

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI  
SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Vedrana Vidaić  
ULOGA KALPAINA U BOLESTIMA SRČANOG MIŠIĆA  
Diplomski rad

Rijeka, 2021.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI  
SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Vedrana Vidaić  
ULOGA KALPAINA U BOLESTIMA SRČANOG MIŠIĆA  
Diplomski rad

Rijeka, 2021.

Mentor rada: doc.dr.sc. Kovička Matušan-Ilijaš, dr. med.

Diplomski rad ocjenjen je dana \_\_\_\_\_ u/na \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Doc.dr.sc. Emina Babarović, dr. med
2. Doc.dr.sc. Ita Hadžisejdić, dr. med.
3. Prof.dr.sc. Natalia Kučić, dr. med

Rad sadrži 35 stranica, 7 slika, 2 tablice, 49 literaturnih navoda.

## ZAHVALA

Veliko hvala ide mojoj mentorici, doc.dr.sc. Kovički Matušan-Ilijaš, dr. med, koja mi je pomogla u izradi ovog rada te svojom ljudskošću i znanjem doprinijela mom uspjehu.

Hvala mojim roditeljima i sestri koji su me bezuvjetno podržavali na cijelom putu mog obrazovanja.

Hvala prijateljima, obitelji i dečku koji su mi uljepšali studentske dane i vjerovali u mene kad ni sama nisam.

## SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
1.1. Histologija srčanog mišića.....	1
1.2. Bolesti srca .....	3
1.2.1. Zatajivanje srca .....	3
1.2.2. Ishemijska bolest srca.....	4
1.2.3. Pektoralna angina .....	5
1.2.4. Infarkt miokarda .....	6
1.2.4.1. Etiologija i epidemiologija.....	6
1.2.4.2. Patogeneza .....	6
1.2.4.3. Patologija .....	7
1.2.4.4. Patofiziologija ishemijskog oštećenja.....	8
1.2.4.5. Klinička slika i komplikacije .....	9
2. Svrha rada .....	11
3. Pregled literature na zadanu temu.....	12
3.1. Sustav kalpaina .....	12
3.1.1. Nomenklatura .....	12
3.1.2. Struktura domena $\mu$ - i m- kalpaina.....	13
3.1.3. Regulacija kalpainske aktivnosti.....	15
3.2. Fiziološke funkcije i patofiziološke implikacije kalpainskog sustava.....	16
3.3. Uloga kalpaina u oštećenju kardiomiocita.....	16
3.4. Uloga kalpaina u IRI-u miokarda .....	20
3.4.1. Globalna ishemija.....	20
3.4.2. Oštećenje funkcije mitohondrija .....	21
3.4.3. Djelomična ishemija i infarkt miokarda.....	23
3.5. Molekularne uloge kalpaina u patofiziologiji remodeliranja srčanog mišića.....	24

3.5.1.	Hipertrofija .....	24
3.5.2.	Upalne/imunosne reakcije .....	25
3.5.3.	Fibroza.....	26
3.5.4.	Apoptoza/nekroza.....	27
4.	Rasprava.....	29
5.	Zaključak.....	31
6.	Sažetak .....	32
7.	Summary .....	32
8.	Literatura.....	34
9.	Životopis .....	39

## POPIS SKRAĆENICA I AKRONIMA

IRI (*eng. ischemia-reperfusion injury*)- ishemijsko-reperfuzijska ozljeda

UPS (*eng. ubiquitin proteasome system*)- ubikvitin-proteasom sustav

ROS (*eng. reactive oxygen species*) - reaktivne vrste kisika

InsP<sub>3</sub> (*eng. inositol 1,4,5- triphosphate*) – inozitol 1,4,5-trifosfat

ECM (*eng. extracellular matrix*) – ekstracelularni matriks

MMP (*eng. matrix metalloproteinases*) – metaloproteinaze matriksa

NCX (*eng. Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger*) - Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> izmjenjivač

HF (*eng. heart failure*) – zatajenje srca

IHD (*eng. ischemic heart disease*) - ishemijska srčana bolest

AP (*lat. angina pectoris*) – pektoralna angina

MI (*eng. myocardial infarction*) – infarkt miokarda

ATP – adenzin trifosfat

MPTP (*eng. mitochondrial permeability transition pore*) -mitohondrijska permeabilizacijska pora

pH (*lat. potentia hydrogenii*) - snaga vodika

EKG -elektrokardiogram

CK (*eng. creatine kinase*) - kreatin kinaza

TnT - troponin T

ETC (*eng. electron transport chain*) – elektronski transportni lanac

AIF (*eng. apoptosis inducing factor*) - inducirajući faktor apoptoze

SR (*eng. sarcoplasmic reticulum*) – sarkoplazmatska mrežica

Cyt c (*eng. cytochrome c*) – citokrom c

JP2 (*eng. junctophilin-2*) –junktofilin-2

PRELIMINARNE STRANICE

BROJ PRELIMINARNIH STRANICA: 8



## 1. Uvod

### 1.1. Histologija srčanog mišića

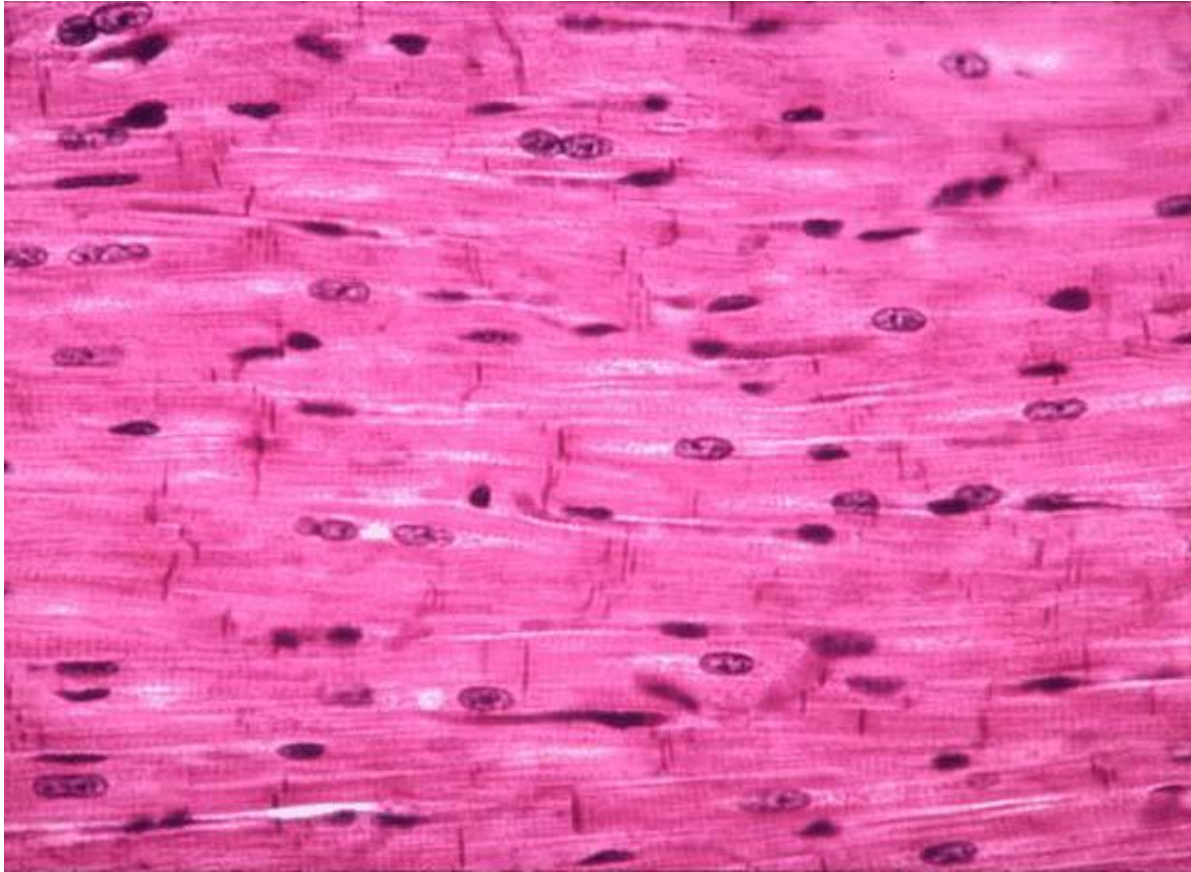
Srce je mišićni organ koji se ritmički steže, pumpajući krv kroz krvni optok. Stijenka mu se sastoji od 3 sloja: unutrašnji ili endokard, srednji ili miokard i vanjski ili perikard.

Miokard je najdeblji sloj srca, a čine ga srčane mišićne stanice. Zrele srčane mišićne stanice široke su prosječno 15  $\mu\text{m}$ , a duge oko 85 do 100  $\mu\text{m}$ . Pokazuju optičku pojavu poprečne ispruganosti. Svaka srčana mišićna stanica u središtu ima jednu ili dvije blijedo obojene jezgre. Oko mišićnih stanica nakazi se endomizij, nježan omotač vezivnog tkiva s bogatom mrežom krvnih kapilara. Posebna značajka srčanog mišićnog tkiva je da sadrži tamne poprečne crte koje se javljaju u nepravilnim razmacima. Takvi spojni kompleksi nazivaju se prijelazne ploče. (Slika 1)

Prema građi i funkciji kontraktilnih proteina srčane mišićne stanice naizgled se ne razlikuju od skeletnih mišićnih vlakana. Međutim, T-tubuli su brojniji i veći u mišićima klijetke od onih u skeletnom mišiću. Sarkoplazmatska mrežica nije tako dobro razvijena i prolazi nepravilno među miofilamentima. Stoga nema jasno odijeljenih snopova miofibrila.

Srčani mišić sadrži karakteristične dijade koje su sastavljene od jednog T-tubula i jedne cisterne endoplazmatskog retikuluma.

Srčane mišićne stanice sadržavaju brojne mitohondrije. Oni zauzimaju najmanje 40% citoplazmatskog volumena, što je odraz potrebe srčanog mišića za anaerobnim metabolizmom. Masne kiseline su glavni izvor energije i pohranjene su kao trigliceridi u lipidnim kapljicama. Glikogen, kojega u srčanom mišiću ima malo, može se razgraditi na glukozu i iskoristiti za stvaranje energije za vrijeme stresa.



Slika 1. Srčano mišićno tkivo.

( preuzeto sa:

[http://stevegallik.org/sites/histologyolm.stevegallik.org/htmlpages/HOLM\\_Chapter07\\_Page08.html](http://stevegallik.org/sites/histologyolm.stevegallik.org/htmlpages/HOLM_Chapter07_Page08.html))

Srce posjeduje sustav za stvaranje ritmičnih podražaja. Čine ga dva čvora- sinusatrijski i atrioventrikularni čvor, skupa s atrioventrikularnim snopom. I simpatički i parasimpatički dio vegetativnog živčanog sustava sudjeluju u inervaciji srca i čine spletove rasprostranjene na bazi srca. Ganglijske živčane stanice i živčana vlakna smješteni su u područjima uz atrioventikularni i sinusatrijski čvor. Stimulacija parasimpatičkog dijela usporava rad srca, dok ga simulacija simpatičkih živaca ubrzava. (1)

## **1.2. Bolesti srca**

Pod pojmom bolesti srca možemo uključiti zatajivanje srca, urođene srčane greške, ishemijsku srčanu bolest, hipertenzivnu srčanu bolest, bolesti endokarda i zalistaka, primarne bolesti miokarda, bolesti perikarda i tumore srca. (2) Najčešći uzrok srčanih bolesti je ateroskleroza. Za potrebe ovog rada поближе ćemo opisati pojmove zatajivanja srca i ishemijske srčane bolesti.

### **1.2.1. Zatajivanje srca**

Zatajivanje srca (HF) smatra se epidemijskom bolesti modernog svijeta, zahvaćajući oko 1% do 2% odraslog stanovništva. HF vodeći je i rastući javnozdravstveni problem s visokom stopom morbiditeta i mortaliteta. (3) Zatajivanje srca je klinički sindrom koji se sastoji od znakova i simptoma uzrokovanim disfunkcijom srca kao rezultat poremećenog ventrikularnog punjenja ili ejskije krvi.

Etiopatogenetski HF možemo podijeliti u dvije skupine: zatajivanje lijeve strane srca i zatajivanje desne strane srca. Zatajivanje lijeve strane srca najčešće je posljedica ishemijske bolesti srca, a može biti uzrokovana i arterijskom hipertenzijom, bolestima srčanih zalistaka i kardiomiopatijama. Zatajivanje lijeve strane srca događa se uslijed ili povećanog otpora istjecanju krvi iz lijeve klijetke ili volumne preopterećenosti lijeve klijetke. Treći razlog je smanjena kontraktilnost miokarda zbog infarkta, kardiomiopatije ili električnih poremećaja u srcu.

Zatajivanje desne strane srca može nastati zbog smanjene kontraktilnosti miokarda, povećanog otpora istjecanju krvi iz desne klijetke ili zbog volumne preopterećenosti desne klijetke. Zatajivanje desne strane srca uzrokovano plućnom hipertenzijom naziva se plućno srce (lat. *cor pulmonale*). U kliničkoj praksi najčešći uzrok zatajivanja desne klijetke je zatajenje lijeve.

Zatajivanje lijevog i desnog srca može biti akutno i kronično. Najčešći simptomi zatajenja lijevog srca su dispneja, umor, ortopneja, paroksizmalna noćna dispneja, hipoksijska encefalopatija i bendopneja, dok će se zatajenje lijevog srca prezentirati edemima donjih ekstremiteta, pogoršanjem bubrežne funkcije, proširenjem vratnih vena zbog povišenog venskog tlaka, hepatomegalijom, splenomegalijom i distenzijom abdomena. (2)

Klinički spektar HF je varijabilan i baziran je na specifičnom podliježećem patološkom stanju. Pacijenti s HF neko vrijeme mogu biti asimptomatični dok se ne izvrši funkcionalno remodeliranje srca. U suprotnom dolazi do ozljeda srca koje dovode do akutnog srčanog zatajivanja, kao što su koronarna ishemija, miokarditis ili akutna valvularna regurgitacija. Promjene u renin-angiotenzin-aldosteronskom sustavu, natriuretičkom peptidnom sustavu i simpatičkom tonusu rezultiraju oksidativnim stresom i, s vremenom, disfunkcijom srca. Hormonske i citokinske alteracije rezultiraju atrofijom i slabošću skeletne i respiratorne muskulature, što dodatno pridonosi pojavi simptoma HF. (4,5)

### **1.2.2. Ishemijska bolest srca**

Ishemijska bolest srca (IHD) obuhvaća bolesti koje nastaju zbog poremećaja ravnoteže između opskrbe krvlju i potrebe srca za oksigeniranom krv. IHD najčešća je bolest srca i vodeći uzrok smrti u većini razvijenih zemalja svijeta. Unatoč tome što se proteklih godina radi na strategijama optimiziranja prevencije i liječenja ishemijske srčane bolesti i unatoč tome što se broj smrtnih slučajeva od ove bolesti u razvijenim zemljama smanjuje, posljedice IHD-a i dalje predstavljaju velik teret za zdravstveni sustav i ljudsko zdravlje. (6) Faktori rizika za IHD uključuju dob, razinu kolesterola, krvni tlak i pušenje cigareta (Tablica 1) (7)

Tablica 1. Faktori rizika za razvoj ishemijske bolesti srca

Faktori na koje se može utjecati	Faktori na koje se vjerojatno može utjecati	Nepromjenjivi faktori
Kolesterol Povišen LDL-C Snižen HDL-C Trigliceridi Povišen krvni tlak Pušenje cigareta Dijabetes Pretilost Sjedilački način života Konzumacija alkohola	Lipoprotein a Intolerancija na glukozu Oksidirani lipidi Hematološka stanja Stres	Dob Spol Obiteljsko nasljeđivanje

Uzrok više od 95% svih slučajeva IHD-a jest ateroskleroza, dok se kao ostali uzroci spominju embolija, tromboza, spazam koronarne krvne žile, stenoza, ušća koronarnih arterija, arteritisi, anemije, trovanje ugljikovim monoksidom, tirotoksikoza i hipertrofija miokarda. Kliničke manifestacije IHD-a očituju se u obliku četiri sindroma: pektoralna angina, infarkt miokarda, kronična ishemijska bolest srca i nagla srčana smrt. (2)

### 1.2.3. Pektoralna angina

Pektoralna angina (AP) klinička je manifestacija relativne ishemije miokarda koja je kratkog trajanja i većinom prestaje smirivanjem pacijenta ili primjenom nitroglicerina. AP nastaje zbog neravnoteže u opskrbi miokarda s kisikom i njegovoj potrebi za kisikom, a gotovo svi pacijenti imaju koronarnu aterosklerozu. Klinički se očituje naglom pojavom prekordijalne boli koja se može širiti u lijevu ruku ili lijevu stranu vrata, uz popratni osjećaj neugode i pritiska u prsima. (2,8) Razlikujemo 3 skupine AP-a: stabilna, nestabilna i Prinzmetalova AP. Za stabilnu ili tipičnu AP karakteristično je da bol obično nastaje pri fizičkoj aktivnosti zbog

povećane potrebe miokarda za kisikom. Klinički se prezentira kao bol u prednjem lijevom dijelu prsnog koša ili nelagodnom u susjednim područjima. (9) Kod nestabilne AP bol nije inicirana naporom, često se pojačava i mnogo je jača nego u stabilnoj AP. Nestabilna AP često prethodi infarktu miokarda. Prinzmetalova AP nastaje pri mirovanju zbog spazma koronarnih krvnih žila.

#### **1.2.4. Infarkt miokarda**

Infarkt miokarda (MI) definiran je prisutnošću nekroze miokarda u kliničkim uvjetima akutne ishemije miokarda, što je potkrijepljeno anamnezom, fizikalnim pregledom, EKG nalazima i biokemijskim biljezima nekroze miokarda.

##### 1.2.4.1. Etiologija i epidemiologija

Infarkt miokarda bolest je starije dobi, s obzirom da je više od polovine pacijenata starije od 65 godina. U dobi do 60 godina pojavljuje se 4-5 puta češće u muškaraca, dok u uznapredovaloj dobi ta razlika postaje manje uočljiva. Infarkt miokarda češće se pojavljuje u osoba s hipertenzijom, dijabetesom, pretilošću, sjedilačkim načinom života, obiteljskom sklonosti srčanim bolestima i aterosklerozi ili osoba koje puše cigarete. U više od 95% pacijenata MI je uzrokovan aterosklerozom koronarnih arterija. U ostale uzroke IM-a spadaju arterijska hipertenzija, embolija koronarnih krvnih žila, spazam koronarnih krvnih žila, sistemni vaskulitis i neke druge rijetke bolesti. Svi ovi uzroci dovode do neadekvatne opskrbe tkiva kisikom i ishemijskog oštećenja srčanog tkiva. (2)

##### 1.2.4.2. Patogeneza

Patogenetski, MI možemo podijeliti na transmuralni i subendokardijalni infarkt.

Transmuradni infarkt ograničen je na anatomsko područje koje opskrbljuje jedna koronarna arterija, a lokalizacija infarkta ovisi o mjestu tromboze koronarne arterije. Najčešće su to lijeva prednja silazna arterija (prednja stijenka lijeve klijetke, prednji dio pregrade ventrikula i čitav opseg apeksa), desna koronarna arterija (stražnji dio stijenke lijeve klijetke, stražnji dio ventrikularne pregrade i desna klijetka) i lijeva cirkumfleksna arterija (lateralna stijenka lijeve klijetke i desna klijetka). Lokalizacija, veličina i morfologija MI-a ovise o lokalizaciji, težini i brzini nastanka okluzije koronarne žile, veličini područja koje žila opskrbljuje, potrebi zahvaćenog miokarda za kisikom i metaboličkim tvarima, izraženosti kolateralne cirkulacije, mjestu i težini spazma zahvaćene arterije te ostalim čimbenicima. Okluzivni trombi prekidaju dotok krvi te ukoliko on potraje 20-30 minuta, dolazi do nekroze miokarda.

Subendokardijalni MI nastaje tijekom hipotenzivnih stanja. Koronarne arterije nisu začepljene i često ne pokazuju aterosklerotična suženja. Ishemija obično zahvaća čitav opseg lijeve klijetke i ograničena je na subendokardijalni dio miokarda. (2)

#### 1.2.4.3. Patologija

Prve makroskopski vidljive promjene u miokardu nakon MI-a vide se tek nakon 24 sata od okluzivnog začepljenja koronarne arterije. Tijekom drugog dana infarktom zahvaćeno područje poprima blijedi izgled. Tri do pet dana nakon nastanka okluzije, područje infarkta djeluje žućkasto ili pjegasto. Krajem prvog tjedna infarkt je najčešće sivo-žućkast i mekši od okolnog miokarda. Tijekom drugog tjedna infarkt sadrži crvene zone povećane prokrvljenosti i sive fibrotične dijelove. Nakon trećeg tjedna postaje crvenkasto-siv i nalik je rani koja cijeli. Slijedom promjena, nakon šest tjedana to područje postaje sivo i nalik vezivnom ožiljku. (2)

U tijeku drugog dana MI-a, nekroza miocita i kapilara srca postaje mikroskopski vidljiva. Uz to je uočljiva infiltracija neutrofilnih leukocita. Od četvrtog do šestog dana neutrofili se

zamjenjuju makrofazima koji pridonose stvaranju granulacijskog tkiva i, u konačnici, vezivnog ožiljka. Pregled mikroskopskih promjena prikazan je u Tablici 2. (2)

Tablica 2. Slijed promjena u infarktu miokarda

VRIJEME	VRSTA PROMJENA	MIKROSKOPSKE PROMJENE
0-24 sata	ireverzibilno oštećenje miocita	Početni znakovi oštećenja miokarda, valovita vlakna, hiperkontrakcija
1-3 dana	nekroza + akutna upala	Očita nekroza miocita, brojni neutrofil
4-6 dana	akutna + kronična upala	piknotični neutrofil, makrofagi, ostatci nekrotičnih miocita
7-14 dana	kronična upala + granulacijsko tkivo	makrofagi, angioblasti, fibroblasti
2-5 tjedana	granulacijsko tkivo	angioblasti, fibroblasti, makrofagi, kolagen
6 tjedana	ožiljak	fibroblasti i obilan kolagen

#### 1.2.4.4. Patofiziologija ishemijskog oštećenja

Ishemija rezultira nizom biokemijskih i metaboličkih promjena u miokardu. Manjak kisika u miokardu zaustavlja proces oksidativne fosforilacije i tako uzrokuje depolarizaciju membrane mitohondrija, poremećenu sintezu ATP-a i izostanak kontraktilne funkcije kardiomiocita. Trošenje ATP-a dodatno pojačava i aktivnost mitohondrijske F-ATP-aze, enzima koji u normalnim uvjetima koristi gradijent vodikovih iona za sintezu ATP-a, ali ga u ovim uvjetima razgrađuje ATP da bi održao potencijal mitohondrijske membrane. Bez prisustva ATP-a i  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ , ATP-aza ne može vršiti svoju funkciju, što vodi do nakupljanja intracelularnog  $\text{Na}^+$ . Suprotno  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATP-azi, kojoj je funkcija poremećena tek pri vrlo niskoj koncentraciji



ATP-a,  $\text{Ca}^{2+}$  crpke koje se nalaze na sarkoplazmi i membrani sarkoplazmatske mrežice vrlo su osjetljive na sniženje koncentracije ATP-a. Stoga već blagi pad ATP-a usporava izbacivanje  $\text{Ca}^{2+}$  iz sarkoplazme. Tako se tijekom dijastole njegova koncentracija u sarkoplazmi povećava i negativno djeluje na relaksaciju miokarda. (10) U nedostatku kisika stanica kreće u anaerobnu glikolizu, koristeći glikogen za rezervu glukoze. To rezultira nakupljanjem laktata u stanici i sniženim staničnim pH-om. Anaerobna glikoliza također povećava osmolarnost unutarstanične tekućine, jer se jedna molekula glikogena, koja je osmotski gotovo neaktivna, sad pretvara u više osmotski aktivnih molekula laktata. Smanjeni rad osmotski aktivne  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATP-aze također pridonosi povećanju osmolarnosti. Niski pH različitim mehanizmima utječe na kontraktilnost miokarda. Povišenje koncentracije  $\text{H}^+$  iona ometa vezivanje  $\text{Ca}^{2+}$  za troponin C. Acidoza smanjuje aktivnost miozinske ATP-aze i usporava prijenos  $\text{Ca}^{2+}$  iz sarkoplazme u sarkoplazmatsku mrežicu. Tim mehanizmima acidoza smanjuje kontraktilnost miokarda. Povećani broj vodikovih iona aktivira i  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  izmjenjivač koji izbacuje višak  $\text{H}^+$  iona iz stanice i ubacuje  $\text{Na}^+$  ione, koji zatim aktiviraju  $2\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  izmjenjivač koji izbacuje  $\text{Na}^+$  iz stanice, a ubacuje  $\text{Ca}^{2+}$ . Nadalje,  $\text{H}^+$  ioni se kompetitivnim mehanizmima bore s  $\text{Ca}^{2+}$  ionima za vezivno mjesto na mitohondrijskoj permeabilizacijskoj pori (MPTP), čime sprječavaju njeno otvaranje. Konačni rezultat smanjenja vrijednosti pH u ishemiji je protektivan zbog smanjene kontraktilnosti kardiomiocita i smanjenja potrošnje ATP-a. Ipak, višak intracelularnog  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Na}^+$  nakupljenog zbog smanjenja pH može uzrokovati bubrenje stanice i naposljetku njenu smrt. (11)

#### 1.2.4.5. Klinička slika i komplikacije

Dijagnoza IM-a zasniva se na kliničkom pregledu, elektrokardiografskom (EKG) nalazu i laboratorijskim nalazima.

Tipični simptomi IM-a uključuju snažnu visceralnu bol u prekordiju, koja se može širiti u lijevu ruku i lijevu stranu vrata, ali za razliku od boli u AP-u, ne prolazi na nitroglicerina. Takva bol može biti praćena simptomima mučnine ili anksioznosti i povraćanjem. Krvni tlak je obično promijenjen, puls i disanje ubrzano, a na plućima se mogu čuti krepitacije. U oko 20% pacijenata IM se prezentira bez simptoma.

Promjene na EKG-u se najčešće pojavljuju tek nekoliko sati nakon početka srčanog napadaja. Može doći do podizanja ili spuštanja ST spojnice, obrnutih T valova i patoloških Q zubaca.

U prva dva sata nakon IM može doći do povišenja mioglobulina te do povišenja serumskih troponina nakon 6 sati. Iz oštećenih miocita olobađa se i enzim kreatin kinaza (CK), a posebno je koristan izoenzim CK-MB koji se u tijelu nalazi u kardiomiocitima.

Smrtni ishod se očekuje u oko 20% pacijenata koji imaju dijagnozu IM-a. Preživjeli pacijenti će u oko 80-90% slučajeva razviti komplikacije. Najčešće i najznačajnije komplikacije infarkta miokarda su aritmije, zatajivanje srca, proširenje infarkta, tromboza i tromboembolija, fibrinozni perikarditis, ruptura miokarda te ventrikularna aneurizma. (2)

## **2. Svrha rada**

Bolesti srčanog mišića, posebno ishemijska bolest srca, vodeći su uzrok smrtnosti u populaciji. Brojne ekperimentalne studije pokazale su bitnu ulogu kalpaina u ozljedi miokarda za vrijeme ishemije, reperfuzije i postishemijskog remodeliranja. Povišenje kalcija u citosolu i mitohondrijima za vrijeme ishemije i reperfuzije uzrokuje aktivaciju kalpaina. Nakon aktivacije oni mogu oštetiti kontraktilni aparat i smanjiti proizvodnju energije cijepanjem strukturnih i funkcionalnih proteina miocita i mitohondrija. Kalpaini su također uključeni u strukturno remodeliranje nakon infarkta miokarda otpuštanjem proapoptotičkih faktora iz mitohondrija. Inhibicija kalpaina može spriječiti ili umanjiti ozljedu miokarda za vrijeme ishemije, reperfuzije i infarkta miokarda.(12)

Svrha ovog rada je sakupiti dosadašnja saznanja o mehanizmima djelovanja kalpaina, potencijalnom kardioprotektivnom učinku inhibicije njegove aktivnosti i samim time potencijalnoj terapijskoj strategiji ovih bolesti.

### **3. Pregled literature na zadanu temu**

#### **3.1. Sustav kalpaina**

Kalpainski su skupina kalcij-ovisnih nelizosomskih cisteinskih proteaza koje su u svom inaktivnom obliku smještene u staničnom citosolu kompetitivno vezani za svoj unutarstanični inhibitor kalpastatin. Aktivacija kalpaina se događa u određenim uvjetima te se smatra ključnim mehanizmom u aktivaciji brojnih supstrata poput receptora faktora rasta, citoskeletnih proteina, mitohondija te proteina povezanih s mikrotubulima. Na taj način kalpainski imaju bitnu ulogu u staničnom ciklusu, apoptozi i diferencijaciji. (13)

Molekule kalpaina mogu se nalaziti u brojnim vrstama, od gljiva do ljudskog organizma. (14)

Genetičke alteracije u tkivno ovisnim kalpainima su odgovorni za razne bolesti, osiguravajući sigurne dokaze o važnosti ovih enzima. (15) Pokazalo se da prekomjerna aktivacija kalpaina potiče razvoj onih patoloških stanja koja su povezana s gubitkom kontrole kalcija. U takvim slučajevima, inhibicija aktivacije kalpaina predstavlja potencijalnu strategiju u liječenju.

##### **3.1.1. Nomenklatura**

Nazive  $\mu$ -kalpain i m-kalpain u literaturi prvi su koristili Cong i sur. 1989. Oni označuju mikromolarnu ( $\mu$ ), odnosno milimolarnu (m) koncentraciju  $\text{Ca}^{2+}$  koja je potrebna za njihovu aktivaciju. Tako je  $\mu$ -kalpain aktiviran pri koncentraciji  $\text{Ca}^{2+}$  od 3-50  $\mu\text{mol/L}$ , dok se m-kalpain aktivira pri koncentraciji od 400-800  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$ . (16,17)

Kalpainski sustav veoma je kompleksan i spominje se više od 25 kalpainskih i kalpainu sličnih molekula. (13) Geni povezani s 15 takvih proteina numerički su nazvani CAPN1 sve do CAPN15, dok su njihove kodirajuće molekule nazvane kalpain-1 do kalpain-15.

Kalpain-1 i kalpain-2 biološki su aktivne proteaze samo u obliku dimera s 30-kDa podjedinicom.

Kalpaini su podijeljeni u dvije glavne kategorije- tipični i atipični kalpaini. Tipični kalpaini imaju domenu IV nalik kalmodulinu na svom COOH kraju, dok atipični nemaju tu komponentu. U skupinu tipičnih kalpaina spadaju  $\mu$ -kalpain, m-kalpain, te kalpaini 5, 7, 10, 13 i 15. Nazivaju se još i ubikvitarnim kalpainima te se nalaze u gotovo svim stanicama. (18) Za razliku od ubikvitarnih kalpaina, tkivno specifični kalpaini prisutni su u određenim stanicama ili tkivima. Tako kalpain 3 nalazimo u skeletnim mišićima, kalpain 6 u placenti i embrionalnim mišićima, kalpaine 8 i 9 u gastrointestinalnom traktu, kalpain 11 u testisima te kalpain 12 u folikulima dlake. (12)

### **3.1.2. Struktura domena $\mu$ - i m- kalpaina**

Kalpaini  $\mu$ - i m- su dimeri koji se sastoje od dvije podjedinice: 80 kDa i 30 kDa (Slika 2).

Veća 80kDa katalitička podjedinica kodirana je različitim genima na kromosomima 11 i 1. (19) Sastoji se od 4 domene.

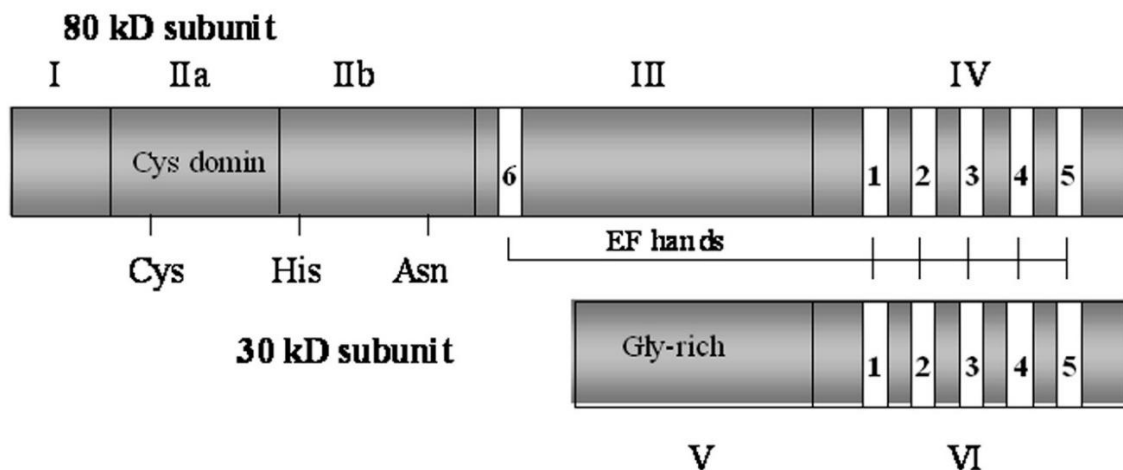
Prva domena  $\mu$ -kalpaina sadrži amfipatičku alfa zavojnicu na N-terminalnom kraju koja je bitna za označavanje i migriranje  $\mu$ -kalpaina u mitohondijski intramembranski prostor. Domena I m-kalpaina ne sadrži takvu komponentu.

Domena II predstavlja domenu katalitičke CysP proteaze. Sastoji se od dvije odvojene jezgrene domene proteaze- PC1 i PC2. Obje jezgrene domene imaju mjesta na koja se veže po jedna molekula  $\text{Ca}^{2+}$ . (12)

Domena III strukturno je slična C2 domenama i ima sposobnost kalcij-ovisnog vezivanja fosfolipida. Povezana je s dijelovima domene II koji vežu kalcij. Sudjeluje u regulaciji kalpainske aktivnosti putem elektrostatskih interakcija i prepoznavanju supstrata (12,14)

Domena IV sadrži penta-EF izdanak koji može vezati kalcij, kalpastatin ili malu podjedinicu (kalpain 4). Penta- EF strukture smatraju se među najvažnijim komponentama u aktivaciji kalpaina. (14) Razlikujemo pet EF struktura u velikoj katalitičkoj podjedinici. Penta EF struktura veže se za odgovarajuće sekvence na maloj podjedinici kalpaina (30 kDa) i tako sudjeluje u procesu dimerizacije velike i male podjedinice. (20,21)

Manja 30kDa podjedinica, odgovorna za stabilnost veće podjedinice, sastoji se od dvije domene. Jedina poznata funkcija V domene je vezivanje C-terminalnog kraja domene IV velike podjedinice. Domena VI identična je domeni IV i služi vezivanju  $Ca^{2+}$  i formiranju heterodimera. (12,14)

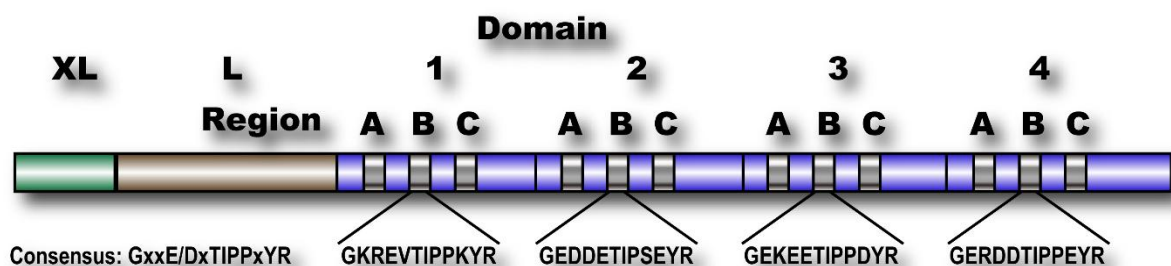


Slika 2. Shematski prikaz strukture kalpaina.

( preuzeto s: <https://celljournal.org/journal/article/fulltext/role-of-calpain-in-apoptosis>)

### 3.1.3. Regulacija kalpainske aktivnosti

Kalpastatin je jedini poznati specifični endogeni inhibitor i regulator  $\mu$ - i m- kalpaina. Humani kalpastatin je kodiran genom na kromosomu 5 i prezentira se u više izoformi. Sastoji se od četiri inhibitorne domene I, II, III i IV i jedne N-terminalne domene koja nema inhibitornih sposobnosti (Slika 3). Svaka inhibitorna podjedinica kompetitivno inhibira jednu molekulu kalpaina blokirajući supstratu pristup katalitičkom centru. (12) Kalpastatin inhibira isključivo molekule kalpaina, ne i ostale proteaze. (22) Proces vezivanja kalpastatina s kalpainom i njegove inhibicije ovisan je o kalciju. Koncentracija kalcija za ovaj proces je niža od one potrebne za pola maksimalne proteolitičke aktivnosti  $\mu$ - i m- kalpaina. (23)



Slika 3. Shematski prikaz strukture kalpastatina.

( preuzeto s: <http://calpain.org/overview.rb?cls=calpastatin> )

Kalpain i kalpastatin se unutar stanice nalaze veoma blizu jedan drugome. Stoga su potrebni mehanizmi koji će onemogućiti kalpainu da obavlja svoju biološku funkciju, s obzirom da se kalpastatin veže za njega pri porastu koncentracije kalcija. (12) Konformacijske promjene kalpainu omogućuju translokaciju u staničnu membranu, gdje fosfolipidi reduciraju prag

koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  potrebnog za kalpainsku aktivaciju ili zatvaraju kalcijске kanale, što dovodi do njegove aktivacije. Translokacija kalpaina u membranu kardiomiocita za vrijeme ishemije neovisna je o njegovoj aktivaciji, s obzirom na to da ishemijom izazvana intracelularna acidoza utječe inhibitorno na aktivaciju samog kalpaina. Normalizacijom intracelularnog pH dolazi do aktivacije kalpaina. Unatoč translokaciji, kalpain ostaje inaktivan i nakon 60 minuta trajanja ishemije i tek pri reperfuziji se aktivira. (24)

### **3.2. Fiziološke funkcije i patofiziološke implikacije kalpainskog sustava**

Smatra se da kalpaini nemaju ključnu ulogu u intracelularnoj digestiji proteina. Za razliku od lizosomalnih proteaza, kalpaini proteolitički cijepaju proteine na velike fragmente s potencijalnom regulatornom i signalnom funkcijom. (21) Mnoge studije, uključujući one na transgeničnim miševima, indiciraju da su kalpaini uključeni u embrionalni razvoj i straničnu funkciju, citoskeletne/ membranske dijelove i pokretljivost stanica, intracelularnu signalnu provodljivost, regulaciju ekspresije gena, apoptozu i dugoročno potenciranje sinaptičke transmisije.

Nedostatak sinteze kalpaina ili disregulacija njihove aktivnosti koja ometa proteolizu strukturnih ili regulatornih proteina javlja se u nizu bolesti poput mišićnih distrofija, dijabetesa melitusa (tip 2), karcinoma želuca, Alzheimerove bolesti, multiple skleroze i pojave katarakte. (12)

### **3.3. Uloga kalpaina u oštećenju kardiomiocita**

Mogućnost da kalpainski sustav može imati bitnu ulogu u oštećenju miokardijalnih stanica eksperimentalno je istražena u literaturi i nekoliko studija su se fokusirale na efekte kalpainskih inhibitora u oporavku disfunkcije kardiomiocita u različitim animalnim modelima.

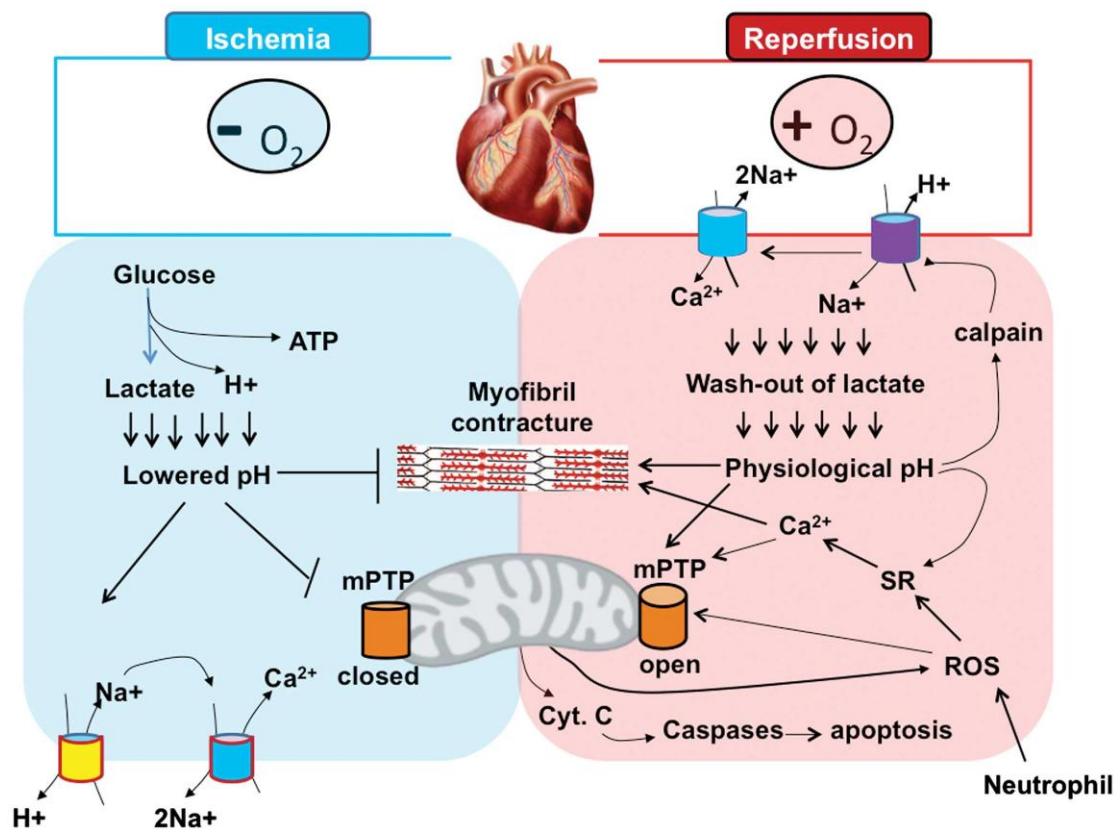


Kalpainski sudjeluju u procesu miogeneze, tako da je njihova povećana reaktivnost uključena u razvoju bolesti srca. U srčanom mišiću, kalcij je nužan za održavanje ravnoteže procesa ekscitacije i kontrakcije. Poremećena regulacija stanične homeostaze kalcija često rezultira preopterećenjem kalcijem, što dovodi do prejake kalpainske reakcije i rezultira oštećenjem kardiomiocita. Nekontrolirana aktivnost kalpaina povezana je s patogenezom reperfuzijske ozljede miokarda (IRI), hipertrofijom srca, zatajenjem srca i ishemijom srca. Inhibicija kalpaina pokazala se korisnom u usporavanju srčanog zatajenja i smanjenu veličine infarkta nakon ishemije/reperfuzije. (25)

Ishemijsko oštećenje tkiva zbog infarkta miokarda povećano je proteolitičkom aktivnošću endogenih enzima. Kalpainski se smatraju vjerojatnim kandidatima za to, s obzirom da su aktivirani putem kalcijevih iona kojima se koncentracija povećava u ishemičnim uvjetima. (26)

Kalpainski ostaju neaktivni prije reperfuzije zbog sniženog pH i povećane ionske snage u ishemičnom miokardu. (27) Proces nastanka ishemijsko-reperfuzijske ozljede kardiomiocita nije do kraja razjašnjen u svojim patofiziološkim mehanizmima. Postoji nekoliko teorija, uključujući preopterećenje mitohondija i citosola s  $Ca^{2+}$ , otpuštanje reaktivnih molekula kisika (ROS), akutni upalni odgovor i poremećaj metabolizma. Ovi procesi mogu djelovati zajednički te uzrokovati ireverzibilnu štetu na ishemičnim kardiomiocitima uslijed reperfuzije. (Slika 4)

U fiziološkim uvjetima kalpain se nalazi u inaktiviranom obliku u citosolu, vezan za svoj inhibitor kalpastatin. Povišenje razine kalcija uzrokovat će njegovu translokaciju i konačno aktivaciju.



Slika 4. Shematski prikaz događaja koji vode do ishemijsko-reperfuzijske ozljede u srcu.

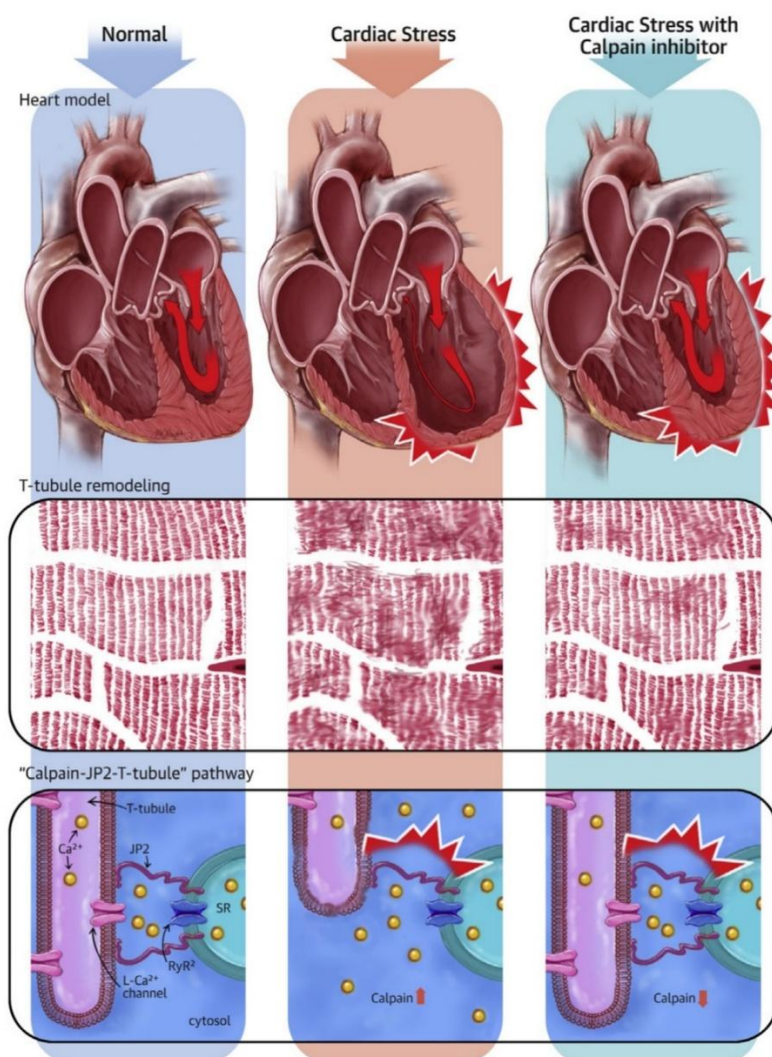
( preuzeto s: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2016.3877> )

Aktivirani kalpain ima brojne supstrate kao što su faktor rasta, citoskeletni proteini, proteini povezani s mikrotubulima te mitohondriji, što ima ključnu ulogu u procesima staničnog ciklusa, apoptoze i diferencijacije, negativno utječući na funkciju kardiomiocita.

Kalpainski sustav dio je integriranog proteolitičkog sustava koji je bitan za održavanje strukture i funkcije srčane sarkomere. Neravnoteža ovog sustava uzrokuje disfunkciju sarkomera. (13)

Proteoliza unutar srčane sarkomere regulirana je pretežno s tri sistema: ubikvitin proteasom sustav (UPS), autofagija/lizosomalna razgradnja i sustav kalpaina. Razgradnja miofibrilarnih proteina utječe na aktivaciju kalpaina. Proces razgradnje koji prati IRI uključuje strukturne ili regulatorne proteine kontraktilnog aparata. Studije *in vitro* pokazale su da su mnogi od tih proteina potencijalne mete aktiviranih kalpaina, što dovodi do razvoja postishemijske ozljede

miokarda. (28) Nekoliko eksperimentalnih studija pokazale su da gubitak ili neorganizacija T-tubula predstavlja ključan faktor u razvoju zatajenja srca. Poremećaj T-tubula posredovan kalpainom pokazao se kao bitan faktor u eksperimentalnom modelu zatajenja miokarda. (13) Inhibicija aktivnosti kalpaina štiti od disfunkcije srca očuvanjem ekspresije junktofilina-2 (JP2) i integriteta T-tubula u mišjem modelu zatajenja srca. (Slika 5)



Slika 5. Prikaz utjecaja inhibicije kalpaina na remodeliranje T-tubula.

( preuzeto s: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6115647/#abs0015title> )

Deregulacija kalpaina poznata je kao efektivan mehanizam indukcije apoptoze u srčanim sarkomerama preko različitih puteva, a apoptoza u kardiomiocitima smatra se bitnim mehanizmom za IRI. (13,14)

### **3.4. Uloga kalpaina u IRI-u miokarda**

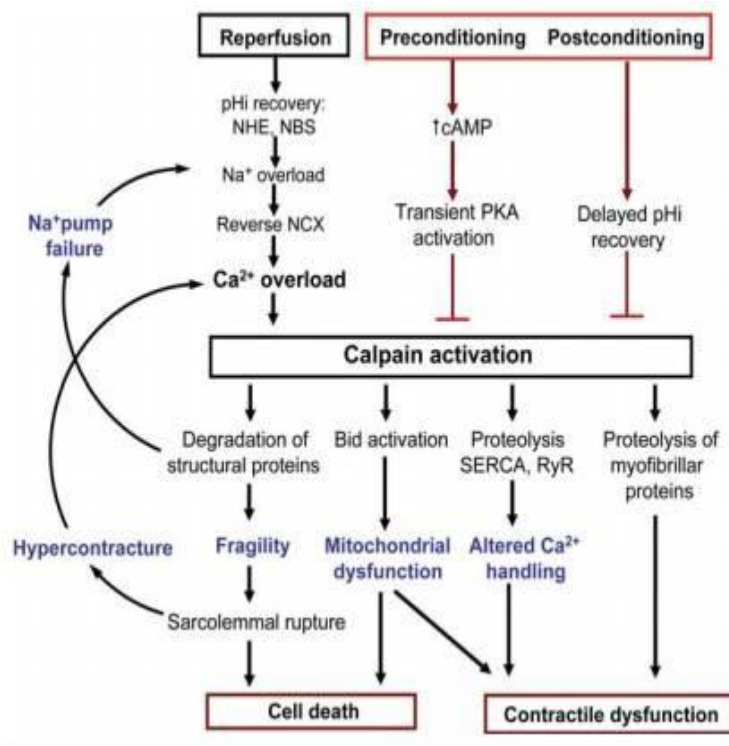
#### **3.4.1. Globalna ishemija**

Otkriveno je da globalna ishemija u izoliranom srcu štakora inducira vremenski ovisnu translokaciju m-kalpaina na membranu, što inicijalno nije povezano s aktivacijom kalpaina koja se javlja samo za vrijeme reperfuzije i normalizacije unutarstanične pH vrijednosti. (24) U sličnim uvjetima, gubitak miofibrilarnog dezmina,  $\alpha$ -aktinina i spektrina javlja se u srcu guinea svinje, što je reducirano kalpainskim inhibitorom I. (29) Imunohistokemijske studije otkrile su proteolizu kalspektrina i  $\alpha$ -fodrina na interkalarnim diskovima i sarkolemi nakon postishemijske reperfuzije u srcu štakora. Ti se procesi također mogu spriječiti inhibicijom kalpaina inhibitorom I.

Kontrakcija miokarda inicirana je s  $\text{Ca}^{2+}$  pomoću troponina/tropomiozina, koji su poznati kao supstrati kalpaina. Stoga bi oni trebali biti djelomično odgovorni za disfunkciju miokarda u IRI-u. Degradacija troponina T (TnT) uočena je za vrijeme ishemije/reperfuzije izoliranog srca štakora i reducirana je inhibicijom kalpaina s inhibitorima PD150606 i PD151746. (30) Isto tako, prekomjerna ekspresija kalpastatina prijenosom gena sprječava razgradnju troponina i poboljšava kontraktilnu funkciju u srcima štakora izloženima globalnoj ishemiji praćenoj reperfuzijom. (12)

### 3.4.2. Oštećenje funkcije mitohondrija

Oštećenje mitohondrija ima središnju ulogu u patofiziologiji reperfuzijske ozljede putem poremećenog oksidativnog metabolizma, praćenog poremećajima u stvaranju energije te akumulacije produkata toksičnih za miokard (Slika 6). Srčani mitohondriji nalaze se sarkolemalno ispod plazmatske membrane i interfibrilarno između miofibrila. (31-33) U animalnom i humanom srcu  $\mu$ -kalpain, m-kalpain i kalpain 10 prisutni su u citosolu i intermembranoznom prostoru mitohondrija. Jedna od najtežih posljedica oštećenja mitohondrija kalpainima je poremećaj u oksidativnoj fosforilaciji s gubitkom stvaranja ATP-a. Oštećenje mitohondrija može se dogoditi na bilo kojoj razini transportnog lanca elektrona (ETC). (12) Oštećenje mitohondrijske respiracije uočeno je u izoliranom prokrvljenom srcu zeca. Stadij 3 respiracije značajno se smanjio tijekom 45 minuta globalne ishemije i dodatno se smanjio tijekom 60 min reperfuzije. Ova reakcija mogla bi biti značajno umanjena dodatkom inhibitora kalpaina A-705239 u reperfuzijsku tekućinu. Smanjeni stadij 3 respiracije ukazuje na oštećenje ETC-a, ponajprije kompleksa 1, koji je rana meta ishemije miokarda. (34) Inhibitor kalpaina A-705239 dodan prije ishemije i reperfuzije također sprječava povećanje permeabilnosti unutarnje membrane mitohondrija. (35)

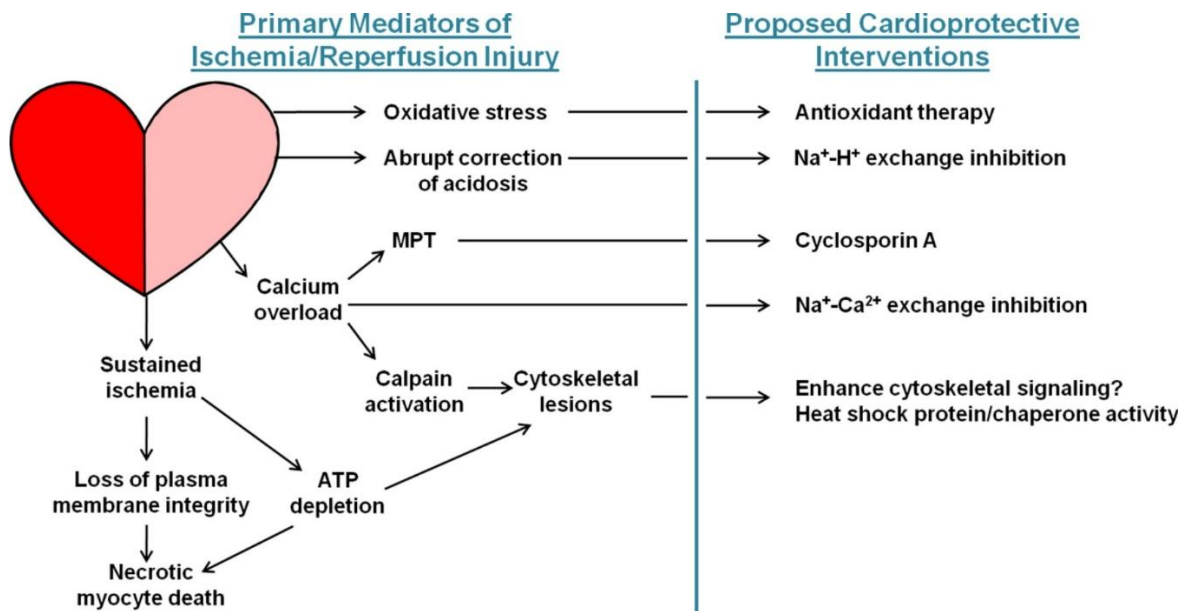


Slika 6. Shematski prikaz predloženih mehanizama kojima kalpain sudjeluje u IRI-u i kardioprotektivni učinci predkondicioniranja i postkondicioniranja.

( preuzeto s: <http://www.semanticscholar.org/paper/Contribution-of-calpains-to-myocardial-injury.-Inserte-Hernando/c81bd77cefd71a2504d1bcaf58be46d6f571934c/figure/3> )

Za vrijeme reperfuzije, mitohondriji stvaraju reaktivne vrste kisika koje vode do dodatnog oštećenja mitohondrija i miocita. (36,37) Ovisno o stupnju oksidativnog oštećenja, skupa s mitohondrijskim preopterećenjem kalcijem i aktivacijom kalpaina, propusnost mitohondrija može se promijeniti stvaranjem unutrašnjih membranskih pora. (38) Promjena permeabilnosti može rezultirati puknućem vanjske membrane mitohondrija i oslobađanjem citokroma c, što je bitan korak u induciranju apoptoze. Mitohondrijski kalpain igra bitnu ulogu u procesu programirane stanične smrti tako što generira ili oslobađa apoptotičke čimbenike u mitohondrijima za vrijeme ishemije i reperfuzije. Aktivacija mitohondrijskog  $\mu$ -kalpaina uzrokuje otpuštanje inducirajućeg faktora apoptoze (AIF) iz mitohondrija mišjeg srca. Uz to, aktivnost mitohondrijskog  $\mu$ -kalpaina u pufiriranim mišjim srcima za vrijeme ishemije praćena

je smanjenjem AIF-a u mitohondrijima. Inhibicija  $\mu$ -kalpaina koristeći inhibitor MDL-28170 očuvala je koncentraciju AIF-a u mitohondrijima i reducirala ozljedu srca (Slika 7). (12,39)



Slika 7. Grafički prikaz primarnih medijatora u IRI-u i predložene kardioprotektivne intervencije.

( preuzeto s: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661814001418> )

### 3.4.3. Djelomična ishemija i infarkt miokarda

Za razliku od globalne ishemije, u eksperimentalnim uvjetima djelomične ishemije privremenom okluzijom koronarnih arterija trajanje ishemije može se vremenski produžiti kako bi se omogućilo ireverzibilno oštećenje miokarda na ograničenom području infarkta bez rizika od ranog globalnog zatajenja srca s reperfuzijom. U izoliranom perfuziranom srcu štakora pokazala se translokacija kalpaina na staničnu membranu u prvih 30 minuta okluzije lijeve prednje silazne koronarne arterije, bez njegove inicijalne aktivacije. Aktivacija kalpaina započinje tek s početkom reperfuzije, što se vidi po hidrolizi  $\alpha$ -fodrina. Moguće ju je spriječiti inhibicijom kalpaina s MDL-28170 inhibitorom i tako bi veličina infarkta mogla biti reducirana za 32%. (24)

Inhibicija razgradnje  $\alpha$ -fodrina i poboljšanje funkcije lijevog ventrikula korištenjem inhibitora kalpaina SNJ-1945 30 minuta prije koronarne okluzije također je pokazana u blagoj ishemiji/reperfuziji u srcu štakora. (40) Protektivni učinci inhibicije kalpaina na ozljedu miokarda demonstrirani su i dodavanjem inhibitora prije i za vrijeme reperfuzije. Dva nova inhibitora (A-705239 i A-705253) proučavani su u izoliranim perfuziranim srcima zečeva izloženima 60-minutnoj okluziji interventrikularnog ramusa lijeve koronarne arterije, praćenoj reperfuzijom u trajanju 120 minuta. Inhibitori su dodavani u perfuzijsku tekućinu u različitim koncentracijama prije blokade koronarne arterije. Veličina infarkta značajno je smanjena u prisutstvu oba inhibitora. Najbolji efekt postignut je s  $10^{-8}$  mmol/L A-705253, čime se područje infarkta smanjilo za 61.8% (41)

### **3.5. Molekularne uloge kalpaina u patofiziologiji remodeliranja srčanog mišića**

Remodeliranje srca proces je zamjene i rekonstrukcije ireverzibilno oštećenog miokarda nakon ishemije. Proapoptotički faktori generiraju se i oslobađaju iz mitohondrija u miokardu već tijekom ishemije i reperfuzije, što se smatra vrlo bitnim u remodeliranju nakon MI-a. (12)

#### **3.5.1. Hipertrofija**

Remodeliranje srca karakterizirano je hipertrofijom. Ovaj proces definiran je povećanjem individualnih kardiomiocita, iniciranim mehanizmima osjetljivima na rastezanje i neurohumoralnim mehanizmima (otpuštanje kateholamina, endotelina-1, angiotenzina 2, citokina, kemokina i faktora rasta). Zajednički signalni putevi ovih mehanizama stvaraju neravnotežu između sinteze i razgradnje proteina te tako postaju meta kalpainske aktivnosti.



Faktor  $\kappa\text{B}$  nedavno se pokazao ključnim faktorom transkripcije u tom procesu. Kalpaini smanjuju učinak inhibitora  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ , što je nužan korak u translokaciji NF- $\kappa\text{B}$  i eksperimentom na miševima pokazalo se da su oni koji nemaju p50 podjedinicu na NF- $\kappa\text{B}$  ili imaju izražen super-represor NF- $\kappa\text{B}$  razvili ograničenu hipertrofiju srca kao odgovor na kronično otpuštanje angiotenzina 2. Uz to, pokazalo se da povećano otpuštanje angiotenzina 2 vodi do povećane ekspresije NF- $\kappa\text{B}$  p65 podjedinice u srcu divljeg miša i značajnog smanjenja utjecaja angiotenzina 2 kod miševa koji imaju značajniju ekspresiju kalpastatina. (42)

Signalne kaskade vezivanja angiotenzina 2 s receptorima angiotenzina 2 tipa 1 vezanima za G-protein mogu uključivati značajno povećavanje oslobađanja inozitola 1,4,5-trifosfata ( $\text{InsP}_3$ ) iz membrana kardiomiocita, vezivanje  $\text{InsP}_3$  s  $\text{InsP}_3$  receptorima na endoplazmatskom retikulumu i otpuštanje kalcija iz pohrane u citosol, što može dovesti do aktivacije kalpaina.

Dodatni signalni putevi uključeni u kalpainsku aktivnost mogu paradoksalno smanjiti hipertrofiju srca. Kalpainska aktivnost utječe na signalne efekte koji sudjeluju u remodeliranju srčanog mišića. Ravnoteža između ovih puteva koji djeluju u suprotnim smjerovima, može rezultirati hipertrofijom srca. (43)

### **3.5.2. Upalne/imunosne reakcije**

Kronični srčani stres dovodi do upalne i imunosne reakcije u srcu, neovisno o svom uzroku. (43) Otpuštaju se endogeni stresni proteini, tzv. alarmini, i predstavljaju ligande za *toll-like* receptore na površini upalnih/imunosnih stanica i srčanih stanica. Povezivanje ovih proteina s receptorima uzrokuje aktivaciju upalnih stanica. Upalne stanice otpuštaju citotoksičnu komponentu, pogoršavajući oštećenje na endotelnim stanicama i povećavajući ekspresiju alarmina. (44)

Da kalpaini igraju ključnu ulogu u mehanizmima ovih procesa pokazalo se u eksperimentalnim modelima kardiovaskularnog remodeliranja induciranog angiotenzinom 2. Miševi s jačom ekspresijom kalpastatina pokazali su neuparenu i odgođenu sposobnost regurgitacije upalnih stanica. To se može pripisati defektu u procesu kemotaksije ovisnom o NF- $\kappa$ B i/ili ograničenom cijepanju citoskeletnih vezivnih molekula kao što su talin i ezrin. Ove molekule odgovorne su za ekstravazaciju i migraciju leukocita. (42)

Uz to, adhezivnost endotela za cirkulirajuće leukocite kao odgovor na porast angiotenzina 2 ograničena je u miševa koji imaju manjak  $\mu$ -kalpaina ili preveliku ekspresiju kalpastatina. (43)

### **3.5.3. Fibroza**

Intersticijska fibroza sudjeluje u remodeliranju miokarda i pridonosi ukočenosti miokarda, što dovodi do promjena u sistoličkoj i dijastoličkoj funkciji, kao i povećanom riziku od aritmija. Ove promjene predstavljaju ili reparativni odgovor na ozljedu tkiva ili reaktivni odgovor na stimulaciju fibroblasta.(45) Za nastanak fibroze potrebna je pretvorba fibroblasta u aktivne miofibroblaste s ekspresijom  $\alpha$ - glatkomišićnog aktina. Takvi miofibroblasti migriraju i luče proinflamatorne citokine i kolagen. Akumulacija kolagena tipa I i III te drugih sastavnica ekstracelularnog matriksa (ECM) u intersticij i perivaskularno područje miokarda ovise o ravnoteži između odlaganja i razgradnje ECM proteina. Aktivnost kalpaina može utjecati na ovu ravnotežu. U eksperimentalnom modelu kardiovaskularnog remodeliranja posredovanog angiotenzinom 2, pokazalo se da povećana ekspresija kalpastatina ograničava fibrozu oko aorte i tkivnih arterija. što je dokazano mikroskopiranjem pod polariziranim svjetlom Sirius red bojanjem i imunohistokemijskom analizom kolagena tipa I. (42) Ova promjena praćena je paradoksalnim smanjenjem aktivnosti metaloproteinaza matriksa (MMP).

Antifibrotička aktivnost kalpaina radije se objašnjava smanjenjem odlaganja kolagena nego povećavanjem njegove razgradnje. Ova hipoteza temeljena je na opservaciji da glatkomišične stanice izdvojene iz miševa s jače izraženim djelovanjem kalpastatina stvaraju manje kolagena kao odgovor na angiotenzin 2. (43)

#### **3.5.4. Apoptoza/nekroza**

Kalpaini igraju važnu ulogu i u signaliziranju stanične smrti u srcu.(46) Za vrijeme reperfuzijske faze, koncentracija  $\text{Ca}^{2+}$  u srčanim sarkomerama raste kao posljedica reverzne aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  pumpe. Porast i oscilacije u koncentraciji  $\text{Ca}^{2+}$  u citosolu odgovorne su za reperfuzijsku nekrozu kardiomiocita inducirajući jaku kontraktilnu aktivaciju, enzimsku aktivaciju koja vodi do fragilnosti citoskeleta i sarkoleme te utječući na promjenu permeabilnosti mitohondrija. Jedna od glavnih odrednica preopterećenja kalcijem za vrijeme reperfuzije je dodatni ulaz kalcija kroz sarkolemalnu  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  pumpu (NCX) koja radi suprotni učinak i posljedično povećava koncentraciju  $\text{Na}^+$  u citosolu. (27)

Kalcijem aktivirani kalpaini hidroliziraju proteine u sarkolemi i citoskeletu, posljedično uzrokujući rupturu sarkoleme. Tako uzrokovana proteoliza  $\alpha$ -fodrina i ankirina, proteina koji tvore strukturni kompleks koji održava stabilnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ - ATPaze, rezultira gubitkom aktivnosti pumpe i posljedično ulaz  $\text{Ca}^{2+}$  kroz obrnutu NXC što dovodi do reperfuzijske ozljede. (27,43). Kalpainska aktivnost odgovorna je i za proteolizu troponina, utječući na miofibrilarnu razgradnju i gubitak strukture srčane sarkomere.

Na aktivnost kalpaina utječu dva mehanizma dizajnirana da spriječe smrt kardiomiocita za vrijeme reperfuzijske faze. Prvo, kratke ishemijske epizode u miokardu sprječavaju staničnu smrt kardiomiocita induciranu naknadnom prolongiranom ishemijom i reperfuzijom. Ovaj proces praćen je smanjenjem kalpainske aktivnosti zbog slabljenja signala kalcija i/ili zbog

fosforilacije kalpaina. Drugo, produžena acidoza u prvim minutama reperfuzije srca štiti kardiomiocite, djelomično zbog ograničavanja kalpainske aktivnosti. (43)

## 4. Rasprava

Bolesti srca vodeći su uzrok morbiditeta i mortaliteta. Reperfuzijske strategije trenutni su standard u liječenju ishemijske bolesti srca. Međutim, one mogu rezultirati s paradoksalnom disfunkcijom kardiomiocita, poznatom kao ishemijsko-reperfuzijska ozljeda (IRI). Poznate su različite forme IRI-a, od kojih su samo prve dvije reverzibilne: reperfuzijom inducirane aritmije, zatajivanje miokarda, mikrovaskularna opstrukcija i letalna reperfuzijska ozljeda miokarda. Točan mehanizam IRI-a nije u potpunosti poznat. Nema dvojbe da je rana farmakološka i mehanička reperfuzija jedini način da se spriječi progresija nekroze miokarda i smanji veličina infarkta. Međutim, proces ponovnog uspostavljanja krvnog optoka u ishemičnom miokardu može inducirati IRI, koji će paradoksalno reducirati povoljne efekte reperfuzije. Molekularne, stanične i tkivne prilagodbe kao što su stanična smrt, upala, neurohumoralna aktivacija i oksidativni stres smatraju se ključnim mehanizmima u IRI-u. Ipak, točni patofiziološki mehanizmi ostaju nedovoljno istraženi i veliki su izazov u kliničkoj praksi. (13) U posljednje vrijeme sve se više istražuje uloga kalpaina u brojnim bolestima, pa tako i u bolestima srca. Nekontrolirana aktivnost kalpaina povezana je s patofiziologijom nekoliko kardiovaskularnih bolesti, uključujući IRI.

Kalpaini su skupina kalcij-ovisnih nelizosomskih proteaza koje su prije reperfuzije inaktivne zbog acidoze i ionske snage u ishemičnom miokardu. Za vrijeme reperfuzije dokazana je aktivacija kalpaina i degradacija strukturnih proteina. (47) Aktivirani kalpain ima brojne supstrate koji sudjeluju u apoptozi, staničnom ciklusu i diferencijaciji, negativno utječući na kardiomiocitnu funkciju. (13) Pokazalo se da inhibicija kalpaina sprječava citoskeletno odvajanje  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  podjedinica  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-aze u reperfuziranom miokardu i usporava smanjenje aktivnosti  $\text{Na}^+$ -pumpe. (27)

Sustav kalpaina bitan je za održavanje funkcije i strukture srčane sarkomere. (13) Deregulacija kalpaina pokazala se efektivnim mehanizmom indukcije apoptoze u srčanim sarkomerama preko različitih puteva, a apoptoza kardiomiocita smatra se važnim mehanizmom u IRI-u. Degradacija miofibrilarnih proteina koji sudjeluju u procesu kontrakcije također se smatra efektom aktivacije kalpaina, kao i prekid integriteta T-tubula, što je bitan faktor u nastanku zatajenja miokarda. (13) Mnogo je literature koja istražuje povezanost kalpaina s procesom remodeliranja srca, uključujući ventrikularnu hipertrofiju, upalu i fibrozu te, u konačnici, stanjivanje stijenke ventrikula. Kontroliranje njegove aktivnosti moglo bi razviti nove terapijske pokušaje u liječenju zatajivanja srca. Strategije liječenja testirane na animalnim modelima uključuju smanjivanje njegove ekspresije te povećanu ekspresiju kalpastatina. Primjerice, kontinuirana perfuzija farmakološkog inhibitora kalpaina u inicijalnom periodu reperfuzije nakon ishemije miokarda pokazala se uspješnom u reduciranju veličine infarkta. (24) Isto tako, povećana ekspresija kalpastatina u modelu endotoksemije inhibira aktivaciju kalpaina i poboljšava funkciju miocita. (48) Uzevši u obzir sposobnost ekstracelularnog kalpaina da smanji oštećenje plazmatske membrane ozlijeđenog miotubula i da ubrza regeneraciju kapilarnog endotela, strategije potencijalno uključuju eksternalizaciju kalpaina. Molekularni mehanizmi uključeni u njegovu eksternalizaciju svakako moraju biti jasnije identificirani prije nego se ovaj terapijski pristup uzme u obzir. (43)

## 5. Zaključak

Sakupivši dosadašnja saznanja o ovoj temi, možemo zaključiti da disregulacija aktivnosti kalpaina igra bitnu ulogu u reperfuzijskoj staničnoj smrti, remodeliranju i zatajivanju srca, što implicira na činjenicu da bi inhibicija kalpaina mogla biti dobra terapijska strategija u IHD-u. Ipak, potreban je oprez u razmatranju neselektivne inhibicije kalpaina, jer bi to moglo promijeniti osnovne fiziološke funkcije, uključujući recikliranje proteina te tako imati štetan utjecaj. Nedavni napredak postignut u kristalnoj strukturi kalpaina trebao bi olakšati razvoj novih inhibitora kalpaina, specifičnijih za svaku izoformu. To će biti presudno za precizno razjašnjenje uloga svake izoforme i za dizajniranje strategija koje će se koristiti u liječenju kardiovaskularnih bolesti povezanih s ovim proteazama. (15)

Unatoč svim ovim saznanjima, točan mehanizam utjecaja kalpaina na bolesti miokarda i dalje ostaje nedovoljno istražen.

## 6. Sažetak

Bolesti miokarda, ponajprije ishemijska srčana bolest, veliki su javnozdravstveni problem u svijetu i vodeći uzrok smrti u većini razvijenih zemalja svijeta. U posljednjih 30-ak godina broj smrtnih slučajeva od IHD u tim zemljama se smanjio, ali u mnogim dijelovima svijeta taj broj i dalje raste (Rusija i neke istočnoeuropske zemlje). Mogućnost da sustav kalpaina igra ulogu u ovim bolestima eksperimentalno je istražena u literaturi i neke studije su se fokusirale na efekte inhibicije kalpaina u poboljšanju disfunkcije miokarda. Kalpaini su skupina nelizosomskih cisteinskih proteaza koji se aktiviraju u prisutnosti kalcija. Nekontrolirana aktivnost kalpaina povezana je s patogenezom reperfuzijske ozljede miokarda, hipertrofije miokarda, srčanog zastoja i ishemije miokarda. Inhibicija kalpaina može znatno usporiti proces zatajivanja srca i reducirati veličinu infarkta nakon ishemije-reperfuzije. Pretjerana aktivacija kalpaina igra ulogu u oštećenju mitohondrija i oksidativnoj fosforilaciji za vrijeme IRI. Stoga inhibicija kalpaina predstavlja potencijalnu terapijsku strategiju u liječenju bolesti miokarda.

Ključne riječi : kalpain, inhibicija kalpaina, bolesti miokarda

## 7. Summary

Miocardial diseases, primarily IHD, are a major public health problem worldwide and leading cause of death in the most developed countries. In the last thirty years the number of deaths from IHD has decreased, but in many parts of the world this number continues to grow (Russia and some Eastern European countries). The possibility that the calpain system could play a role in these diseases has been experimentally investigated in the literature and several studies have focused on the effects of calpain inhibitors in improving myocardial dysfunction. Calpains are



a group of non-lysosomal calcium-activated cysteine proteases. Uncontrolled activation of calpain has been found to be involved in the pathogenesis of IRI, cardiac hypertrophy, myocardial stunning and cardiac ischemia. Calpain inhibition significantly attenuate myocardial stunning and reduced infarct size after ischemia-reperfusion. Calpain inhibition therefore serves as a potential medical therapy for patients suffering of myocardial diseases.

Key words: calpain, calpain inhibition, myocardial diseases

## 8. Literatura

1. Luiz Carlos Janquera i Jose Carneiro. Osnove histologije. Prijevod 10. američkog izdanja. Školska knjiga, Zagreb, 2005: 206-226.
2. Ivan Damjanov, Stanko Jukić i Marin Nola. Patologija. 3. izdanje. Medicinska naklada, Zagreb, 2011: 329-351.
3. Tanai E, Frantz S. Pathophysiology of heart Failure. *Compr Physiol*. 2015 Dec 15;6(1):187-214.
4. Snipelisky D, Chaundhry SP, Steward GC. The Many Faces of Heart Failure. *Card Electrophysiol Clin*. 2019 Mar;11(1):11-20.
5. Mosterd A, Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart*. 2007 Sep;93(9):1137-46.
6. Severino P, D'Amato A, Pucci M, Infusino F, Adamo F, Birtolo LI, Netti L, Montefusco G, Chimenti C, Lavalle C, Maestrini V, Mancone M, Chilian WM, Fedele F. Ischemic Heart Disease Pathophysiology Paradigms Overview: From Plaque Activation to Microvascular Dysfunction. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 30;21(21):8118.
7. Wilson PW. Established risk factors and coronary artery disease: the Framingham Study. *Am J Hypertens*. 1994 Jul;7(7 Pt 2):7S-12S.
8. Kelemen MD. Angina pectoris: evaluation in the office. *Med Clin North Am*. 2006 May;90(3):391-416.
9. Liu Y, Meng HY, Khurwolah Mr, Liu JB, Tang H, Aa N, Yang ZJ. Acupuncture therapy for the treatment of stable angina pectoris: An updated meta-analysis of randomized controlled trials. *Complement Ther Clin Pract*. 2019 Feb;34:247-253.
10. Stjepan Gamulin, Matko Marušić, Zdenko Kovač i sur. Patofiziologija. 7. izdanje, knjiga prva. Medicinska naklada, Zagreb, 2011: 891-901.

11. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target, *J Clin Invest*. 2013;123(1):92-100.
12. Neuhof C, Neuhof H. Calpain system and its involvement in myocardial ischemia and reperfusion injury. *World J Cardiol*. 2014.Jul 26;6(7):638-52.
13. Neri M, Riezzo I, Pascale N, Pomara C, Turullazzi E. Ischemia/Reperfusion Injury following Acute Myocardial Infarction: A Critical Issue for Clinicians and Forensic Pathologists. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:7018393.
14. Smith MA, Schnellmann RG. Calpains, mitochondria, and apoptosis. *Cardiovasc Res*. 2012 Oct 1;96(1):32-7.
15. Insete J. Calpains in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*. 2012 Oct 1;96(1):9-10.
16. Cong J, Goll DE, Peterson AM, Kapprell HP. The role of autolysis in activity of the Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinases( $\mu$ -calpain and m-calpain). *J Biol Chem* 1989;264:10096-10103.
17. Suzuki K. Nomenclature of calcium dependent proteinase. *Biomed Biochim Acta* 1991; 50:484-484.
18. Suzuki K, Sorimachi H, Yoshizawa T, Kinbara K, Ishiura S. Calpain: novel family members, activation, and physiologic function. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995; 376:523-529.
19. Ohno S, Minoshima S, Kudoh J, Fukuyama R, Shimizu Y, Ohmi-Imajoh S, Shimizu N, Suzuki K. Four genes for the calpain family locate on four distinct human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 1990;53:225-229.
20. Croall DE, DeMartino GN. Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 1991;71:813-847.

21. Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J: The calpain system. *Physiol Rev* 2003; 83:731–801.
22. Crawford C. Protein and peptide inhibitors of calpain. In: *Intra-cellular Calcium-Dependent Proteolysis*. Boca Raton, FL: CRC 1990:75-89.
23. Otsuka Y, Goll DE. Purification of the Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinase inhibitor from bovine cardiac muscle and its interaction with the millimolar Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinase. *J Biol Chem* 1987; 262:5839-5851.
24. Hernando V, Insete J, Sartório CL, Parra VM, Poncelas-Nozal M, Garcia-Dorado D. Calpain translocation and activation as pharmacological targets during myocardial ischemia/reperfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2010; 385:1077-1082.
25. Potz BA, Sabe AA, Abid MR, Sellke FW. Calpains and Coronary Vascular Disease. *Circ J*. 2016;80(1):4-10.
26. Kunimatsu M, Tada T, Narita Y, Ozaki Y, Liu ZQ, Shearer TR, Sasaki M. Activation of calpain in myocardial infarction: an immunohistochemical study using a calpain antibody raised against active site histidine-containing peptide. *Cardiovasc Pathol*. 1999 Jan-Feb;8(1):7-15.
27. Insete J, Garcia-Dorado D, Hernando V, Soler-Soler J. Calpain-mediated impairment of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity during early reperfusion contributes to cell death after myocardial ischemia. *Circ Res*. 2005 Sep 2;97(5):465-73.
28. Barta J, Tóth A, Edes I et al. Calpain-I-sensitive myofibrillar proteins of the human myocardium. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2005.;278:1-8.
29. Matsumura Y, Seaki E, Inoue M, Hori M, Kamada T, Kusuoka H. Immunohomogeneous disappearance of myocardium of guinea pig. *Circ Res* 1996;79:447-454.

30. Zhang Z, Biesiadecki BJ, Jin JP. Selective deletion of the NH<sub>2</sub>-terminal variable region of cardiac troponin T in ischemia reperfusion by myofibril-associated mu-calpain cleavage. *Biochemistry* 2006; 45:11681-11694.
31. Lesnefsky EJ, Moghaddas S, Tandler B, Kerner J, Hoppel CL. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia- -reperfusion, aging, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 1065-1089.
32. Palmer JW, Tandler B, Hoppel CL. Biochemical differences between subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria from rat cardiac muscle: effects of procedural manipulations. *Arch Biochem Biophys* 1985; 236: 691-702.
33. Piper HM, Sezer O, Schleyer M, Schwartz P, Hütter JF, Spieckermann PG. Development of ischemia-induced damage in defined mitochondrial subpopulations. *J Mol Cell Cardiol* 1985; 17: 885-896.
34. Otani H, Tanaka H, Inoue T, Umemoto M, Omoto K, Tanaka K, Sato T, Osako T, Masuda A, Nonoyama A. In vitro study on contribution of oxidative metabolism of isolated rabbit heart mitochondria to myocardial reperfusion injury. *Circ Res* 1984; 55: 168-175.
35. Neuhof C, Götte O, Trumbeckaite S, Attenberger M, Kuzkaya N, Gellerich F, Möller A, Lubisch W, Speth M, Tillmanns H, Neuhof H. A novel water-soluble and cell-permeable calpain inhibitor protects myocardial and mitochondrial function in postischemic reperfusion. *Biol Chem* 2003; 384: 1597-1603.
36. Otani H, Tanaka H, Inoue T, Umemoto M, Omoto K, Tanaka K, Sato T, Osako T, Masuda A, Nonoyama A. In vitro study on contribution of oxidative metabolism of isolated rabbit heart mitochondria to myocardial reperfusion injury. *Circ Res* 1984; 55: 168-175.

37. Ambrosio G, Zweier JL, Duilio C, Kuppusamy P, Santoro G, Elia PP, Tritto I, Cirillo P, Condorelli M, Chiariello M. Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow. *J Biol Chem* 1993; 268: 18532-18541.
38. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999; 341 (Pt 2): 233-249.
39. Chen Q, Paillard M, Gomez L, Ross T, Hu Y, Xu A, Lesnefsky EJ. Activation of mitochondrial  $\mu$ -calpain increases AIF cleavage in cardiac mitochondria during ischemia-reperfusion. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;415:533-538.
40. Takeshita D, Tanaka M, Mitsuyama S, Yoshikawa Y, Zhang GX, Obata K, Ito H, Taniguchi S, Takaki M. A new calpain inhibitor protects left ventricular dysfunction induced by mild ischemia-reperfusion in in situ rat hearts. *J Physiol Sci* 2013; 63: 113-123.
41. Neuhof C, Fabiunke V, Deibele K, Speth M, Möller A, Lubisch W, Fritz H, Tillmanns H, Neuhof H. Reduction of myocardial infarction by calpain inhibitors A-705239 and A-705253 in isolated perfused rabbit hearts. *Biol Chem* 2004; 385: 1077-1082.
42. Letavernier E, Perez J, Bellocq A, Mesnard L, de Castro Keller A, Haymann JP et al. Targeting the calpain/calpastatin system as a new strategy to prevent cardiovascular remodeling in angiotensin II-induced hypertension. *Circ Res* 2008;102:720–728.
43. Letavernier E, Zafrani L, Perez J, Letavernier B, Haymann JP, Baud I. The role of calpains in myocardial remodelling and heart failure. *Cardiovascular Research* 2012;96(1):38-45.
44. Fildes JE, Shaw SM, Yonan N, Williams SG. The immune system and chronic heart failure: is the heart in control? *J Am Coll Cardiol* 2009;53:1013–1020.

45. Creemers EE, Pinto YM. Molecular mechanisms that control interstitial fibrosis in the pressure-overloaded heart. *Cardiovasc Res* 2011;89:265–272.
46. Louis XL, Thandapilly SJ, Kalt W, Vinqvist-Tymchuk M, Aloud BM, Raj P, et al. Blueberry polyphenols prevent cardiomyocyte death by preventing calpain activation and oxidative stress. *Food Funct* 2014;5:1785-1794.
47. Yoshida K. Myocardial ischemia-reperfusion injury and proteolysis of fodrin, ankyrin, and calpastatin. *Methods Mol Bio.* 2000;144:267-275.
48. Li X, Li Y, Shan L, Shen E, Chen R, Peng T. Over-expression of calpastatin inhibits calpain activation and attenuates myocardial dysfunction during endotoxaemia. *Cardiovasc Res* 2009;83:72–79.
49. Inserte J, Hernando V, Garcia-Dorado D. Contribution of calpains to myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovascular Research* 2012;1:23-31.

## **9. Životopis**

Vedrana Vidaić rođena je 3. travnja 1991. godine u Zadru. Obrazovanje započinje u Osnovnoj školi Smiljevac, nakon čega upisuje Gimnaziju Jurja Barakovića u Zadru, koju završava s odličnim uspjehom. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci upisuje 2009. godine, za vrijeme kojega radi brojne studentske poslove.