo katepsini S, K, V, F in L, endo- in eksopeptidazno pa katepsini B, H, X in C. V celici se sintetizirajo v pre pro encimsko obliko, ki je neaktivna. Zaradi varnosti se aktivirajo šele na samem mestu delovanja (23).

### 1.4.2 Zgradba katepsina S

Katepsin S (Uniprot oznaka CTSS) je elastolitični katepsin, ki se nahaja v antigen predstavitvenih celicah (makrofagih, dendritičnih celicah in limfocitih B). Gen za katepsin S se nahaja na kromosomu *1q21*. Sintetizira se v pre pro encim, ki vsebuje 331 aminokislin in je sestavljen iz signalne domene, propeptidne domene in aktivnega encima. Signalni peptid, ki omogoča potovanje do endoplazmatskega retikuluma, predstavlja 16 aminokislin. Naloga propeptidne domene, ki je dolga 98 aminokislin so, da s svojo zgradbo omogoči pravilno zvitje aktivnega encima, deluje kot molekularni spremljevalec in tako pomaga pri zvijanju in transportu proencima do lizosoma in zaradi svoje inhibitorne vloge onemogoča nekontrolirano aktivacijo v aktivno obliko. Zrelo obliko sestavlja 217 aminokislin in vsebuje cisteinske ostanke. Je edini katepsin, ki ima optimalno delovanje pri pH 6,5, a ostane aktiven tudi v nevtralnem in rahlo bazičnem okolju (slika 6) (24).



**Slika 6:** Zgradba katepsina S. Prirejeno po (25).

### **1.4.3 Vloga katepsina S v telesu**

Glavna vloga katepsina S je sodelovanje pri nastanku poglavitnega histokompatibilnega kompleksa (human leukocyte antigen, HLA) razreda II. Molekule HLA razreda II se sintetizirajo v endoplazmatskem retikulumu (ER) in z invariantno verigo tvorijo kompleks. Vezava invariantne verige na vezavno mesto molekule HLA preprečuje, da bi se nanj predhodno vezali celici lastni peptidi. Prav tako invariantna veriga sodeluje pri transportu molekule HLA razreda II iz ER v Golgijev aparat. Nato se vezikli z molekulami HLA razreda II zlijejo z endosomi, ki vsebujejo katepsine. Katepsin S v nastalem endosomu cepi invariantno verigo do fragmenta CLIP (angleško Class II-associated invariant chain peptide), ki ostane vezan na molekulo HLA razreda II. Po ponovnem zlitju endosomov molekula HLA-DM sprosti CLIP, da se na vezavno mesto lahko veže tuji peptid (antigen), ki se nahaja v celičnem veziklu. Kompleks molekula HLA razreda II in antigen se nato vgradi v zunanjo membrano celice, kjer čaka na vezavo limfocita T preko T-celičnega receptorja (26, 27).

Katepsin S igra pomembno vlogo tudi pri razgradnji zunajceličnega matriksa (ZCM). Razgrajuje kolagenska vlakna, elastin, fibronektin in osteokalcin. Ker se izraža v makrofagih, ki se nahajajo na mestih vnetja, sodeluje pri vnetnem odzivu. Prav tako sodeluje tudi pri odzivu na bolečino, tako da s svojim proteolitičnim delovanjem aktivira PAR-2 (s proteazo aktiviran receptor 2) (28).

#### **1.4.4 Vloga katepsina S pri aterosklerozi**

Ker se katepsin S izraža v vseh celicah, ki so povezane z nastankom ateroskleroze in njegovo sintezo in aktivnost stimulirajo vnetni citokini, ki so prisotni v aterosklerotičnem plaku, ima pomembno vlogo pri razvoju ateroskleroze. Prav tako z razgradnjo invariantne verige na molekulah HLA razreda II, katepsin S sodeluje tudi v imunskem odzivu na vnetni proces, kar ateroskleroza je (29).

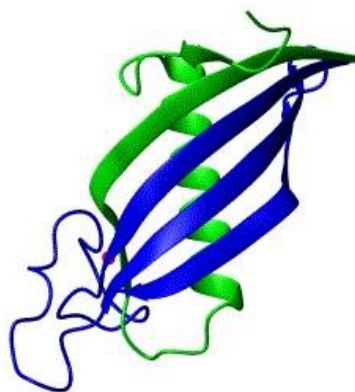
Katepsin S deluje v vseh stopnjah razvoja aterosklerotičnega plaka. Razgradnja ZCM v žilni steni omogoča prehod vnetnih celic (monocitov in limfocitov T) iz krvnega obtoka in gladkomišičnih celic iz medie v intimo, kar po poškodbi žilne stene predstavlja začetek razvoja ateroskleroze. Spodbuja nastanek penastih celic, saj inhibira HDL3, ki bi drugače povzročal iztok holesterola iz makrofagov. Poleg tega lahko skupaj z drugimi katepsini (D, F in K) spreminja apoB100 v LDL, kar še poveča število penastih celic. Sodeluje tudi pri nastanku nekrotičnega jedra plaka, ki nastane iz razpadlih penastih celic in razgrajenega kolagena. Prav tako razgradnja ZCM v aterosklerotičnem plaku stanjša fibrozni pokrov, ki zato lažje počí in povzroči trombozo (29, 30).

#### **1.4.5 Merjenje koncentracije in aktivnosti katepsina S**

Koncentracijo katepsina S določamo z metodo ELISA. V rutini se katepsina S zaradi njegove še ne dovolj raziskane prognostične vrednosti ne določa. Dodatno težavo predstavlja tudi slaba specifičnost metode ELISA, ker z njo določimo koncentracijo tako aktivnega kot tudi neaktivnega encima. Zaradi tega nam boljšo prognostično vrednost poda aktivnost katepsina S, ki jo določamo s testom aktivnosti (31).

### **1.5 Cistatin C**

Cistatin C je 120 aminokislin dolg protein, ki ga sintetizirajo vse celice z jedrom. Kodira ga gen CST3. Prisoten je v vseh telesnih tekočinah (slika 7) (32).



**Slika 7:** Zgradba cistatina C. Prirejeno po (33).

### **1.5.1 Fiziološka in patološka vloga cistatina C**

Cistatin C je najpomembnejši endogeni inhibitor cisteinskih proteaz v telesu. S tarčnim encimom tvorita kompleks 1:1 in tekmujeta za isti substrat. Inhibicija je reverzibilna. Zaradi inhibitorne vloge je pomemben dejavnik v zaščiti pred prekomernim delovanjem cisteinskih proteaz (34). Sodeluje tudi v imunskem odzivu, tako da inhibira kemotakso večjedrne celice (35).

Spremenjene vrednosti cistatina C povezujemo z nekaterimi nevrološkiimi boleznimi. Polimorfizem na genu CST3 zveča tveganje za razvoj Alzheimerjeve bolezni, kjer ima cistatin C pomembno zaščitno vlogo. Inhibira nastanek in nalaganje amiloidnih depozitov v možganih, ki so vzrok nastanka Alzheimerjeve bolezni (36).

### **1.5.2 Vloga cistatina C v razvoju ateroskleroze**

Cistatin C je endogeni inhibitor katepsinov (predvsem S in K), ki sodelujejo pri razvoju ateroskleroze. S svojo inhibitorno vlogo ščiti zunajcelični matriks in žilno steno pred prekomernim proteaznim delovanjem katepsinov. Kljub temu, da je znotraj aterosklerotičnega plaka zaradi številnih makrofagov in gladkomišičnih celic povečano izločanje katepsina S, izločanje cistatina C ostane nespremenjeno. Zato se poruši ravnovesje med sintezo in razgradnjo zunajceličnega matriksa in žilne stene, kar privede do začetka razvoja ateroskleroze (37).

### **1.5.3 Uporaba v klinični diagnostiki**

Ker se prosto filtrira skozi glomerulno membrano, popolnoma reabsorbira in metabolizira v proksimalnem tubulu, je koncentracija cistatina C dober kazalec delovanja glomerulne filtracije. Njegovo izločanje iz celic je konstantno do 50. leta starosti in ni odvisno od spola,

mišične mase in rakavih tvorbo v telesu. V zadnjem času ravno zaradi teh lastnosti ponekod že nadomešča merjenje serumskega kreatinina za oceno glomerulne filtracije, saj na nivo kreatinina vplivajo starost, spol, rasa, mišična masa, rakave tvorbe in prehrana. Poleg tega nivo kreatinina v krvi naraste šele, ko je glomerulna filtracija že zmerno ali zelo zmanjšana, medtem ko nivo cistatina C naraste že v zgodnji stopnji akutne ledvične odpovedi (38). Vendar merjenje serumskega kreatinina še vedno velja za prvo izbiro ocene glomerulne filtracije. Predvsem, ker je cistatin C še premalo raziskan in je cena analize v rutini veliko dražja od cene analize kreatinina (32).

#### **1.5.4 Merjenje koncentracije cistatina C**

Zaradi vedno večje vloge cistatina C v klinični diagnostiki, se hitro razvijajo različne metode za vsakdanje določanje v diagnostičnem laboratoriju. Za določanje cistatina C v serumu ali plazmi se uporabljajo imunokemijske metode. Najpogostejši sta PETIA (a particle-enhanced turbidimetric immunoassay) in PENIA (a particle-enhanced nephelometric immunoassay). Njune prednosti pred metodo ELISA, ki se je uporabljala v preteklosti, so hitrejša analiza, manj interferenc drugih snovi v serumu in boljša natančnost (32).

Največja težava pri diagnostiki cistatina C je standardizacija metode. Zaenkrat še ne obstajajo primarna referenčna metoda, primarni in sekundarni referenčni material ter zunanja kontrola kakovosti za cistatin C, kar bi pripomoglo k sledljivosti in lažji primerjavi rezultatov med različnimi laboratoriji. Za rutinsko merjenje cistatina C se v diagnostičnih laboratorijih še ne odločajo tudi zaradi še vedno visokih cen imunokemijskih metod (32).

## 2 NAMEN DELA IN HIPOTEZA

Katepsin S sodeluje pri razvoju ateroskleroze in restenoze, ki v enem letu po PTA prizadene približno polovico bolnikov. Z elastolitično in kolagenolitično razgradnjo zunajceličnega matriksa v notranjo plast žilne stene privablja monocite, limfocite T in gladkomišične celice, ki vase prevzemajo oksidiran LDL in prehajajo v penaste celice. Prav tako sodeluje tudi pri vnetnem odzivu. Nekatere raziskave so pokazale zvišano vrednost katepsina S pri aterosklerozi in restenozni, vendar še nihče ni opredelil njegove prognostične vrednosti za razvoj restenoze femoropoplitealne arterije. Namen magistrske naloge bo določiti razliko med koncentracijo in aktivnostjo katepsina S pri bolnikih, ki so v šestih mesecih po PTA razvili restenozo in bolnikih, ki je niso in s tem preučiti pomen prognostične vrednosti katepsina S za restenozo femoropoplitealne arterije. Dodatno pa bomo preverili tudi koncentracijo cistatina C, ki naj bi bil, zaradi svoje vloge naravnega inhibitorja katepsina S, znižan.

Preučili bomo naslednjo hipotezo: Bolniki z razvojem restenoze v šestih mesecih po PTA imajo dan pred in takoj po posegu zvišane vrednosti katepsina S v serumu.

Da bi hipotezo dokazali, bomo v serumu na podlagi izključitvenih in vključitvenih kriterijev izbranih bolnikov, ki bodo razdeljeni v dve skupini (bolniki z in brez restenoze), določili koncentracijo in aktivnost katepsina S ter koncentracijo cistatina C. Dobljene podatke bomo nato statistično ovrednotili.

Pričakujemo, da bomo hipotezo dokazali. Potrjena hipoteza bo pomenila, da ima katepsin S prognostično vrednost za razvoj restenoze femoropoplitealne arterije v šestih mesecih po PTA. Tako bi lahko prepoznali bolnike z večjo verjetnostjo za razvoj restenoze po PTA, ki bi zato prejeli agresivnejšo terapijo in bili deležni strožjega zdravniškega nadzora. S tem bi zmanjšali ali celo preprečili razvoj restenoze.

## 3 PREISKOVANCI IN METODE

### 3.1 Preiskovanci

Izmed zaporednih bolnikov s klavdikacijsko bolečino ali kritično ishemijo spodnjega uda, pri katerih je bila na Kliničnem oddelku za žilne bolezni Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana opravljena femoropoplitealna PTA, smo izbrali bolnike, ki so v šestih mesecih po PTA razvili restenozo ter se zdravili s statini in zaviralci ACE.

Izključitveni kriteriji so bili: vrednost CRP  $> 10$  mg/l, ker zvišane vrednosti nakazujejo na proces kateregakoli vnetja v telesu, koncentracija serumskega kreatinina  $> 120$   $\mu\text{mol/l}$ , ki je pokazatelj ledvičnih obolenj pri katerih je zvišana vrednost cistatina C. Zaradi vpletenosti cisteinskih katapsinov v različne neoplazije pri katerih so njihove vrednosti zvišane je bil izključitveni dejavniki tudi prisotnost neoplazije. Podatke o ostalih bolnikovih obolenjih smo pridobili iz bolnišničnega informacijskega sistema Hipokrat. Prav tako tudi podatke o bolnikovi terapiji z zdravili, kajenju in prisotnosti sladkorne bolezni. Zajeli smo bolnike, ki so imeli PTA opravljen med leti 2011 in 2014. V raziskavo smo na podlagi vključitvenih in izključitvenih kriterijev ter ustreznega volumna zbranega vzorca vključili 44 bolnikov. Razdelili smo jih v dve skupini. V skupini, kjer so bili bolniki, ki so v obdobju šestih mesecev po PTA doživeli restenozo, je bilo 20 bolnikov. V skupini, kjer so bili bolniki, ki v obdobju šestih mesecev po posegu niso doživeli restenoze, je bilo 24 bolnikov.

Bolnikom smo kri odvzeli dan pred PTA in isti dan po posegu v vakuumsko epruveto z 0,11 M natrijevim citratom, jo 30 minut centrifugirali pri  $4$   $^{\circ}\text{C}$ , dobljeno plazmo odpipetirali v manjše mikrocentrifugirke in zamrznili v tekočem dušiku. Plazemski vzorci so bili od datuma odvzema do analize shranjeni pri temperaturi  $\leq -70$   $^{\circ}\text{C}$ . V plazmi izbranih preiskovancev smo izmerili aktivnost in koncentracijo katapsina S ter koncentracijo cistatina C po spodaj opisanih postopkih.

Šest mesecev po PTA je bila pri vseh bolnikih opravljena ultrazvočna preiskava, s katero smo ugotavljali razvoj restenoze.

Vsi bolniki so podpisali privoljenje za sodelovanje v raziskavi, ki jo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko.



## 3.2 Aktivnost katepsina S

### 3.2.1 Reagenti in kemikalije

- substrat Z-VVR-AMC (Biomol International, Hamburg, Nemčija)
- encim katepsin S (39)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Sigma-Aldrich)
- 0,1 % polietilen glikol 8000 (Sigma-Aldrich)
- cistein (Sigma-Aldrich)
- EDTA (Promega, Madison, ZDA)

### 3.2.2 Laboratorijska oprema in pripomočki

- pipete Eppendorf Research in sterilni nastavki za pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- mikrocentrifugirke Eppendorf (1,5 ml – 5 ml) (Eppendorf)
- črna mikrotitrna ploščica Nunc-Immuno™ MicroWell™ (Sigma-Aldrich)
- mešalec Vortex
- vodna kopel
- Tecan Safire 2 s programsko opremo Magellan (Tecan Group Ltd, Männedorf, Švica)

### 3.2.3 Pufri

Za izvedbo testa aktivnosti smo potrebovali osnovni in aktivacijski pufer.

**Preglednica I:** Osnovni in aktivacijski pufer.

Osnovni pufer za katepsin S	100 mM fosfatni pufer + 0,1% PEG 8000 (pH=6,5)
Aktivacijski pufer za katepsin S	Osnovni pufer + 5 mM cistein + 1,5 mM EDTA

Za osnovni pufer smo sestavine natehtali, jih raztopili v destilirani vodi in uravnali pH. Za aktivacijski pufer smo sestavine natehtali in raztopili v osnovnem pufru. Po pripravi smo ju hranili v hladilniku pri temperaturi 4-8 °C. Rok uporabe aktivacijskega pufra je 14 dni.

### 3.2.4 Potek dela

Substrat Z-VVR-AMC, encim katepsin S in vzorce serumov bolnikov smo odmrznili na ledu. Nato smo pripravili 200  $\mu$ M raztopino substrata Z-VVR-AMC v osnovnem pufru. Pripravljeno raztopino smo zavili v aluminijevo folijo, da smo jo zaščitili pred svetlobo. Sledila je priprava 30 nM katepsina S (encim smo redčili v aktivacijskem pufru), ki je predstavljal pozitivno kontrolo. Vzorce serumov smo prav tako redčili v aktivacijskem pufru v razmerju 1:3. Na mikrotitrsko ploščo Nunc smo odpipetirali pripravljeno raztopino substrata 5  $\mu$ l/vdolbinico in mikrotitrsko ploščo pokrili z aluminijevo folijo. Pripravljeno pozitivno kontrolo in vzorce smo aktivirali 5-10 minut pri 37 °C v vodni kopeli. Tik preden smo ploščico vstavili v analizator, smo v vdolbinice odpipetirali 95  $\mu$ l/vdolbinico negativno kontrolo (aktivacijski pufer), pozitivno kontrolo in vzorce. Delali smo v paralelki.

Takoj zatem smo ploščico vstavili v mikrotitrski čitalec Tecan Safire 2 (slika 8) in merili fluorescenco. Merili smo 100 kinetičnih krogov s kinetičnim intervalom 15 s. Meritve smo izvajali pri temperaturi 37 °C ter valovni dolžini ekscitacije 380 nm in emisije 460 nm.

Rezultati so bili s pomočjo programske opreme Magellan podani v RFU/s. Če je bil koeficient variabilnosti znotraj paralelke večji od 10 %, smo meritev vzorca ponovili.

V isti seriji meritev smo analizirali oba vzorca istega bolnika (vzorec odvzet dan pred in takoj po posegu).



**Slika 8:** Mikrotitrski čitalec Tecan Safire 2.

### **3.3 Koncentracija katepsina S**

#### **3.3.1 Reagenti in kemikalije**

- protitelesa: 1E3 anticatS MAb (Krka, d.d., Novo mesto, Slovenija)
- konjugirana protitelesa: 2B4 Mabs (Krka, d.d.)
- standard: prokatepsin S (0,8 mg/ml) (39)
- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Merck Millipore, Nemčija)
- $\text{NaHCO}_3$  (Merck Millipore)
- HCl (Merck Millipore)
- NaCl (Merck Millipore)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (Riedel – de Haën, Seelze, Nemčija)
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich)
- BSA (goveji serumski protein) (Sigma-Aldrich)
- TMB (tetrametil benzidin) (Sigma-Aldrich)
- substratni pufer za TMB
- 2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$

#### **3.3.2 Laboratorijska oprema in pripomočki**

- pipete Eppendorf Research in sterilni nastavki za pipete (Eppendorf)
- mikrocentrifugirke Eppendorf (1,5 ml – 5 ml) (Eppendorf)
- mikrotitrna ploščica (Thermo scientific, Waltham, ZDA)
- aparat za spiranje mikrotitrskih ploščic Wellwash™ (Thermo scientific)
- inkubator
- mešalec Vortex

- Tecan Safire 2 s programsko opremo Magellan (Tecan Group Ltd)

### 3.3.3 Pufri

Za izvedbo testa ELISA smo potrebovali puffer A, puffer B (spiralni puffer) in puffer C.

**Preglednica II:** Pufri za test ELISA.

Puffer A	1,6 g $Na_2CO_3$ + 2,9 g $NaHCO_3$ , $dH_2O$ do 1 l (pH=9,6)
Puffer B	170 g NaCl + 26,8 g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ + 8,8 g $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$ + 10g Tween 20, $dH_2O$ do 1 l (pH=7,2); 20x redčimo
Puffer C	2 g BSA/100 ml pufra B

Za puffer A smo sestavine natehtali, jih raztopili v destilirani vodi in uravnali pH. Za puffer B smo sestavine natehtali, jih raztopili v destilirani vodi, uravnali pH in ga nato 20x redčili v destilirani vodi. Za puffer C smo sestavino natehtali in jo raztopili v 100 ml pufra B.

Po pripravi smo puffer A hranili na temperaturi 4-8 °C, puffer B na sobni temperaturi in puffer C na temperaturi -20 °C.

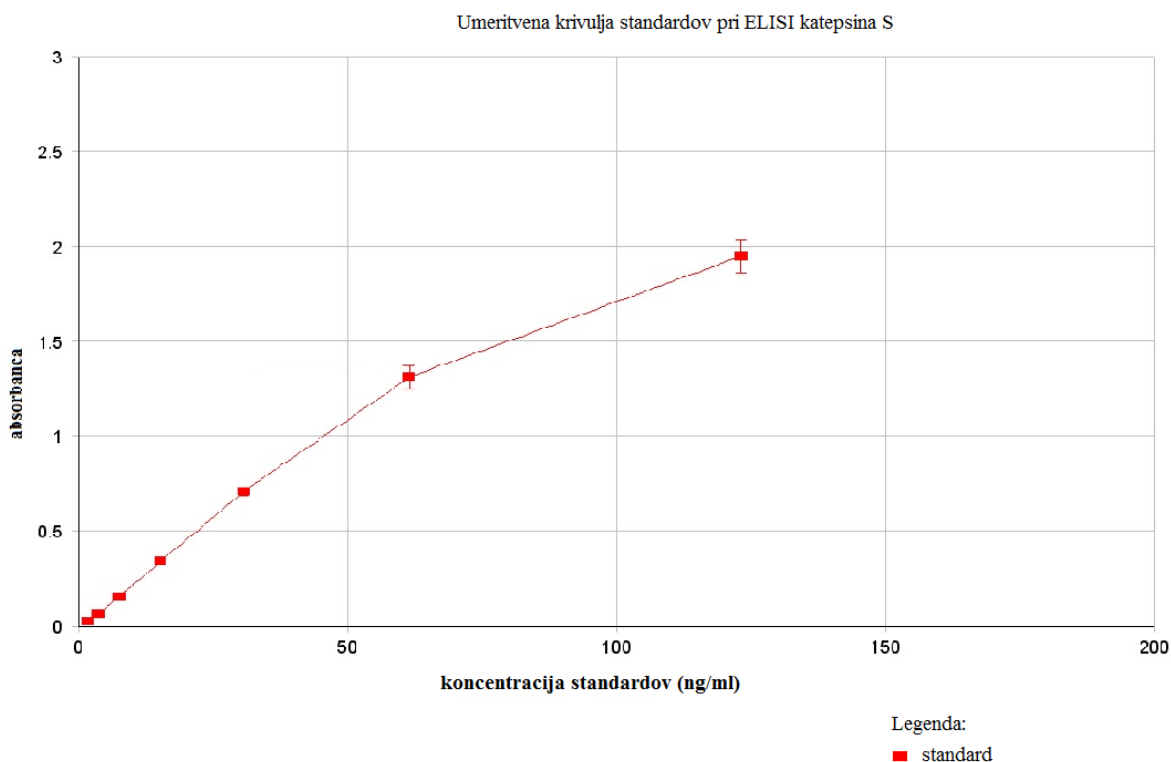
### 3.3.4 Potek dela

Primarna protitelesa 1E3 anticatS mAb smo odmrznili na ledu in jih v pufri A redčili do koncentracije 5 µg/ml. Nato smo v vsako vdolbinico na mikrotitrski ploščici odpipetirali 50 µl raztopine. Pripravljeno ploščico smo pokrili s folijo in jo čez noč inkubirali na temperaturi 4-8 °C. Naslednji dan smo mikrotitrsko ploščico trikrat spirali s pufrom B in otresli na papirnato brisačo. Potem smo blokirali vdolbinice, tako da smo v vsako odpipetirali 130µl pufra C in inkubirali od 30 minut do 2 uri na sobni temperaturi. Medtem smo na ledu odmrznili vzorce serumov bolnikov in prokatepsin S. V pufri C smo pripravili redčitveno lestvico standarda z naslednjimi koncentracijami prokatepsina S: 132,2 ng/ml (standard A), 61,6 ng/ml (standard B), 30,8 ng/ml (standard C), 15,4 ng/ml (standard D), 7,7 ng/ml (standard E), 3,8 ng/ml (standard F) in 1,9 ng/ml (standard G). Vzorce serumov bolnikov smo v pufri C redčili v razmerju 1:1. Po končani inkubaciji smo puffer C v luknjicah odlili in mikrotitrsko ploščico otresli na papirnato brisačo. Nato smo v vsako luknjico odpipetirali

100 µl pripravljene standarda, vzorca seruma bolnika oziroma pufer C, ki je služil kot negativna kontrola. Delali smo v paralelkah.

Pripravljeno ploščico smo 2 uri inkubirali na temperaturi 37 °C. Po inkubaciji smo ploščico ponovno trikrat spirali s pufrom B in otresli na papirnato brisačo. Na ledu smo odmrznili konjugirana protitelesa (2B4 Marjana) in jih redčili v pufru C v razmerju 1:9000. V vsako luknjico smo odpipetirali 100 µl pripravljene raztopine in mikrotitrsko ploščico 2 uri inkubirali na temperaturi 37 °C. Po končani inkubaciji smo ploščico trikrat spirali s pufrom B in otresli na papirnati brisači. Nato smo pripravili substrat, tako da smo redčili TMB v substratnem pufru za TMB v razmerju 1:1. V vsako luknjico smo odpipetirali 200 µl pripravljene substrata in ploščico inkubirali točno 15 minut v temi na sobni temperaturi. Reakcijo med substratom in konjugiranimi protitelesi smo ustavili s 50 µl 2 M  $H_2SO_4$ . Na koncu smo ploščico vstavili v čitalec Tecan Safire 2 in izmerili absorbanco pri valovni dolžini 450 nm.

Programska oprema Magellan nam je sama izračunala in izrisala umeritveno krivuljo standardov (slika 9) in na podlagi le-te podala koncentracijo katepsina S v vzorcih izbranih bolnikov.



**Slika 9:** Umeritvena krivulja standardov katepsina S.

Ker smo vzorce redčili v razmerju 1:1, smo morali za končni rezultat dobljeno koncentracijo katepsina S množiti z 2. Če je bil koeficient variabilnosti znotraj paralelke večji od 10 %, smo meritev vzorca ponovili.

V isti seriji meritve smo analizirali oba vzorca istega bolnika (vzorca odvzeta pred in po posegu).

### **3.4 Koncentracija cistatina C**

Meritve cistatina C smo izvajali na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo kliničnega centra v Ljubljani v Laboratoriju za analitiko encimov in elementov v sledovih.

#### **3.4.1 Analizator in reagenti**

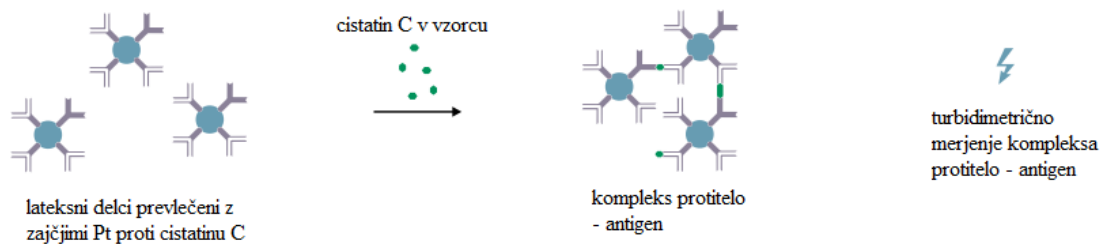
- analizator Roche/Hitachi Modular (Roche Diagnostic, Indianapolis, ZDA)
- reagent Cystatin C calibrator (Dako, Glostrup, Danska)
- reagent Reaction Buffer 9 (Dako)
- reagent Cystatin C immunoparticles (Dako)

#### **3.4.2 Potek dela**

Serumske vzorce bolnikov smo odmrznili in dobro premešali. Ker smo dodali nove reagente, smo metodo pred začetkom kalibrirali in naredili kontroli pri visoki in nizki vrednosti. Nato smo imena vzorcev bolnikov vnesli v računalniški program in vzorce bolnikov v analizator.

#### **3.4.3 Princip metode**

Analiza cistatina C deluje po turbidimetrični metodi PETIA. V inkubacijski fazi se tvorijo kompleksi med lateksnimi delci, prevlečenimi z zajčjimi protitelesi proti cistatinu C, in cistatinom C v vzorcu (slika 10). V fazi merjenja analizator pri 546 nm izmeri absorbanco in s tem stopnjo motnosti raztopine. Vrednost cistatina C je premosorazmerna motnosti vzorca. Na podlagi standardne kalibracijske krivulje analizator izračuna koncentracijo cistatina C v vzorcu.



**Slika 10:** Princip metode PETIA. Prirejeno po (40).

### 3.5 Statistična obdelava podatkov

Rezultate meritev in podatke pridobljene iz anamneze in statusa bolnikov smo statistično obdelali s programsko opremo SPSS Statistics 21.

Normalno porazdelitev merjenih spremenljivk smo preverili s testom Kolmogorov-Smirnov. S testom Hi-kvadrat smo preverili, če smo imeli v obeh skupinah bolnikov primerljivo razporeditev spolov.

Nato smo v vsaki skupini bolnikov (z restenozo in brez restenoze po šestih mesecih) za vse spremenljivke izračunali srednjo vrednost in odklon in ju primerjali med seboj. Za primerjavo spremenljivk, ki so se razporejale normalno (starost, celokupni holesterol, LDL, HDL, kreatinin, aktivnost katepsina S in koncentracija cistatina C) smo uporabili test Student. Za primerjavo ostalih spremenljivk (trigliceridi, CRP, koncentracija katepsina S) smo uporabili Mann-Whitney U-test.

Za ugotavljanje odvisnosti katepsina S od dejavnikov tveganja za restenozo smo uporabili večkratno logistično regresijo. Za vključevanje neodvisnih spremenljivk v model smo uporabili sočasno (enter) metodo. Za testiranje pomembnosti modela kot celote smo uporabili Omnibus test.

Za statistično pomembno smo vzeli vrednost  $p < 0,05$ .

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 Klinične značilnosti bolnikov

Klinične značilnosti bolnikov, ki smo jih vključili v raziskavo, so podane v preglednici III. Bolniki z restenozo ali brez nje se po starosti, razporeditvi po spolu, kajenju, prisotnosti diabetesa tipa 2 in farmakološki terapiji, ki bi lahko vplivala na katepsin S, niso razlikovali.

**Preglednica III:** Klinične značilnosti bolnikov.

Parameter	Restenoza (n = 20)	Brez restenoze (n = 24)	P
starost (leta)	69 (62/72)	63 (58/72)	NS
spol (moški/ženski)	13/7	19/5	NS
kajenje (da/bivši kadilec/ne)	8/10/2	5/14/5	NS
sladkorna bolezen tipa 2 (da/ne)	10/10	15/9	NS
statini (da/ne)	20/0	24/0	NS
zaviralci ACE (da/ne)	20/0	24/0	NS
blokatorji adrenergičnih receptorjev beta (da/ne)	11/9	14/10	NS

Starost je podana z mediano (25. percentil/ 75. percentil), pri ostalih parametrih je podano število bolnikov. NS pomeni, da ni statistično značilno.

Na pojav restenoze po PTA vplivajo različni dejavniki. Raziskave so pokazale, da imajo večjo verjetnost za razvoj restenoze ženske (41). Kajenje 10 cigaret dnevno naj bi zmanjšalo verjetnost za razvoj restenoze. Zvišane koncentracije karboksihemoglobina in ogljikovega monoksida v krvi kadilcev naj bi povzročale dilatacijo žilne stene in protivnetno delovale na poškodbo žilne stene, ki nastane pri PTA. Poleg tega naj bi ogljikov monoksid inhibiral proliferacijo gladkih mišičnih celic, ki sodelujejo v razvoju restenoze. Učinki kajenja naj bi pozitivno delovali samo na samo mesto poškodbe zaradi balonskega katetra, za ostalo žilje pa ima kajenje še vedno negativne posledice (42).



Velik dejavnik tveganja za restenozo je tudi prisotnost sladkorne bolezni. Sladkorni bolniki imajo okrnjeno endotelijsko funkcijo in zato povečano aktivnost trombocitov in agresivnejši odgovor na poškodbo žilne stene (43).

Znano je, da statini, zdravila za zniževanje ravni holesterola v krvi, znižajo koncentracijo in aktivnost Katepsina S (44). Tudi zaviralci ACE in antagonisti angiotenzina II, zdravila za zniževanje krvnega tlaka, znižajo nivo in aktivnost Katepsina S v krvi (45). Vplivom zdravil na rezultate raziskave smo se izognili tako, da smo v raziskavo vključili samo bolnike, ki so se zdravili s statini in zaviralci ACE ali antagonisti angiotenzina II. Ker še ni znano ali na vrednost Katepsina S v krvi vplivajo tudi blokatorji adrenergičnih receptorjev beta, smo v obe skupini vključili primerljivo število bolnikov, ki so prejeli to zdravilo.

## **4.2 Primerjava bolnikov z restenozo in brez nje**

V vsakem vzorcu smo pred končno izbiro bolnikov izmerili koncentracijo celokupnega holesterola, holesterola LDL in HDL, trigliceridov, kreatinina in CRP. Koncentracije celokupnega holesterola, holesterola HDL in LDL in trigliceridov smo izmerili zato, ker so njihove zvišane (celokupni holesterol, LDL, trigliceridi) oziroma znižane vrednosti (HDL) eden od dejavnikov tveganja za razvoj ateroskleroze (46). Zvišane vrednosti kreatinina nakazujejo na prisotnost ledvičnih obolenj pri katerih je vrednost cistatina C povišana (47, 48). Vrednost CRP je morala biti manjša od 10 mg/L. S tem smo se prepričali, da bolnik v času posega ni imel prisotnega vnetja, ki zvišuje vrednost CRP v krvi (49).

Med bolniki z restenozo ali brez nje se koncentracije parametrov (celokupni holesterol, HDL in LDL holesterol, trigliceridi, celokupni/HDL holesterol ter kreatinin) oziroma število bolnikov (CRP) pred PTA ni razlikovalo. To pomeni, da različne koncentracije analitov niso vplivale na končni rezultat raziskave. Podatki so zbrani v preglednici IV.

**Preglednica IV:** Primerjava med bolniki z restenozo in brez nje dan pred PTA.

Parameter	Odvzem krvi dan pred PTA		
	Restenoza (n = 20)	Brez restenoze (n = 24)	P
<b>celokupni holesterol (mmol/L)</b>	3,1 (2,8/3,4)	2,8 (2,6/3,3)	NS
<b>LDL holesterol (mmol/L)</b>	1,6 (1,2/1,9)	1,4 (1,2/1,9)	NS
<b>HDL holesterol (mmol/L)</b>	0,87 (0,69/1,03)	0,81 (0,70/0,93)	NS
<b>trigliceridi (mmol/L)</b>	1,5 (1,0/1,9)	1,2 (1,0/2,2)	NS
<b>celokupni/holesterol HDL</b>	3,68 (2,94/4,39)	3,97 (3,14/4,60)	NS
<b>kreatinin (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>	67 (53/75)	65 (59/80)	NS
<b>C-reaktivni protein (&lt;/<math>\geq</math> 5 mg/L)</b>	15/5	15/9	NS

Podatki predstavljajo mediano (25. percentil / 75. percentil). Podatki za CRP predstavljajo število bolnikov. NS pomeni, da ni statistično značilno.

Prav tako se med bolniki z restenozo in brez nje niso razlikovale koncentracije parametrov oziroma število bolnikov po PTA. Rezultati so predstavljeni v spodnji preglednici.

**Preglednica V:** Primerjava med bolniki z restenozo in brez nje takoj po PTA.

Parameter	Odvzem krvi takoj po PTA		
	Restenoza (n = 20)	Brez restenoze (n = 24)	P
<b>celokupni holesterol (mmol/L)</b>	2,9 (2,5/3,1)	2,7 (2,4/2,9)	NS
<b>LDL holesterol (mmol/L)</b>	1,4 (1,1/1,6)	1,3 (1,1/1,7)	NS
<b>HDL holesterol (mmol/L)</b>	0,76 (0,65/0,92)	0,71 (0,61/0,83)	NS
<b>trigliceridi (mmol/L)</b>	1,4 (1,0/1,9)	1,4 (1,1/2,1)	NS
<b>celokupni/ holesterol HDL</b>	3,58 (3,06/4,19)	4,11 (3,44/4,52)	NS
<b>kreatinin (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>	67 (54/77)	65 (58/76)	NS
<b>C-reaktivni protein (&lt;/<math>\geq</math> 5 mg/L)</b>	11/9	12/12	NS

Podatki predstavljajo mediano (25. percentil / 75. percentil). Podatki za CRP predstavljajo število bolnikov. NS pomeni, da ni statistično značilno.

Da bi ugotovili prognozično vrednost Katepsina S, smo v raziskavi določali njegovo aktivnost in koncentracijo ter koncentracijo cistatina C. Dobljeni podatki bolnikov z restenozo iz krvi odvzete dan pred PTA so zbrani v preglednici VI. V preglednici VII so zbrani dobljeni podatki bolnikov brez restenoze iz krvi odvzete dan pred PTA.

**Preglednica VI:** Izmerjena koncentracija in aktivnost Katepsina S ter koncentracija cistatina C dan pred PTA pri bolnikih z razvojem restenoze.

<b>ID bolnika</b>	<b>koncentracija Katepsina S (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b>aktivnost Katepsina S (RFU/s)</b>	<b>koncentracija cistatina C (mg/L)</b>
1	19,5	5,39	0,70
2	15,9	5,65	1,01
3	17,7	5,71	0,96
4	20,3	5,76	1,05
5	17,6	7,42	0,99
6	20,8	8,1	0,69
7	23,3	5,47	0,77
8	20,2	6,57	0,56
9	48,6	9,26	0,90
10	18,2	5,62	1,06
11	18,9	7,05	0,96
12	21,2	7,39	0,75
13	23,0	4,62	0,91
14	22,0	7,24	0,98
15	31,0	5,96	0,74
16	18,5	4,88	0,86
17	23,7	5,71	0,77
18	20,7	6,84	0,99
19	33,1	5,82	0,95

**Preglednica VII:** Izmerjena koncentracija in aktivnost Katepsina S ter koncentracija cistatina C dan pred PTA pri bolnikih brez razvoja restenoze.

<b>ID bolnika</b>	<b>koncentracija Katepsina S (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b>aktivnost Katepsina S (RFU/s)</b>	<b>koncentracija cistatina C (mg/L)</b>
20	13,7	4,49	0,81
21	33,4	6,09	0,87
22	18,9	4,69	0,76
23	24,2	7,48	0,86
24	16,8	8,64	0,85
25	22,4	6,79	1,38
26	20,4	4,05	1,32
27	13,2	4,93	0,78
28	14,7	5,09	0,84

29	23,3	3,65	0,44
30	15,7	4,63	1,07
31	17,2	5,82	0,69
32	18,9	4,28	0,86
33	19,9	3,68	0,88
34	12,4	3,25	0,77
35	15,7	5,24	0,72
36	13,4	5,22	0,70
37	20,8	6,64	0,73
38	16,4	5,55	0,97
39	18,9	4,37	0,79
40	19,0	6,29	1,08
41	23,7	4,64	0,86
42	13,0	7,37	1,01
43	13,3	5,93	0,58

Dobljeni podatki bolnikov z restenozo iz krvi odvzete takoj po PTA so zbrani v preglednici VIII. V preglednici IX so zbrani dobljeni podatki bolnikov brez restenoze iz krvi odvzete takoj po PTA.

**Preglednica VIII:** Izmerjena koncentracija in aktivnost Katepsina S ter koncentracija cistatina C takoj po PTA pri bolnikih z razvojem restenoze.

ID bolnika	konc. Katepsina S ( $\mu\text{g/L}$ )	aktivnost Katepsina S (RFU/s)	konc. cistatina C (mg/L)
1	18,8	5,96	0,74
2	10,9	6,91	0,64
3	15,1	7,53	0,77
4	19,1	5,90	0,88
5	17,3	7,71	1,04
6	12,2	9,99	0,67
7	20,0	5,17	0,76
8	18,8	7,24	0,65
9	45,3	10,18	0,88
10	15,5	5,52	1,06
11	17,4	7,51	0,83
12	23,4	7,50	0,75
13	30,9	5,18	0,97
14	21,5	7,43	0,99
15	22,7	6,34	0,69
16	18,2	4,26	0,81
17	24,0	6,36	0,67
18	30,3	8,18	0,82
19	36,4	6,60	0,96

**Preglednica IX:** Izmerjena koncentracija in aktivnost katepsina S ter koncentracija cistatina C takoj po PTA pri bolnikih brez razvoja restenoze.

<b>ID bolnika</b>	<b>konc. katepsina S (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b>aktivnost katepsina S (RFU/s)</b>	<b>konc. cistatina C (mg/L)</b>
20	12,6	5,0	0,76
21	27,2	6,78	0,82
22	19,9	4,08	0,73
23	24,7	7,37	0,81
24	14,7	9,77	0,85
25	21,2	6,63	0,95
26	22,1	4,29	1,29
27	15,3	5,01	0,94
28	16,0	5,63	0,82
29	22,1	3,32	1,43
30	12,4	4,54	0,82
31	17,7	5,39	0,76
32	19,6	4,93	0,68
33	16,1	3,11	0,83
34	10,0	2,81	0,73
35	15,6	5,07	0,66
36	10,2	5,41	0,68
37	20,0	7,20	0,66
38	23,8	4,66	0,92
39	17,6	4,76	0,74
40	14,2	6,23	0,99
42	12,3	5,21	1,02
43	16,5	5,68	0,62

Dokazali smo, da je med koncentracijama katepsina S skupine z restenozo in skupine brez restenoze dan pred PTA statistično značilna razlika ( $p < 0,015$ ). Prav tako je statistično značilna razlika v aktivnosti katepsina S ( $p < 0,04$ ) in posledično razmerju katepsina S in cistatina C ( $p < 0,05$ ). Zaradi tega lahko sklepamo, da bi bila koncentracija katepsina S merjena pred PTA lahko dober napovedni kazalnik za razvoj restenoze. Rezultati so podani v preglednici X.

<b>Odvzem krvi dan pred PTA</b>			
<b>Parameter</b>	<b>Restenoza (n = 20)</b>	<b>Brez restenoze (n = 24)</b>	<b>p</b>
<b>koncentracija Katepsina S (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	20,5 (18,6/23,3)	18,0 (14,0/20,7)	<b>0,015</b>
<b>aktivnost Katepsina S (RFU/s)</b>	5,79 (5,51/7,20)	5,16 (4,40/6,24)	<b>0,04</b>
<b>koncentracija Cistatina C (mg/L)</b>	0,91 (0,75/0,99)	0,84 (0,74/0,94)	NS
<b>Katepsin S/cistatin C</b>	25,4 (19,3/30,9)	20,9 (16,9/24,9)	<b>0,050</b>
<b>aktivnost Katepsina S/cistatin C</b>	7,34 (5,70/8,08)	6,12 (5,11/8,02)	NS

**Preglednica X:** Primerjava izmerjenih parametrov med skupino bolnikov z restenoza in brez restenoze dan pred PTA.

V preglednici so podane mediane (25. percentil/ 75. percentil). NS pomeni, da ni statistično značilno.

Takoj po PTA je bila statistično značilna razlika v aktivnosti Katepsina S ( $p < 0,003$ ) in posledično pri razmerju aktivnosti Katepsina S in Cistatina C ( $p < 0,02$ ). Podatki so predstavljeni v spodnji preglednici.

<b>Odvzem krvi takoj po PTA</b>			
<b>Parameter</b>	<b>Restenoza (n = 20)</b>	<b>Brez restenoze (n = 24)</b>	<b>p</b>
<b>koncentracija Katepsina S (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	19,6 (17,3/23,9)	17,0 (14,3/20,9)	NS
<b>aktivnost Katepsina S (RFU/s)</b>	6,76 (5,62/7,53)	5,14 (4,57/6,20)	<b>0,003</b>
<b>koncentracija Cistatina C (mg/L)</b>	0,79 (0,69/0,94)	0,82 (0,73/0,94)	NS
<b>Katepsin S/cistatin C</b>	26,0 (20,0/32,8)	21,0 (15,7/27,0)	0,053
<b>aktivnost Katepsina S/cistatin C</b>	8,54 (6,71/10,08)	6,72 (5,17/7,93)	<b>0,02</b>

**Preglednica XI:** Primerjava izmerjenih parametrov med skupino bolnikov z restenozo in brez nje takoj po PTA.

V preglednici so podane mediane (25. percentil/ 75. percentil). NS pomeni, da ni statistično značilno.

Poleg koncentracije Katepsina S je bila pred posegom PTA povišana tudi aktivnost Katepsina S ( $p < 0,04$ ).

Ker je Cistatin C znani endogeni inhibitor Katepsina S (50), Katepsin S pa ima pomembno vlogo pri razvoju ateroskleroze, smo predvidevali, da bo ob povišani aktivnosti Katepsina S v krvi prisotna znižana koncentracija Cistatina C. Ugotovili smo, da koncentracija Cistatina C ni povezana s koncentracijo in aktivnostjo Katepsina S in s tem predvideli, da Cistatin C ne vpliva na aktivnost Katepsina S in tako na razvoj ateroskleroze. V nasprotju z nami so v predhodnih raziskavah dokazali, da povišana vrednost Cistatina C v serumu nakazuje na bolezen koronarnih arterij in njihovo restenozo (51, 52). Možno je, da je do razlik prišlo zato, ker so v prej naštetih raziskavah vključili bolnike s serumsko koncentracijo CRP nad 10 mg/L (v našo raziskavo smo vključili samo bolnike s CRP < 10 mg/L). Ta lahko poleg ateroskleroze nakazuje tudi na druge oblike vnetij v telesu, ki zvišujejo nivo CRP in Cistatina C (53).

Statistično značilna razlika pri razmerju med Katepsinom S in Cistatinom C ( $p < 0,05$ ) je verjetno posledica statistično značilne razlike med koncentracijo Katepsina S pri bolnikih z razvojem restenoze in koncentracijo Katepsina S pri bolnikih brez razvoja restenoze in ne potrjuje naše hipoteze o prognostični vrednosti Cistatina C za razvoj restenoze v šestih mesecih po PTA.

#### **4.2.1 Neodvisnost ostalih dejavnikov tveganja za restenozo od Katepsina S**

Z večkratno logistično regresijo smo preverili neodvisnost ostalih dejavnikov tveganja za razvoj restenoze od koncentracije Katepsina S oziroma njegove encimske aktivnosti. Zvišana koncentracija in aktivnost Katepsina S pred PTA sta povezana z razvojem restenoze neodvisno od dejavnikov tveganja nastanka restenoze in ateroskleroze. Podrobnejši podatki so podani v preglednici XII.

**Preglednica XII:** Odvisnost Katepsina S od ostalih dejavnikov tveganja za restenozo preverjena z večkratno logistično regresijo.

	Model	Parametri v modelu	p	Exp(B)
<b>Odvzem krvi dan pred PTA</b>	Model 1	sladkorna bolezen tipa 2 (da/ne)	0,371	1,941
		C-reaktivni protein (</≥ 5 mg/L)	0,199	0,310
		celotni holesterol/ holesterol HDL	0,139	0,496
		cistatin C (mg/L)	0,990	1,028
		koncentracija Katepsina S (µg/L)	<b>0,012</b>	1,276
		konstanta	0,454	0,098
	Model 2	sladkorna bolezen tipa 2 (da/ne)	0,619	1,426
		C-reaktivni protein (</≥ 5 mg/L)	0,936	1,071
		celotni holesterol/ holesterol HDL	0,283	0,649
		cistatin C (mg/L)	0,800	0,585
		aktivnost Katepsina S (RFU/s)	<b>0,046</b>	1,871
		konstanta	0,319	0,058
<b>Odvzem krvi takoj po PTA</b>	Model 1	sladkorna bolezen tipa 2 (da/ne)	0,605	1,429
		C-reaktivni protein (</≥ 5 mg/L)	0,456	0,586
		celotni holesterol/ holesterol HDL	0,146	0,493
		cistatin C (mg/L)	0,194	0,027
		koncentracija Katepsina S (µg/L)	<b>0,049</b>	1,120
		konstanta	0,418	14,696
	Model 2	sladkorna bolezen tipa 2 (da/ne)	0,974	1,024
		C-reaktivni protein (</≥ 5 mg/L)	0,611	1,452
		celotni holesterol/ holesterol HDL	0,335	0,641
		cistatin C (mg/L)	0,642	0,315
		aktivnost Katepsina S (RFU/s)	<b>0,029</b>	1,758
		konstanta	0,581	0,131



Dejavniki tveganja so sladkorna bolezen tipa 2 (54), CRP (55), razmerje celokupnega in HDL holesterola in cistatin C, kot endogeni inhibitor katepsina S (56). Koncentracija in aktivnost katepsina S v serumu dan pred PTA sta povezani z restenozo femoropoplitealne arterije ( $p < 0,012$  in  $p < 0,046$ ) neodvisno od ostalih dejavnikov tveganja. Prav tako sta tudi po posegu koncentracija in aktivnost katepsina S v serumu povezani z restenozo femoropoplitealne arterije ( $p < 0,049$  in  $p < 0,029$ ) neodvisno od ostalih dejavnikov tveganja.

## 5 SKLEPI

V magistrski nalogi smo želeli preučiti prognostično vrednost katepsina S za restenozo femoropoplitealne arterije, ki se v enem letu po PTA pojavi pri približno polovici bolnikov.

Glavne ugotovitve magistrske naloge so:

- Koncentracija katepsina S dan pred PTA je statistično višja pri bolnikih, ki so v šestih mesecih razvili restenozo kot pri bolnikih, ki je niso.
- Aktivnost katepsina S dan pred PTA je statistično višja pri bolnikih, ki so v šestih mesecih razvili restenozo kot pri bolnikih, ki je niso.
- Aktivnost katepsina S takoj po PTA je statistično višja pri bolnikih, ki so v šestih mesecih razvili restenozo kot pri bolnikih, ki je niso.
- Koncentracija cistatina C se med bolniki z restenozo in brez nje ne razlikuje.
- Aktivnost katepsina S v serumu ni povezana s koncentracijo cistatina C v serumu.
- Povezanost med zvišano koncentracijo in aktivnostjo katepsina S v serumu v času PTA in restenozo v šestih mesecih po posegu je neodvisna od opazovanih dejavnikov tveganja za restenozo (sladkorna bolezen tipa 2, razmerje celokupnega in HDL holesterola in koncentracija cistatina C).

S tem, ko smo dokazali povezavo med zvišano vrednostjo katepsina S v krvi bolnikov in kasnejšim razvojem restenoze, lahko zaključimo, da je katepsin S potencialni prognostični kazalnik za restenozo femoropoplitealne arterije. Z njegovim določanjem pred PTA bi lahko prepoznali bolnike z večjim tveganjem za restenozo, ki bi bili zaradi tega deležni agresivnejše terapije in nadzora. S tem bi lahko omejili obseg ali celo preprečili nastanek restenoze.

Pred uporabo v rutini bo potrebnih še veliko raziskav. Predvsem na večjem številu bolnikov, ki bodo imeli prisotnih čim manj ostalih dejavnikov tveganja za restenozo (sladkorna bolezen tipa 2, zvišana raven holesterola, ledvična obolenja, periferna arterijska bolezen) oziroma bodo ti dejavniki homogeni (npr. bolniki z enako stopnjo razvoja periferne arterijske bolezni, podobno zvišana raven holesterola ...).

## 6 LITERATURA

1. Rupnik M, Bresjanac M: Patofiziologija s temelji fiziologije, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2002
2. <http://www.zdravstvena.info/vsznj/motnje-cirkulacije-ami-cvi-edemi-infarkt-kap-anevrizma-trombi/>. Dostopno: julij, 2016.
3. Poredoš P, Poredoš P, Visnovič-Poredoš A: Pomen odkrivanja predkliničnih oblik ateroskleroze. Zdravn vestn 2006; 75: 475-81.
4. Falk E: Pathogenesis of atherosclerosis. Journal of the American College of Cardiology 2006; 47: C7-C12.
5. J, Fürst. Farmakoterapija koronarne bolezni: dostopno na: [http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/11/Predmeti/Klinicna\\_farmacija/Srce\\_in\\_zile/Fuerst\\_Koronarna\\_bolezen\\_2010.pdf](http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/11/Predmeti/Klinicna_farmacija/Srce_in_zile/Fuerst_Koronarna_bolezen_2010.pdf); julij, 2016.
6. Petrovič D: Histološke spremembe možganskih arterij in genetska, Inštitut za histologijo in embriologijo, Medicinska fakulteta Ljubljana.
7. [http://www.full-health.com/arterial\\_cleansing.htm](http://www.full-health.com/arterial_cleansing.htm). Dostopno: julij, 2016.
8. [https://www.atrainceu.com/course-module/1711373-102\\_coronary-artery-disease-cad-module-04](https://www.atrainceu.com/course-module/1711373-102_coronary-artery-disease-cad-module-04). Dostopno: julij, 2016.
9. Cullen P, Rauterberg J, Lorkowski S: The Pathogenesis of Atherosclerosis. HEP 2005; 170: 3-70.
10. <http://www.slideshare.net/unab.patologia/06-cat-cardiovascular-ii>. Dostopno: julij 2016.
11. [http://sphweb.bumc.bu.edu/otlt/MPHModules/PH/PH709\\_Heart/PH709\\_Heart3.html](http://sphweb.bumc.bu.edu/otlt/MPHModules/PH/PH709_Heart/PH709_Heart3.html). Dostopno: julij, 2016.
12. Fuster V, Stein B, Ambrose JA, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH.: Atherosclerotic plaque rupture and thrombosis. Evolving concepts. Circulation 1990; 82: II47-59.
13. Esterbauer H, Wäg G, Puhl H: Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. Br Med Bull 1993; 49 (3): 566-576.
14. Barter P: The role of HDL-cholesterol in preventing atherosclerotic disease. European Heart Journal Supplements 2005; 7: F4-F8.

15. <http://www.kclj.si/dokumenti/0002a1-00043d.pdf>. Dostopno: julij 2016.
16. Ziva. Periferna Arterijska Bolezen. Dostopno na: [http://www.medenosrce.net/predmeti/interna-medicina/258-seminarji/1895-periferna-arterijska-bolezen--2008---tekst-?-ppt-=",](http://www.medenosrce.net/predmeti/interna-medicina/258-seminarji/1895-periferna-arterijska-bolezen--2008---tekst-?-ppt-=) 2008. Julij, 2016.
17. <http://www.drmed.org/wp-content/uploads/2014/06/37-Perkutana-angioplastika.pdf>. Dostopno: julij 2016.
18. <https://en.wikipedia.org/wiki/Angioplasty>. Dostopno: julij 2016.
19. [http://perpetuum-lab.com.hr/wiki/plab\\_wiki/anatomija-covjeka-enciklopedija/poplitealna-arterija;-zakoljena-arterija-r181/](http://perpetuum-lab.com.hr/wiki/plab_wiki/anatomija-covjeka-enciklopedija/poplitealna-arterija;-zakoljena-arterija-r181/). Dostopno: julij 2016.
20. <http://slideplayer.com/slide/6366292/>. Dostopno: julij 2016.
21. Salapura V, Blinc A: Pojav restenoze stegenske arterije po perkutani transluminalni angioplastiki. *Zdrav Vestn* 2014; 83: 291–8.
22. Haudenschild CC: Pathogenesis of restenosis. *Zeitschrift fur Kardiologie* 1989; 78 Suppl 3: 28-34.
23. Wilkinson RD, Williams R, Scott CJ, Burden RE: Cathepsin S: therapeutic, diagnostic, and prognostic potential. *Biological Chemistry* 2015; 8: 867–882.
24. Parks WC, Mecham R: *Extracellular Matrix Degradation*. Hardcover 2011: 23-51.
25. Jadhav PK, Schiffler MA, Gavardinas K, Kim EJ, Matthews DP, Staszak MA, Coffey DS, Shaw BW, Cassidy KC, Brier RA, Zhang Y, Christie RM, Matter WF, Qing K, Durbin JD, Wang Y, Deng GG: Discovery of cathepsin s inhibitor ly3000328 for the treatment of abdominal aortic aneurysm. *Acs Med.Chem.Lett.* 2014; 5: 1138
26. Vozelj M: *Temelji imunologije*. DZS d.d., Ljubljana, 2000.
27. Shi GP, Villadangos JA, Dranoff G, Small C, Gu L, Haley KJ, Riese R, Ploegh HL, Chapman HA: Cathepsin S Required for Normal MHC Class II Peptide Loading and Germinal Center Development. *Immunity* 1999; 2: 197–206.
28. Reddy VB, Sun S, Azimi E, Elmariah SB, Dong X, Lerner EA: Redefining the concept of protease-activated receptors: cathepsin S evokes itch via activation of Mrgprs. *Nat Commun* 2015; 6: 7864.

29. De Nooijer R, Bot I, Von der Thüsen JH, Leeuwenburgh MA, Overkleeft HS, Kraaijeveld AO, Dorland R, van Santbrink PJ, van Heiningen SH, Westra MM, Kovanen PT, Jukema JW, van der Wall EE, van Berkel TJ, Shi GP, Biessen EA: Leukocyte cathepsin S is a potent regulator of both cell and matrix turnover in advanced atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29(2):188-94.
30. Johnson J. George S. J: *Atherosclerosis. Molecular and cellular mechanisms.* WILEY-VCH 2010.
31. Wilkinson RDA, Williams R, Scott CJ, Burden RE: Cathepsin S: therapeutic, diagnostic, and prognostic potential. *Biological Chemistry* 2015; 396(8): 867–82.
32. Chew JSC, Saleem M, Florkowski CM, Peter MG: Cystatin C—A Paradigm of Evidence Based Laboratory Medicine. *Clin Biochem Rev* 2008; 29(2): 47–62.
33. <http://www.man.poznan.pl/CBB/research.html>. Dostopno: julij 2016.
34. Hall A, Håkansson K, Mason RW, Grubb A, Abrahamson M: Structural Basis for the Biological Specificity of Cystatin C: Identification of leucine 9 in the N-terminal binding region as a selectivity-conferring residue in the inhibition of mammalian cysteine peptidases. *The journal of biological chemistry* 1996; 10: 5115-5121.
35. Piñóna P, Kaskia JC: Inflammation, Atherosclerosis and Cardiovascular Disease Risk: PAPP-A, Lp-PLA2 and Cystatin C. New Insights or Redundant Information? *Rev Esp Cardiol.* 2006; 59: 247-58.
36. Kaur G, Levy E: Cystatin C in Alzheimer's disease. *Front Mol Neurosci* 2012; 5: 79.
37. Shi GP, Sukhova GK, Grubb A, Ducharme A, Rhode LH, Lee RT, Ridker PM, Libby P, Chapman HA: Cystatin C deficiency in human atherosclerosis and aortic aneurysms. *J Clin Invest.* 1999; 104(9): 1191–1197.
38. Murty MSN, Sharma UK, Pandey VB, Kankare SB: Serum cystatin C as a marker of renal function in detection of early acute kidney injury. *Indian J Nephrol* 2013; 23(3): 180–183.
39. Kopitar G, Dolinar M, Štrukelj B, Pungercar J, Turk V: Folding and activation of human procathepsin S from inclusion bodies produced in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 1996; 236(2): 558-62.

40. Tina-quant® Cystatin C, Particle-enhanced turbidimetric immunoassay (PETIA) for the quantitative determination of cystatin C in human serum and plasma. Roche Diagnostics Ltd., 2011.
41. Roller RE, Schnedl WJ, Korninger C: Predicting the risk of restenosis after angioplasty in patients with peripheral arterial disease. *Clin Lab.* 2001; 47(11-12): 555-9.
42. Schillinger M, Exner M, Mlekusch W, Haumer M, Sabeti S, Ahmadi R, Wagner O, Minar E: Effect of smoking on restenosis during the 1st year after lower-limb endovascular interventions. *Radiology.* 2004; 231(3): 831-8.
43. Dieter RS, Laird JR: Overview of Restenosis in Peripheral Arterial Interventions. *Endovascular today* 2004.
44. Mirjanic-Azaric B et al: Interrelated cathepsin S-Lowering and LDL Subclass Profile Improvements Induced by Atorvastatin in the Plasma of Stable Angina Patients. *Journal of Atherosclerosis and Trombosis* 2014; 21: 868-877.
45. Xian Wu Cheng, Toyooki Murohara, Masafumi Kuzuya, Hideo Izawa, Takeshi Sasaki, Koji Obata, Kohzo Nagata, Takao Nishizawa, Masakazu Kobayashi, Takashi Yamada, Weon Kim, Kohji Sato, Guo-Ping Shi, Kenji Okumura, Mitsuhiro Yokota: Superoxide-dependent cathepsin activation is associated with hypertensive myocardial remodeling and represents a target for angiotensin II type 1 receptor blocker treatment. *Am J Pathol.* 2008; 173: 358–369.
46. Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, Newman WP, Tracy RE, Wattigney WA: Association between Multiple Cardiovascular Risk Factors and Atherosclerosis in Children and Young Adults. *N Engl J Med* 1998; 338: 1650-1656.
47. Levey AS, Coresh J, Greene T, Stevens LA, Zhang Y, Hendriksen S, Kusek JW, Van Lente F: Using Standardized Serum Creatinine Values in the Modification of Diet in Renal Disease Study Equation for Estimating Glomerular Filtration Rate. *Ann Intern Med* 2006; 145(4): 247-254.
48. Peralta CA, Shlipak MG, Judd S, Cushman M, McClellan W, Zakai NA, Safford MM, Zhang X, Muntner P, Warnock D: Detection of chronic kidney disease with creatinine, cystatin C, and urine albumin-to-creatinine ratio and association with progression to end-stage renal disease and mortality. *JAMA* 2011; 305: 1545-1552.

49. Morley JJ, Kushner I.: Serum C-reactive protein levels in disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1982; 389: 406-18.
50. Salgado JV, Souza FL, Salgado BJ: How to understand the association between cystatin C levels and cardiovascular disease: Imbalance, counterbalance, or consequence? *J Cardiol.* 2013; 62(6): 331-5.
51. Koc M, Batur MK, Karaarslan O, Abali G: Clinical utility of serum cystatin C in predicting coronary artery disease. *Cardiol J.* 2010.; 17(4): 374-80.
52. Zhao C, Yang L, Mao L, Zhong L, Li X, Wei S: Cystatin C associates with the prediction of in-stent restenosis among patients receiving stent implantation: results of the 1-year follow-up. *Coron Artery Dis.* 2013; 24(5): 357-60.
53. . Knight EL, Verhave JC, Spiegelman D, Hillege HL, de Zeeuw D, Curhan GC, de Jong PE: Factors influencing serum cystatin C levels other than renal function and the impact on renal function measurement. *Kidney Int.* 2004; 65(4): 1416-21.
54. Clark TW, Groffsky JL, Soulen MC: Predictors of long-term patency after femoropopliteal angioplasty: results from the STAR registry. *J Vasc Interv Radiol* 2001; 12(8): 923-33.
55. Schillinger M, Minar E: Restenosis After Percutaneous Angioplasty: The Role of Vascular Inflammation. *Vasc Health Risk Manag* 2005; 1(1): 73–78.
56. Taglieri N, Koenig W, Kaski JC: Cystatin C and cardiovascular risk. *Clin Chem.* 2009; 55(11):1932-c 43.