

<sup>1</sup> Institut "Vinča", Laboratorija za radiobiologiju i molekularnu genetiku, Univerzitet u Beogradu  
P/fax 522, 11001 Beograd, Srbija

<sup>2</sup> Odeljenje za endokrinologiju i dijabetes, KBC Zemun, Zemun

<sup>3</sup> Klinika za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, Institut za internu medicinu,  
Klinički centar Vojvodina, Novi Sad

<sup>4</sup> Odeljenje za kardiologiju, KBC Zemun, Zemun i Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd.

## ULOGA TROMBINA U PROLIFERACIJI GLATKIH MIŠIĆIH ĆELIJA KRVNIH SUDOVA (VSMC) I ATEROSKLEROZI

### THE ROLE OF THROMBIN IN THE PROLIFERATION OF VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS (VSMC) AND ATHEROSCLEROSIS

<sup>1</sup>Katarina Smiljanić, <sup>1</sup>Sonja Zafirović, <sup>1</sup>Milan Obradović, <sup>2</sup>Zoran Gluvić, <sup>3</sup>Edita Stokić,  
<sup>4</sup>Biljana Putniković i <sup>1</sup>Esma R. Isenović

**Sažetak:** Glatke mišićne ćelije krvnih sudova (VSMCs) su od vitalnog značaja, kako za strukturu tako i za funkcionisanje i dinamiku krvnih sudova. Proliferacija i abnormalna akumulacija VSMCs su među ključnim događajima u nastanku raznih vaskularnih oboljenja, uključujući aterosklerozu i hipertenziju. Kardiovaskularne bolesti su vodeći uzrok smrtnosti ljudske populacije u čijoj osnovi u najvećoj meri dominira ateroskleroza kao patološka komponenta. Ateroskleroza jedan je od glavnih uzroka infarkta miokarda, moždanog udara i perifernih vaskularnih bolesti, koji čine približno polovinu svih smrtnih slučajeva u razvijenim zemljama. Ona uključuje orkestrirane procese endotelijalne disfunkcije, inflamacije, proliferacije VSMCs i reorganizaciju ekstracelularnog matriksa. Dediferencijacija i proliferacija VSMCs predstavljaju ključne događaje u nastanku aterosklerotskih lezija, postangioplastične restenoze i odbacivanja kalema pri bajpasu krvnih sudova.

Trombin je moćni modulator mnogih procesa kao što su regulisanje tonusa i propustljivosti krvnog suda, migracije i proliferacije VSMCs, privlačenja monocita u aterosklerotske lezije i raznih proinflammatoryh markera, a sve ovo, takođe, doprinosi progresiji kardiovaskularnih oboljenja.

**Ključne reči:** Glatke mišićne ćelije krvnih sudova, ateroskleroza, proliferacija ćelija, endotelijalna disfunkcija, trombin

**Summary:** Vascular smooth muscle cells (VSMCs) are vital to the structure, functioning and dynamics of blood vessels. Proliferation and abnormal accumulation of VSMCs are among the key events in the development of various vascular diseases including atherosclerosis and hypertension. Cardiovascular diseases are the leading cause of mortality in human population which is based largely dominated by atherosclerosis as a pathological component. Atherosclerosis is a major cause of myocardial infarction, stroke and peripheral vascular disease, which constitute approximately half of all deaths in developed countries. It involves orchestrated processes of endothelial dysfunction, inflammation, proliferation of VSMCs and extracellular matrix reorganization. Dedifferentiation and proliferation of VSMCs is a key event in the development of atherosclerotic lesions, postangioplastic restenosis and rejection of the bypass graft vessels.

Thrombin is a potent modulator of many processes such as regulation of muscle tone and permeability of the blood vessel, migration and proliferation of VSMCs, attracting monocytes into atherosclerotic lesions and a variety of inflammatory markers, and all this also contributes to the progression of cardiovascular disease.

**Keywords:** Vascular smooth muscle cells, atherosclerosis, cell proliferation, endothelial dysfunction, thrombin

## I. Građa, uloga i osobine VSMCs u vaskulaturi

Glatko mišićno tkivo (*lat. "textus muscularis non-striatus"*) ulazi u sastav krvnih i limfnih sudova, organa sistema za varenje, dušnika, mokraćne bešike, materice, kože, unutrašnjih mišića oka itd. Ono je specijalizovano za slabe i spore kontrakcije, a inervisano je od strane autonomnog nervnog sistema.

Zidovi arterija i vena sadrže 3 različita sloja: unutrašnji sloj koji oblaže lumen krvnog suda (*lat. „tunica intima“*) sačinjen uglavnom od endotelijalnih ćelija, srednji sloj koji sadrži koncentrične slojeve glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova (VSMCs, *engl. Vascular Smooth Muscle Cells*) (*lat. "tunica media"*) i spoljašnji sloj (*lat. "tunica adventitia", "tunica externa"*), sačinjen pretežno od vezivnog tkiva koje u zavisnosti od veličine i vrste krvnog suda sadrži različit odnos i stepen elastičnih i kolagenih vlakana.

Srednji sloj, *tunica media*, sastoji se od koncentričnih naslaga VSMCs uronjenih u rastresito vezivno tkivo. Koncentrični slojevi VSMCs koji oblažu endotelijum, regulišu dijametar krvnog suda svojim kontrahovanjem i opuštanjem i time omogućavaju kontrolu krvnog pritiska. *Tunica media*, sa glatkim mišićnim vlaknima čini najdeblji sloj, kako u velikim elastičnim arterijama poput aorte, tako i u arterijama srednje veličine poznatim kao distributivne arterije.

VSMCs su vretenastog oblika i imaju jedno jedro postavljeno u središnjem delu sarkoplazme koje unekoliko prati oblik ćelije svojom spljoštenojolikom formom. Aktinski i miozinski filamenti drugačije su organizovani, tako da nema poprečne ispruganosti [1].

VSMCs i nakon diferenciranja i sazrevanja ostaju sintetski veoma aktivne. One proizvode prokolagenske i proelastinske molekule po čemu su slične fibroblastima, ali sintetišu i proteoglikanske komponente lamine [2]. I kao terminalno diferencirane (zrele), VSMCs zadržavaju sposobnost ponovnog ulaska u ćelijski ciklus i sledstvene deobe pod uticajem različitih faktora rasta. Jedan od najranijih markera VSMCs diferencijacije je nestin [3].

Aktivirana VSMC ima funkcionalne i morfološke osobine embrionalne VSMC, sposobne da se deli, migrira i sintetiše velike količine ekstracelularnog matriksa i faktora rasta [4]. Fenotipski prelaz VSMCs je reverzibilan i naziva se i fenotipskom

modulacijom. Fenotipskom modulacijom objašnjava se rasprostranjeno učešće VSMCs kako u normalnim, fiziološkim procesima tako i u patofiziološkim poremećajima poput ateroskleroze i hipertenzije.

## II. Ćelijski ciklus VSMCs, mehanizmi proliferacije i antiproliferativni terapijski pristupi

Migratorne i proliferativne aktivnosti VSMCs regulisane su pozitivnim promoterima rasta kao što su faktor rasta krvnih pločica (PDGF, *engl. Platelet-Derived Growth Factor*), endotelin-1 (ET-1, *engl. Endothelin-1*), trombin, faktor rasta fibroblasta (FGF, *engl. Fibroblast Growth Factors*), interleukin (IL, *engl. Interleukin*) -1, mehanički stres poput hipertenzije [5]. Njihovi nizvodni signalni putevi uključuju aktivaciju receptora spregnutog sa G proteinom (GPCR, *engl. G Protein Coupled Receptors*), povećanje intracelularnog kalcijuma ( $Ca^{2+}$ , *engl. Calcium*), aktivaciju protein kinaze C (PKC, *engl. Protein Kinase C*) i Src kinaza, transaktivaciju receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR, *engl. Epidermal Growth Factor Receptor*) preko GPCR, aktivaciju nizvodnih signalnih molekula i kaskada, mitogenom-aktivirane proteinske kinaze (MAPK, *engl. Mitogen-Activated Protein Kinases*), fosfatidilinozitol 3-kinaze (PI3K; *engl. Phosphatidylinositol 3-kinases*) i protein kinaze B (PKB; Akt; *engl. Protein Kinase B*) [6-8].

Na kraju signalne mreže ovih odgovora, mitogeni faktori rasta dele isti krajnji signalni put ćelijskog ciklusa. Faze ćelijskog ciklusa koordinisane su sa ciklin zavisnim kinazama (CDKs, *engl. Cyclin-Dependent Kinases*) koje formiraju holoenzime sa svojim regulatornim subjedinicama, ciklinima [9]. Aktivnosti ciklin-CDK kompleksa zavisi od fosforilacionog statusa CDKs i nivoa ekspresije ciklina. Na početku, povećana akumulacija ciklin D-CDK4 i ciklin E-CDK2 kompleksa u sadejstvu sa ćelijskim nuklearnim antigenom proliferacije (PCNA, *engl. Proliferating Cell Nuclear Antigen*), koordiniše DNK replikaciju regulisanjem prelaza između G1 i S faza [10]. Sledeći G2-M prelaz regulisan je sa ciklin A-CDK2 i ciklin B-CDK1 kompleksima.

Sintetički CDK inhibitori (CVT-313, flavopiridol), genska terapija sa antisens oligodeoksiribonukleotidima (ODN, *engl. oligodeoxyribonucleotides*) prema CDK/ciklinima i prekomerna

ekspresija proteina inhibitora CDK (CKI, *engl. cyclin-dependent kinase inhibitor protein*) smanjuju neointimalnu hiperplaziju u eksperimetalnim postavkama ateroskleroze i angioplastične restenoze [11].

Progresija VSMCs ćelijskog ciklusa regulisana je i specifičnim komponentama ekstracelularnog matriksa (ECM, *engl. extracellular matrix*) i integrinima [12]. Neointimalne VSMCs sintetišu nove ECM komponente i indukuju ekspresiju metaloproteinaza (MPs, *engl. metalloproteinase*) koje preoblikuju okružujući ECM. Očevidno da je ekspresija MPs indukovana unutar neointimalnih lezija [13-16].

### III. Ateroskleroza i druge kardiovaskularne bolesti u čijoj je osnovi prekomerna proliferacija VSMCs

Ateroskleroza je glavni uzrok infarkta miokarda, moždanog udara i perifernih vaskularnih bolesti koji čine približno polovinu svih smrtnih slučajeva u razvijenim zemljama [8]. Kompleksan proces ateroskleroze karakteriše formiranje neointimalnih lezija koje progresivno zagušuju (okludiraju) arterijski lumen [17, 18]. Neointimalno zadebljanje nastaje kao akumulacija ćelijskih elemenata i ekstraćelijskih supstanci u prostoru između *tunica intima* (endotelijskog sloja) i koncentričnih slojeva VSMCs u *tunica media*.

Studije sa hiperholesterolemičnim životinjama i na humanim aterosklerotskim arterijama identifikovale su 3 procesa koji vode formiranju aterosklerotskih lezija [19]: 1) proliferacija VSMCs, makrofaga i limfocita; 2) formiranje vezivnog tkivnog matriksa sastavljenog od elastičnih, kolagenih i proteoglikanskih vlakana i 3) akumulacija lipida, najviše slobodnog i esterifikovanog holesterola u okružujućem matriksu sa pridruženim ćelijama [8].

Najnoviji podaci studija na humanom materijalu, *in vitro* mehanističkih studija i *in vivo* korelacija, sugeriraju važnu ulogu VSMCs u inicijaciji ateroskleroze [7]. VSMCs su glavni proizvođači ekstracelularnog matriksa i u odgovoru na aterosklerske stimulse mogu modifikovati tip matriksnih proteina koje proizvode.

Kao i makrofazi, VSMCs eksprimiraju mnoge receptore za preuzimanje lipida i mogu formirati penaste ćelije, učestvujući u ranoj akumulaciji lipida u plaku. Kao i endotelijalne ćelije, VSMCs

eksprimiraju razne adhezione molekule kao što su vaskularni ćelijski adhezioni molekul (VCAM-1, *engl. Vascular Cell Adhesion Molecule type-1*) i unutarćelijski adhezioni molekul (ICAM-1, *engl. InterCellular Adhesion Molecule type-1*) i migriraju kroz zid krvnog suda. Preko istih molekula VSMCs mogu inhibirati apoptozu drugih ćelija, doprinoseći tako ranoj celularnosti lezije. I one, kao i druge ćelije proizvode citokine (PDGF, transformišući faktor rasta  $\beta$  (TGF $\beta$ , *engl. Transforming Growth Factor  $\beta$* ), interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ , *engl. Interferon  $\gamma$* ), i MCP-1 (*engl. Monocyte Chemotactic Protein-1*)), koji započinju i propagiraju zapaljenski odgovor na lipide.

VSMCs na povredu krvnog suda reaguju ekstenzivnom proliferacijom i migracijom u intimalni deo zida krvnog suda [20], te pored ključne uloge u aterogenezi i hipertenziju razumeju kao povredu krvnog suda, dugotrajnu i ponavljajuću. Primarna hipertenzija vodi hipertrofiji i/ili hiperplaziji VSMCs i sledstvenoj promeni strukture krvnog suda [21], kao što su Yamori i saradnici prvi demonstrirali da VSMCs izolovane iz spontano hipertenzivnih pacova brže rastu nego VSMCs iz Wistar-Kyoto vrste pacova [22].

### IV. Trombin u proliferaciji VSMCs i aterosklerozi

#### IV.1. Funkcije trombina u vaskulaturi

Zgrušavanje krvi je proces karakterisan sekvencijalnom aktivacijom serije serinskih proteinaza i kofaktora, koji kulminira stvaranjem trombina. Trombin je tripsinu slična serinska proteinaza, molekulske mase 36 kDa, koja pokreće mnoštvo enzimskih i ćelijskih reakcija uključujući pretvaranje fibrinogena u fibrin i sledstveno stvaranje fibrinskog čepa, aktivaciju kofaktora V i VIII, aktivaciju krvnih pločica, endotelijalnih ćelija, VSMCs i leukocita. Aktivnost trombina je strogo regulisana putem nekoliko endogenih inhibitorskih mehanizama, kao što su antitrombin-heparinski put i signalni put proteina C [23].

Prekursorski protein, protrombin (faktor koagulacije II), sintetiše se samo u jetri u inaktivnoj formi zimogena, sa prosečnim poluživotom od 72h u cirkulaciji. Signal za generisanje trombina se pokreće kada cirkulišući faktori koagulacije dođu u kontakt sa ekstravaskularnim tkivnim fakto-

rom (na primer u slučaju povrede i razaranja endotelijskog sloja krvnog suda). Aktivirani faktor Xa zajedno sa kofaktorom Va prevodi protrombin u svoju aktivnu formu, trombin [24, 25]. Pošto je tkivni faktor eksprimiran samo na površini ćelija koje u fiziološkim uslovima nisu u kontaktu sa krvlju (kao što su VSMCs), za trombin je pretpostavljeno da predstavlja vezu između povrede tkiva i zarašćivanja rana [26], odnosno da ima važnu ulogu u vaskularnom remodelovanju.

Uloga trombina u hemostazi je dvojaka i oprečna. S jedne strane pretvaranje fibrinogena u fibrin predstavlja prokoagulantnu radnju, a vezivanje za protein C i njegovu aktivaciju, antikoagulantnu radnju [27]. Slična situacija je i sa ulogom u vaskularnoj reaktivnosti gde na jednoj strani trombin pokazuje efekte vazodilatacije [28], a na drugoj vazokonstrikciju [29, 30].

Reakcije koje trombin potiče na ćelijskom nivou uključuje aktiviranje krvnih pločica i njihovu agregaciju, hemotaktički efekat na monocite [31], VSMC [32], endotelijalne ćelije [33], limfocite [34] i neutrofile [35]. Mitogeni efekat trombin iskazuje kod VSMC [36], fibroblasta [37, 38] i endotelijalnih ćelija [39]. U endotelijalnim ćelijama trombin stimuliše proizvodnju brojnih faktora: prostaciklina [40], faktora aktivacije krvnih pločica (PAF; *engl. Platelet-Activating Factor*) [41], endotelina [42], von Willebrandovog faktora [43], aktivatora plazminogena (PA, *engl. Plasminogen Activator*) [44] i njegovog inhibitora (PAI, *engl. PA Inhibitor*) [44]. Ovi raznoliki ćelijski odgovori pokrenuti trombinom doprinose patologiji ateroskleroze, tromboze i drugih vaskularnih oboljenja putem inflamatornih i proliferativnih procesa na mestu vaskularne povrede.

## IV.2. Struktura trombinskih receptora

Receptori aktivirani proteazama (PAR, *engl. Protease-Activated Receptors*) pripadaju familiji GPCR. Oni čine posebnu grupu unutar familije GPCR zbog načina aktivacije putem proteolitičkog cepanja umesto okupiranja receptora ligandom. Do danas je pronađeno i klonirano 4 člana ove grupe: PAR-1, PAR-2, PAR-3 i PAR-4. PAR-1, PAR-3 i PAR4 su trombinski receptori. Trombin prepoznaje aminoterminalni kraj trombina i seče ga, generišući novi amino terminalni kraj tzv. "tethered ligand". Drugi važni domeni su: aminoterminalni hirudinu-sličan domen, takođe

važan za vezivanje trombina (kod PAR-1 i PAR-3), karboksiterminalni kraj koji ima ulogu u usmeravanju isečenog receptora u lizozomsko odeljenje radi degradacije, što nije uobičajeni put recikliranja GPCR (plazma membrana). Treća intracelularna petlja doprinosi mehanizmu internalizacije [45].

### IV.2.1. Molekularni mehanizam aktivacije PAR-1 receptora i njegove signalizacije

Trombin cepa i aktivira PAR-1 sa visokom efikasnošću: već pri koncentraciji od 10 nM skoro svi ćelijski receptori na površini su aktivirani posle 1 minuta. Nakon vezivanja za 2 specifična mesta na aminoterminalnom kraju trombin podleže konformacionoj promeni i izlaže aktivno mesto sa katalitičkom trijadom (His-365, Asp-419 i Ser-527), odgovornom za sistem prenosa šarže [46][47], što dovodi do efikasnog i trenutnog protelitičkog cepanja.

Presecanje aminoterminalnog kraja PAR1 je ireverzibilno i stvara nov aminoterminalni kraj koji se intramolekulski vezuje za drugu ekstracelularnu petlju i otpočinje prenos signala [34].

Kod ćelija u mirovanju, PARs su povezani sa heterotrimernom  $G_q$  familijom G proteina, koja se sastoji od 3 različite subjedinice nazvane  $\alpha$ ,  $\beta$ , i  $\gamma$  ( $G\alpha\beta\gamma$ ). Kad trombin aktivira receptor, vezani guanozin difosfat (GDP, *engl. guanosine diphosphate*) se izmenjuje sa guanozine-5'-trifosfatom (GTP, *engl. guanosine-5'-triphosphate*) što rezultira u disocijaciji  $\beta\gamma$  subjedinica od  $\alpha$  subjedinice. Ovaj događaj započinje stvaranje širokog panela signalnih mehanizama uključujući inozitol-1,4,5-trifosfat (IP3, *engl. inozitol-1,4,5-triphosphate*) i diacilglicerol (DAG, *engl. diacylglycerol*), kao i oslobađanje intracelularnog  $Ca^{2+}$ . PAR1 aktivacija, takođe, vodi aktivaciji PKC, MAPK kinaza, receptora tirozin kinaza (RTK, *engl. receptor tyrosine kinases*) i Rho signalnom putu uključenom u promene strukture citoskeleta i ćelijskog oblika fosforilacijom preko lakog lanca miozina sa Rho-kinazom [48, 49]. Drugi signalni put uključuje  $G\alpha_i$  subjedinicu koja inhibira aktivaciju adenil ciklaze, sprečavajući pretvaranje adenozin trifosfata (ATP, *engl. Adenosine-5'-triphosphate*) u ciklični adenozin monofosfat (cAMP, *engl. Cyclic adenosine monophosphate*) [50].

### IV.3. Uloga trombina u aterosklerozi

Endotelijalna disfunkcija, koju karakteriše nesposobnost endotelijuma da reguliše svoje osnovne funkcije (tonus krvnog suda, hemostazu, ćelijsku adheziju, balans elektrolita), smatra se preduslovom za nastanak aterosklerotskog plaka, a trombin se smatra jednim od njenih ključnih okidača [26]. Istovremeni događaji, poput vazokonstrukcije preko sekrecije prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>, *engl. Prostaglandin H2*) i tromboksana A<sub>2</sub> [30], zatim smanjenje dostupnosti azot-monoksida (NO, *engl. Nitric oxide*) (kritično važan faktor za endotelijску relaksaciju i funkciju) usled smanjene aktivnosti *endotelijalne azot oksid sintaze* (eNOS, *engl. endothelial Nitric Oxide Synthase*) [51], smanjene sinteze eNOS u endotelijalnim ćelijama [52] i povećanje aktivnosti arginaze [53, 54], samo su neki od mnogih efekata kojim se objašnjava ključna uloga trombina u endotelijalnoj disfunkciji. Tokom ateroskleroze nivo trombina izrazito je povećan [55].

Nakon ovih događaja, posledično se pod uticajem trombina povećava proizvodnja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS, *engl. Reactive Oxygen Species*) u zidu krvnog suda [56, 57] što olakšava lipidnu peroksidaciju i inicijaciju apoptotskih procesa. Trombin indukuje proizvodnju pro-inflamatornih medijatora, uzrokujući promene u transkripciji gena za IL-1 $\beta$ , IL-6 [58] i faktor nekroze tumora  $\alpha$  (TNF $\alpha$ , *engl. Tumor Necrosis Factor-Alpha*) i MCP-1 u VSMCs [59], dok u endotelijumu povećava ekspresiju IL-6 [60], IL-8 [61], MCP-1, VCAM-1 i ICAM-1, itd., što olakšava regrutovanje cirkulišućih monocita i T limfocita u zidove arterija [57] i doprinosi stvaranju ranih plakova. IL-8 je kandidat za biomarker predviđanja subkliničke ateroskleroze na osnovu podataka iz multipnih kliničkih studija [62]. Većina ovih aktivnosti trombina posredovana je preko PARs [63].

Takođe, trombin posreduje u adheziji leukocita, njihovom kotrljanju (*engl. «rolling of leukocytes»*) i migraciji u aktivirani endotelijum [26]. U ovom procesu transmigracije leukocita, trombin utiče na povećanje oslobađanja Ca<sup>2+</sup> iz intracelularnih skladišta [64], što pomaže ligaciji ICAM-1 [65], a sve ovo dalje vodi raskidanju inter-endotelijalnih veza [66, 67].

Kod monocita i makrofaga u aterosklerozi, trombin vodi povećanju ekspresije IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF $\alpha$

i MCP-1, doduše pri višim koncentracijama nego kod VSMCs [59]. PARs su eksprimirani u humanim dendritskim ćelijama, monocitima i makrofazima [68].

Neoangiogeneza je usko povezana sa progresijom plaka. Hemoragija unutar plaka smatra se kritičnim faktorom destabilizacije i vezana je predominantno za neovaskularizaciju *tunica intima* i *media* od strane nezrelih i «curećih» kapilara [69]. Za trombin je pokazano da izaziva neoangiogenezu *in vitro* i *in vivo* [70].

U odmakloj, naprednoj aterosklerotskoj leziji najznačajnija je njegova aktivacija krvnih pločica, koja vodi daljoj inflamatornoj kaskadi i proizvodnji raznih aktivatora i faktora rasta od strane krvnih pločica. Npr., aktivirani trombociti stimulišu nuklearni faktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B, *engl. nuclear factor  $\kappa$ B*) signalni put u VSMCs, koji indukuje ekspresiju metaloproteinaza matriksa (MMPs, *engl. Matrix MetalloProteinases*), citokina i faktora rasta [71], kao i MCP-1 [72] što rezultuje u snažnoj proliferaciji i migraciji VSMCs u aterosklerotsku leziju [73]. Svi ovi procesi doprinose progresiji plaka, potom njegovoj destabilizaciji i rupturi [74]. *In vivo* nalazi govore u prilog tome [75, 76].

### IV.4. Uloga trombina u proliferaciji VSMCs

Trombin je uključen u abnormalnu proliferaciju VSMCs povezanu sa aterosklerozom i hipertenzijom [77-79]. Osim posrednih načina doprinosa fenotipskoj modulaciji, migraciji i proliferaciji VSMCs, putem interakcije trombina i drugih ćelija (npr. trombinom aktivirani trombociti luče PDGF koji je snažan mitogen VSMCs [80]), trombin i direktno utiče na proliferaciju i migraciju VSMCs [36, 79, 81].

Za VSMCs se zna da eksprimiraju PAR-1, PAR-2 i PAR-4, od kojih su trombinski PAR-1 i PAR-4. Dominantni receptor preko koga trombin ostvaruje svoju mitogenu ulogu u VSMCs je PAR-1 [82]. Pozitivna regulacija ovih receptora u VSMCs *in vivo* je demonstrirana nakon oslobađanja TGF $\beta$ <sub>1</sub>, PDGF i serotoninina iz krvnih pločica [83] i veoma je važna za dalje direktne efekte trombina [26].

Vezivanje trombina za svoj receptor vodi stimulaciji fosfolipaze C, što rezultuje u povećanju intracelularnog nivoa Ca<sup>2+</sup> i aktivaciji PKC [6]. Mnoge studije su pokazale kao neophodan signalni korak, transaktivaciju EGFR od strane

PAR-1 aktiviranog trombinom u proliferaciji VSMCs *in vitro* [32, 84, 85].

Takođe, brojni su izveštaji o učešću MAPK kaskade u proliferaciji pod delovanjem trombina i to ekstracelularnim signalom regulisane kinaze 1 i 2 (ERK1/2, *engl. extracellular-signal-regulated kinases 1 and 2*) i p38 kinaze, kao i PI3K/Akt kaskade [82, 86, 87]. Većina ovih izveštaja ukazuje o neophodnosti EGFR transaktivacije kako bi MAPK kinaze i PI3K bile aktivirane [82, 88]. Nedavna studija pokazala je sem ERK1/2 kinaze i uključenost PI3K/Akt kaskade u sprovođenju mitogenog signala od aktiviranog PAR-1 i transaktiviranog EGFR, kao i ulogu NF- $\kappa$ B i aktivirajućeg proteina (AP-1 *engl. Activating Protein type-1*) u ekspresiji EGFR u VSMCs ćelijama pacova [82]. Maruyama i saradnici su prvi pokazali da je proliferacija VSMCs u kulturi izazvana trombinom, regulisana sa NF- $\kappa$ B [89].

U signalnoj mreži proliferacije VSMCs pod delovanjem trombina, važno mesto ima i PKC $\delta$  za koju su Hsieh i saradnici pokazali da učestvuje kao uzvodni signal EGFR transaktivacije [82].

U VSMCs pacova i PC3 (*engl. prostate cancer cell line*) ćelijama kancera prostate *in vitro* pokazano je da trombin posreduje u ćelijskoj proliferaciji, transaktivacijom EGFR preko MP koja ce-

pa membranski prekursor heparin vezujućeg EGF sličnog faktora rasta (HB-EGF, *engl. Heparin-binding EGF-like growth factor*), (pro-HB-EGF) i oslobođeni HB-EGF se vezuje i aktivira EGFR [6, 78, 85, 90]. Ovaj mehanizam je, takođe, demonstriran kod VSMCs pacova i babuna i neophodan je za migraciju VSMCs izazvanu trombinom [32]

### V. Zaključak

Uprkos ohrabrujućim rezultatima, značajni naponi u osnovnim istraživanjima su još uvek preko potrebni, kako bi se identifikovali dodatni ciljni geni i strategije za tretman kardiovaskularnih bolesti. Dalja istraživanja usmerena na razumevanje molekularnih mehanizama efekata trombina na proliferacije VSMCs u patofiziološkim stanjima svakako bi doprinela objašnjenju uloge ovih ćelija u patologiji nastanka kardiovaskularnih oboljenja uključujući i aterosklerozu.

### VI. Zahvalnica

Izrada ovog rada finansirana je sredstvima sa projekata br. 173033 (E.R.I.) od strane Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije.

## REFERENCE

1. Guyton, A. and Hall, J.E. *Medicinska fiziologija*. Vol. IX,; Savremena administracija, Beograd, 1999
2. Šerban, N.M., *Pokretne i nepokretne ćelije*, Savremena Administracija, Beograd, 1995
3. Huang, Y.L., et al., Thrombin induces nestin expression via the transactivation of EGFR signalings in rat vascular smooth muscle cells. *Cell Signal*, 2009. 21(6): p. 954-68.
4. Walsh, K., H.R. Periman, and R.C. Smith, *Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation and Cell Cycle*. 1999.
5. Dzau, V.J., R.C. Braun-Dullaeus, and D.G. Sedding, *Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies*. *Nat Med*, 2002. 8(11): p. 1249-56.
6. Bobe, R., et al., Evidence for ERK1/2 activation by thrombin that is independent of EGFR transactivation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. 285(2): p. H745-54.
7. Doran, A.C., N. Meller, and C.A. McNamara, Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. 28(5): p. 812-9.
8. Rivard, A. and V. Andres, *Vascular smooth muscle cell proliferation in the pathogenesis of atherosclerotic cardiovascular diseases*. *Histol Histopathol*, 2000. 15(2): p. 557-71.
9. Koepf, D.M., J.W. Harper, and S.J. Elledge, How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell*, 1999. 97(4): p. 431-4.
10. Sherr, C.J., *Mammalian G1 cyclins and cell cycle progression*. *Proc Assoc Am Physicians*, 1995. 107(2): p. 181-6.
11. Andres, V. and C. Castro, *Antiproliferative strategies for the treatment of vascular proliferative disease*. *Curr Vasc Pharmacol*, 2003. 1(1): p. 85-98.
12. Assoian, R.K. and M.A. Schwartz, *Coordinate signaling by integrins and receptor tyrosine kinases in the regulation of G1 phase cell-cycle progression*. *Curr Opin Genet Dev*, 2001. 11(1): p. 48-53.
13. Bendeck, M.P., et al., *Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat*. *Circ Res*, 1994. 75(3): p. 539-45.
14. Galis, Z.S., et al., *Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques*. *J Clin Invest*, 1994. 94(6): p. 2493-503.
15. Zempo, N., et al., *Matrix metalloproteinases of vascular wall cells are increased in balloon-injured rat carotid artery*. *J Vasc Surg*, 1994. 20(2): p. 209-17.
16. Southgate, K.M., et al., *Upregulation of basement membrane-degrading metalloproteinase secretion after balloon injury of pig carotid arteries*. *Circ Res*, 1996. 79(6): p. 1177-87.
17. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. *N Engl J Med*, 1999. 340(2): p. 115-26.
18. Libby, P., P.M. Ridker, and A. Maseri, *Inflammation and atherosclerosis*. *Circulation*, 2002. 105(9): p. 1135-43.
19. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. *Nature*, 1993. 362(6423): p. 801-9.
20. Mnjoyan, Z.H., et al., *The critical role of the intrinsic VSMC proliferation and death programs in injury-induced neointimal hyperplasia*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. 294(5): p. H2276-84.
21. Marche, P., T. Herembert, and D.L. Zhu, *Molecular mechanisms of vascular hypertrophy in the spontaneously hypertensive rat*. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl*, 1995. 22(1): p. S114-6.
22. Yamori, Y., et al., *Mechanisms of structural vascular changes in genetic hypertension: analyses on cultured vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats*. *Clin Sci (Lond)*, 1981. 61 Suppl 7: p. 121s-123s.
23. Mann, K.G., S. Butenas, and K. Brummel, *The dynamics of thrombin formation*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. 23(1): p. 17-25.
24. Esmon, C.T., et al., *Inflammation, sepsis, and coagulation*. *Haematologica*, 1999. 84(3): p. 254-9.
25. Brass, L.F. and M. Molino, *Protease-activated G protein-coupled receptors on human platelets and endothelial cells*. *Thromb Haemost*, 1997. 78(1): p. 234-41.
26. Borissoff, J.I., et al., *Is thrombin a key player in the 'coagulation-atherogenesis' maze?* *Cardiovasc Res*, 2009. 82(3): p. 392-403.

27. Lane, D.A., H. Philippou, and J.A. Huntington, Directing thrombin. *Blood*, 2005. 106(8): p. 2605-12.
28. Hamilton, J.R. and T.M. Cocks, Heterogeneous mechanisms of endothelium-dependent relaxation for thrombin and peptide activators of protease-activated receptor-1 in porcine isolated coronary artery. *Br J Pharmacol*, 2000. 130(1): p. 181-8.
29. Maki, J., et al., Involvement of reactive oxygen species in thrombin-induced pulmonary vasoconstriction. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010. 182(11): p. 1435-44.
30. Hirano, K., The roles of proteinase-activated receptors in the vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. 27(1): p. 27-36.
31. Bar-Shavit, R., et al., Chemotactic response of monocytes to thrombin. *J Cell Biol*, 1983. 96(1): p. 282-5.
32. Kalmes, A., et al., Heparin blockade of thrombin-induced smooth muscle cell migration involves inhibition of epidermal growth factor (EGF) receptor transactivation by heparin-binding EGF-like growth factor. *Circ Res*, 2000. 87(2): p. 92-8.
33. Moy, A.B., et al., Histamine and thrombin modulate endothelial focal adhesion through centripetal and centrifugal forces. *J Clin Invest*, 1996. 97(4): p. 1020-7.
34. Coughlin, S.R., Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*, 2000. 407(6801): p. 258-64.
35. Bizios, R., et al., Thrombin-induced chemotaxis and aggregation of neutrophils. *J Cell Physiol*, 1986. 128(3): p. 485-90.
36. McNamara, C.A., et al., Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor. *J Clin Invest*, 1993. 91(1): p. 94-8.
37. Carney, D.H., W. Redin, and L. McCroskey, Role of high-affinity thrombin receptors in postclotting cellular effects of thrombin. *Semin Thromb Hemost*, 1992. 18(1): p. 91-103.
38. Giacco, F., et al., Thrombin-activated platelets induce proliferation of human skin fibroblasts by stimulating autocrine production of insulin-like growth factor-1. *FASEB J*, 2006. 20(13): p. 2402-4.
39. Zania, P., et al., Thrombin mediates mitogenesis and survival of human endothelial cells through distinct mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008. 294(5): p. C1215-26.
40. Hallam, T.J., J.D. Pearson, and L.A. Needham, Thrombin-stimulated elevation of human endothelial-cell cytoplasmic free calcium concentration causes prostacyclin production. *Biochem J*, 1988. 251(1): p. 243-9.
41. Prescott, S.M., G.A. Zimmerman, and T.M. McIntyre, Human endothelial cells in culture produce platelet-activating factor (1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) when stimulated with thrombin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984. 81(11): p. 3534-8.
42. Schini, V.B., et al., Thrombin enhances the release of endothelin from cultured porcine aortic endothelial cells. *Eur J Pharmacol*, 1989. 165(2-3): p. 333-4.
43. Sporn, L.A., V.J. Marder, and D.D. Wagner, Differing polarity of the constitutive and regulated secretory pathways for von Willebrand factor in endothelial cells. *J Cell Biol*, 1989. 108(4): p. 1283-9.
44. Levin, E.G., et al., Thrombin stimulates tissue plasminogen activator release from cultured human endothelial cells. *J Clin Invest*, 1984. 74(6): p. 1988-95.
45. Vu, T.K., et al., Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, 1991. 64(6): p. 1057-68.
46. Coughlin SR, Thrombin signaling and protease-activated receptors. *Nature*, 2000. 407: p. 258-264.
47. Bahou WF, Proteinase-activated receptors. *Current Topics in Developmental Biology*, 2003. 54: p. 343-369.
48. Kahn, M.L., et al., A dual thrombin receptor system for platelet49. van Nieuw Amerongen, G.P., et al., Activation of RhoA by thrombin in endothelial hyperpermeability: role of Rho kinase and protein tyrosine kinases. *Circ Res*, 2000. 87(4): p. 335-40.
50. Zhang, W. and R.W. Colman, Thrombin regulates intracellular cyclic AMP concentration in human platelets through phosphorylation/activation of phosphodiesterase 3A. *Blood*, 2007. 110(5): p. 1475-82.
51. Watts, V.L. and E.D. Motley, Role of protease-activated receptor-1 in endothelial nitric oxide synthase-Thr495 phosphorylation. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2009. 234(2): p. 132-9.



52. Ming, X.F., et al., Rho GTPase/Rho kinase negatively regulates endothelial nitric oxide synthase phosphorylation through the inhibition of protein kinase B/Akt in human endothelial cells. *Mol Cell Biol*, 2002. 22(24): p. 8467-77.
53. Yang, L., et al., Arginase activity is increased by thrombin: a mechanism for endothelial dysfunction in arterial thrombosis. *J Am Coll Surg*, 2006. 203(6): p. 817-26.
54. Lewis, C., et al., Arginase blockade lessens endothelial dysfunction after thrombosis. *J Vasc Surg*, 2008. 48(2): p. 441-6.
55. Husmann, M. and M. Barton, Therapeutical potential of direct thrombin inhibitors for atherosclerotic vascular disease. *Expert Opin Investig Drugs*, 2007. 16(5): p. 563-7.
56. Brandes, R.P., et al., Thrombin-induced MCP-1 expression involves activation of the p22phox-containing NADPH oxidase in human vascular smooth muscle cells. *Thromb Haemost*, 2001. 85(6): p. 1104-10.
57. Colotta, F., et al., Expression of monocyte chemotactic protein-1 by monocytes and endothelial cells exposed to thrombin. *Am J Pathol*, 1994. 144(5): p. 975-85.
58. Tokunou, T., et al., Thrombin induces interleukin-6 expression through the cAMP response element in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. 21(11): p. 1759-63.
59. Kranzhofer, R., et al., Thrombin potently stimulates cytokine production in human vascular smooth muscle cells but not in mononuclear phagocytes. *Circ Res*, 1996. 79(2): p. 286-94.
60. Marin, V., et al., The IL-6-soluble IL-6R $\alpha$  autocrine loop of endothelial activation as an intermediate between acute and chronic inflammation: an experimental model involving thrombin. *J Immunol*, 2001. 167(6): p. 3435-42.
61. Marin, V., et al., The p38 mitogen-activated protein kinase pathway plays a critical role in thrombin-induced endothelial chemokine production and leukocyte recruitment. *Blood*, 2001. 98(3): p. 667-73.
62. Aukrust, P., et al., Chemokines and cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. 28(11): p. 1909-19.
63. Martorell, L., et al., Thrombin and protease-activated receptors (PARs) in atherothrombosis. *Thromb Haemost*, 2008. 99(2): p. 305-15.
64. Sandoval, R., et al., Requirement for Ca<sup>2+</sup> signaling in the mechanism of thrombin-induced increase in endothelial permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001. 280(2): p. L239-47.
65. van Nieuw Amerongen, G.P., et al., Involvement of Rho kinase in endothelial barrier maintenance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. 27(11): p. 2332-9.
66. van Nieuw Amerongen, G.P., et al., Thrombin-induced endothelial barrier disruption in intact microvessels: role of RhoA/Rho kinase-myosin phosphatase axis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008. 294(5): p. C1234-41.
67. Delekta, P.C., et al., Thrombin-dependent NF- $\kappa$ B activation and monocyte/endothelial adhesion are mediated by the CARMA3. Bcl10.MALT1 signalosome. *J Biol Chem*, 2010. 285(53): p. 41432-42.
68. Colognato, R., et al., Differential expression and regulation of protease-activated receptors in human peripheral monocytes and monocyte-derived antigen-presenting cells. *Blood*, 2003. 102(7): p. 2645-52.
69. Virmani, R., et al., Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. 25(10): p. 2054-61.
70. Haralabopoulos, G.C., et al., Thrombin promotes endothelial cell alignment in Matrigel in vitro and angiogenesis in vivo. *Am J Physiol*, 1997. 273(1 Pt 1): p. C239-45.
71. Henn, V., et al., CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*, 1998. 391(6667): p. 591-4.
72. Gawaz, M., et al., Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation*, 1998. 98(12): p. 1164-71.
73. Lutgens, E., et al., CD40 and its ligand in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*, 2007. 17(4): p. 118-23.
74. Yu, G., et al., Endothelial expression of E-selectin is induced by the platelet-specific chemokine platelet factor 4 through LRP in an NF- $\kappa$ B-dependent manner. *Blood*, 2005. 105(9): p. 3545-51.

75. Westrick, R.J., et al., Deficiency of tissue factor pathway inhibitor promotes atherosclerosis and thrombosis in mice. *Circulation*, 2001. 103(25): p. 3044-6.
76. Bea, F., et al., Melagatran reduces advanced atherosclerotic lesion size and may promote plaque stability in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. 26(12): p. 2787-92.
77. Isenovic, E.R., et al., Insulin, Thrombin, ERK1/2 Kinase And Vascular Smooth Muscle Cells Proliferation. *Curr Pharm Des*, 2010. 16(35): p. 3895-902.
78. Isenovic, E.R., et al., Involvement of ERK1/2 kinase in insulin-and thrombin-stimulated vascular smooth muscle cell proliferation. *Angiology*, 2010. 61(4): p. 357-64.
79. McNamara, C.A., et al., Thrombin and vascular smooth muscle cell proliferation: implications for atherosclerosis and restenosis. *Semin Thromb Hemost*, 1996. 22(2): p. 139-44.
80. Shankar, R., et al., Thrombin receptor-activating peptides differentially stimulate platelet-derived growth factor production, monocytic cell adhesion, and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem*, 1994. 269(19): p. 13936-41.
81. Fager, G., Thrombin and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 1995. 77(4): p. 645-50.
82. Hsieh, H.L., et al., Thrombin induces EGF receptor expression and cell proliferation via a PKC(delta)/c-Src-dependent pathway in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. 29(10): p. 1594-601.
83. Schini-Kerth, V.B., et al., Aggregating human platelets stimulate the expression of thrombin receptors in cultured vascular smooth muscle cells via the release of transforming growth factor-beta1 and platelet-derived growth factor-AB. *Circulation*, 1997. 96(11): p. 3888-96.
84. Daub, H., et al., Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature*, 1996. 379(6565): p. 557-60.
85. Prenzel, N., et al., EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature*, 1999. 402(6764): p. 884-8.
86. Isenovic, E.R., et al., Role of ERK1/2 Activation In Thrombin-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Hypertrophy. *Current Hypertension Reviews*, 2008. 4: p. 190-196.
87. Kanda, Y., et al., Thrombin-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation is mediated by epidermal growth factor receptor transactivation pathway. *Br J Pharmacol*, 2001. 132(8): p. 1657-64.
88. Yin, X., et al., Role of L-type calcium channel blocking in epidermal growth factor receptor-independent activation of extracellular signal regulated kinase 1/2. *J Hypertens*, 2005. 23(2): p. 337-50.
89. Maruyama, I., et al., Thrombin activates NF-kappa B through thrombin receptor and results in proliferation of vascular smooth muscle cells: role of thrombin in atherosclerosis and restenosis. *Ann N Y Acad Sci*, 1997. 811: p. 429-36.
90. Smiljanic, K., et al., Involvement of the ADAM 12 in thrombin-induced rat's VSMCs proliferation. *Curr Med Chem*, 2011. 18(22): p. 3382-6.