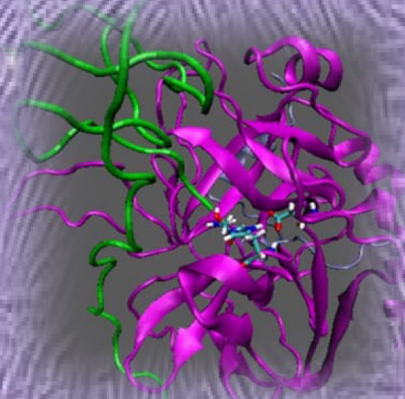


UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Uticaj trombina na regulaciju proliferacije glatkih mišićnih ćelija aorte pacova

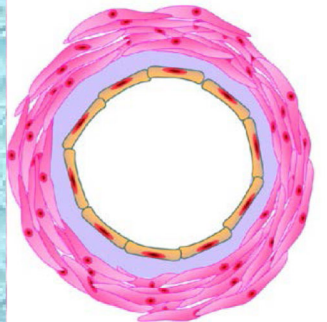


Katarina smiljanić

Katarina Smiljanić

„Uticaj trombina na regulaciju proliferacije
glatkih mišićnih ćelija aorte pacova”

doktorska disertacija



Beograd 2012.

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Katarina Smiljanić

**„Uticaj trombina na regulaciju proliferacije
glatkih mišićnih ćelija aorte pacova”**

doktorska disertacija

Beograd, 2012.

UNIVERSITY IN BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Katarina Smiljanić

**“Effects of thrombin in the regulation of
rat’s aortic smooth muscle cells
proliferation”**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2012.

Komisija za pregled, ocenu i odbranu doktorske disertacije kandidata Katarine T. Smiljanić, izabrana je u sastavu:

dr Esma Isenović, naučni savetnik, Institut za nuklearne nauke "Vinča", Beograd (mentor);

dr Jelena Đorđević, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet (mentor)

i

dr Biljana Putniković, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet (član)

na VII redovnoj sednici Nastavno-naučnog veća Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, održanoj 11.05.2012. godine. Svojom odlukom broj _____ od _____ 2012., Oblasno Veće Prirodnih Nauka Univerziteta u Beogradu je potvrdilo da kandidat Katarina Smiljanić može da pristupi javnoj odbrani svoje doktorske disertacije pod naslovom: „Uticaj trombina na regulaciju proliferacije glatkih mišićnih ćelija aorte pacova.“

Datum i mesto javne odbrane: _____

Doktorska disertacija „Uticaj trombina na regulaciju proliferacije glatkih mišićnih ćelija aorte pacova” je urađena u Laboratoriji za Radiobiologiju i Molekularnu Genetiku Instituta za nuklearne nauke „Vinča”, pod rukovodstvom dr Esme R. Isenović, NSV u saradnji sa prof dr Pijerom Maršeom (fr. Pierre Marche) sa Univerziteta P & L M Curie, Medicinskog fakulteta u Parizu.

Ovom prilikom želim da se zahvalim prof dr Pijeru Maršeu na širokogrudnoj saradnji i nesebičnoj stručnoj pomoći i podršci kakva se retko sreće. Takođe sam mu zahvalna i što je izdvojio vreme da učestvuje u oceni i odbrani ove doktorske disertacije i time podigne i značajno doprinese kvalitetu iste.

Prof dr Jelena Đorđević, mentor sa fakulteta Biologije Univerziteta u Beogradu mi je pružila izuzetnu stručnu pomoć tokom pisanja i recenzije disertacije, svojim prefinjenim stilom pisanog izražavanja. Toplo joj se zahvaljujem na velikom trudu pri pregledu i oceni ovog rada.

Dr. Biljani Putniković, vanrednom profesoru Medicinskog fakulteta u Beogradu u Beogradu zahvaljujem na stručnoj podršci, predusretljivosti i trudu pri oceni i pregledu doktorske disertacije.

Koristim priliku da se još jednom najtoplije zahvalim mojoj neposrednoj mentorici, dr Esmi Isenović, na svesrdnoj podršci, motivaciji i pomoći od samog početka izrade teze. Bez njene dobre energije ne bi bilo ovakvog naučnog rada i mog profesionalno-akademskog napredovanja.

Božijoj deci, Zahariju, Anastasiji i Iliji, se posebno zahvaljujem na strpljivom nadanju i veri da im ovaj proces pisanja teze neće oduzeti mamu već će je malo „poboljšati”. U tome, i u životu pomogla nam je i pomaže, draga sestra Vesna Kostić. Od srca joj hvala.

Svima koji su uz mene bili i pomogli, još jednom, najtoplije se zahvaljujem.

U Beogradu, 21. juna 2012.

Katarina Smiljanić

SAŽETAK

Naslov doktorske disertacije: „Uticaj trombina na regulaciju proliferacije glatkih mišićnih ćelija aorte pacova”

Kardiovaskularne bolesti predstavljaju najveći uzrok smrtnosti ljudske populacije, a njihova glavna i osnovna patološka komponenta je ateroskleroza. Proliferacija ili deoba glatkih mišićnih ćelija krvnog suda (VSMC) ključni je događaj u nastanku raznih vaskularnih oboljenja, uključujući ateroskleroza i hipertenziju. U procesu diferencijacije i abnormalne deobe VSMC povezanih sa hipertenzijom i aterosklerozom uključen je i trombin.

Stimulisanje VSMC trombinom dovodi do aktivacije ekstracelularnim signalima regulisanih kinaza 1 i 2 (ERK1/2), preko transaktivacije receptora za epidermalni faktor rasta (EGFR). U ranijim studijama Isenović i saradnici potvrdili su na osnovu inhibicije ERK1/2 od strane PD9805 inhibitora, učešće ERK1/2 u regulaciji proliferacije VSMC izazvanoj trombinom. U nastavku, faktor rasta sličan epidermalnom faktoru rasta koji vezuje heparin (HB-EGF), protein kinaza C delta (PKC δ) i matriksne metaloproteinaze (MMP), nađene su u VSMC i pokazano je da je i njihova aktivnost regulisana trombinom. ADAM (engl. “A Disintegrin And Metalloproteinase”) transmembranske su metaloproteinaze koje pripadaju adamalizinjskoj grupi i razlikuju se od matriksnih metaloproteinaza po tome što imaju vanćelijski dizintegrinski i citoplazmatski domen. C terminalni domen može da stupa u interakciju sa unutarćelijskim proteinima. Uvidom u literaturu, do sada ne postoji istraživanje koje ukazuje na prisustvo ADAM metaloproteinazne aktivnosti vezane za proliferaciju VSMC stimulisane trombinom.

Predmet ove doktorske teze jeste proučavanje uloge EGFR, ERK1/2, HB-EGF, PKC δ , ukupnih metaloproteinaza, kao i specifičnih MMP-2 i ADAM 12, u posredovanju proliferativnog efekta trombina na VSMC pacova. Inkubacija VSMC pacova sa trombinom (1 U/ml) u periodu od 5 minuta rezultirala je u značajnom povećanju: fosforilacije ERK1/2 od 8.7 ± 0.9 puta ($p < 0.001$), fosforilacije EGFR od 8.5 ± 1.3 puta ($p < 0.001$) i sinteze DNK od 3.6 ± 0.4 puta ($p < 0.001$). Prethodni pojedinačni tretmani ovih ćelija u trajanju od 30 minuta sa 10 μ M PD169540 (PD), ireverzibilnim inhibitorom EGFR, i 20 μ M antitelom protiv HB-EGF značajno su smanjili trombinom stimulisanu fosforilaciju EGFR za 81 % i 72 % i ERK1/2 za

48 % i 61 %, respektivno. Istim ovakvim pretretmanima sa PD i HB-EGF antitelom smanjena je značajno proliferacija VSMC stimulisana trombinom za 44 % i 45%. Takođe, polučasovni pretretmani VSMC u toku 30 minuta sa 10 μ M KB-R7785 (KB), specifičnim ADAM 12 inhibitorom i 10 μ M specifičnim MMP-2 inhibitorom značajno su smanjili fosforilacije izazvane trombinom: EGFR za 47 % i 78 % i ERK1/2 za 25 % i 25 %, respektivno. U nastavku, istim ovim pretretmanima sa KB ili MMP2 inhibitorom, smanjena je trombinom stimulisana proliferacija za 27 % i 45 %. Prethodni polučasovni tretman VSMC sa 5 μ M rotlerinom, specifičnim inhibitorom za PKC delta, značajno je smanjio fosforilaciju EGFR i ERK1/2 i proliferaciju VSMC stimulisanu trombinom za 58 %, 55% i 32%, respektivno.

Dobijeni rezultati pokazuju da je proliferacija VSMC pod delovanjem trombina pretežno zavisna od nivoa aktivacije ERK1/2 kinaze nego od nivoa aktivacije EGFR. Takođe, ovi rezultati ukazuju da trombin deluje preko EGFR i ERK1/2 signalnih puteva koji uključuju PKC δ , MMP-2 i ADAM 12, stimulišući proliferativni proces VSMC pacova. U zaključku, saznanje o učešću ADAM 12 molekula u proliferaciji VSMC pod delovanjem trombina je od izuzetne važnosti za bolje razumevanje uloge trombina u kardiovaskularnoj biologiji i medicini. Pošto su MMP-2 i ADAM 12 potvrđeni kao medijatori migracije i hipertrofije VSMC, oni predstavljaju potencijalne ključne „mete” u novim terapijskim intervencijama kojima bi se smanjilo ireverzibilno oštećenje tkiva povezano sa aterosklerozom i hipertenzijom. Zasiurno bi jedna od poželjnih opcija, kao *in vivo* regulisane sinteze MMP-2 i ADAM 12, doprinela redukciji patološke proliferacije VSMC.

KLJUČNE REČI: **trombin, VSMC, proliferacija, ADAM 12, MMP-2, PKC δ , ERK1/2, HB-EGF, ateroskleroza.**

NAUČNA OBLAST: **Biologija**

UŽA naučna oblast: **Molekularna endokrinologija**

UDK broj:

Dizajn korica: **Katarina Smiljanić**

Slika na prednjoj strani korica u srednjem delu desno od naslova: poprečni presek arterijskog krvnog suda (preuzeto i modifikovano sa sajta: <http://www.reproduction-online.org/content>)

Slika na zadnjoj strani u sredini preuzeta je i modifikovana sa sajta: <http://chemistry.cua.edu/faculty/kovach.cfm>.

ABSTRACT

Title of doctoral dissertation: “Effects of thrombin in the regulation of rat’s aortic smooth muscle cells proliferation”

Cardiovascular disease is the largest single cause of mortality and its major underlying pathology is atherosclerosis. The proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) is a key event in the pathogenesis of various vascular diseases, including atherosclerosis and hypertension. Thrombin is involved in the differentiation and abnormal proliferation of VSMC associated with atherosclerosis and hypertension.

Thrombin stimulation results in extracellular signal-regulated kinase (ERK 1/2) activation through transactivation of the epidermal growth factor receptor (EGFR). Based on the studies in which PD98059 used to inhibit ERK1/2, we have shown previously that ERK1/2 was involved in the regulation by thrombin of VSMC’s proliferation. In addition, heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) and matrix metalloproteinases (MMPs) have also been detected in VSMC and shown to be regulated by thrombin. ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteinase) are transmembrane metalloproteinases, belonging to adamalysin group, that are distinct from matrix metalloproteinases (MMPs) in that, they have an extracellular disintegrin domain and cytoplasmic domain that can associate with intracellular proteins. To the present knowledge there is no study that indicates the activation of an ADAM member in thrombin-induced VSMC proliferation.

In this dissertation, the role of EGFR, ERK1/2, HB-EGF, general metalloproteinases, MMP-2 and ADAM 12, as well as PKC δ in mediating the mitogenic action of Thrombin in rat VSMC was investigated. Incubation of rat VSMC with Thrombin (1 U/ml) for 5 minutes resulted in significant increase of ERK1/2 phosphorylation by 8.7 ± 0.9 fold ($p < 0.001$), EGFR phosphorylation by 8.5 ± 1.3 fold ($p < 0.001$) and DNA synthesis by 3.6 ± 0.4 fold ($p < 0.001$). Separate pretreatments for 30 minutes with EGFR tyrosine kinase irreversible inhibitor, 10 μ M PD169540 (PD), and 20 μ M anti-HB-EGF antibody, significantly reduced thrombin-stimulated EGFR and ERK1/2 phosphorylation by 81 %, 72 % and by 48 % and 61%, respectively. Furthermore, same pretreatments with PD and anti-HB-EGF antibody reduced Thrombin-induced VSMC’s proliferation by 44% and 45%, respectively. In addition, pretreatments for 30 minutes with 10 μ M KB-R7785 (KB), a specific ADAM 12 inhibitor or 10 μ M specific MMP2 inhibitor significantly reduced thrombin-stimulated EGFR and

ERK1/2 phosphorylation by 47 %, 47 % and by 25 % and 25 %, respectively. Furthermore, same pretreatments with either KB or MMP2 inhibitor reduced thrombin-induced VSMC's proliferation by 27 % and 45 % respectively. Pretreatment of VSMC with 5 μ M rottlerin, a specific inhibitor of PKC δ , for 30 min significantly reduced EGFR and ERK1/2 phosphorylation by 58 % and 55%, respectively and reduced significantly thrombin-induced VSMC's proliferation by 32%. These results show that thrombin-induced DNA synthesis correlates with the level of ERK1/2 activation rather than EGFR activation. Further, these results suggest that thrombin acts through EGFR and ERK 1/2 signaling pathways involving PKC δ , MMP-2 and ADAM 12, to up-regulate proliferation of VSMC.

Therefore, this thesis examines recent findings in signaling mechanisms employed by thrombin in modulating the regulation of proliferation of VSMC with particular emphasis on involvement of ADAM 12 and MMP2 that have been identified as important mediators of VSMC hypertrophy and vascular diseases. These findings are critical for understanding the role of thrombin in vascular biology and vascular diseases. Since these two molecules have been acknowledged as important mediators of VSMC migration and hypertrophy, MMP-2 and ADAM 12 are identified as one of key targets for novel therapeutic interventions to minimize irreversible tissue damage associated with hypertension and atherosclerosis. A safe option to regulate *in vivo* synthesis of MMP-2 and ADAM 12 would be welcome.

KEY WORDS: **Thrombin, VSMC, Proliferation, ADAM 12, MMP-2, PKC δ , EGFR, ERK1/2, HB-EGF, Atherosclerosis.**

SCIENTIFIC GROUP: **Biology**

SPECIFIC AREA WITHIN A GROUP: **Molecular Endocrinology**

UDK number:

Cover Design : **Katarina Smiljanić**

Picture in the front cover positioned in the middle and right of the title, represents cross section of arterial blood vessel (taken and modified from: <http://www.reproduction-online.org/content>).

Picture in the back cover was taken and modified from:
<http://chemistry.cua.edu/faculty/kovach.cfm>.

SPISAK SKRAĆENICA

ADAM	adamalizijske metaloproteinaze - (engl. “ A Disintegrin And Metalloproteinase ”)
ADAM 12	adamalizijska metaloproteinaza 12
ADAM-TS	adamalizijske metaloproteinaze sa trombospondinским domenima – (engl. “ A Disintegrin-like And Metalloproteinase with Trombospondin ”)
ANG II	angiotenzin II
AG	AG1478
AG1478	specifični reverzibilni inhibitor receptora za epidermalni faktor rasta
Akt/PKB	protein kinaza B - (engl. “ Protein Kinase B ”)
APS	amonijumpersulfat
At HB-EGF	anti HB-EGF neutrališuće monoklonsko antitelo
BCA	bicinhoninična kiselina
BrdU	5 bromo dezoksiuracil
BSA	goveđi serum albumini - (engl. “ Bovine Serum Albumine ”)
CDK	ciklin zavisne kinaze - (engl. “ Cyclin Dependent Kinase ”)
CKI	inhibitor ciklin zavisnih kinaza - (engl. “ Cyclin dependent Kinase Inhibitor ”)
c-Src	ne-receptorska ćelijska tirozin kinaza Src familije – (engl. “ Cell Sarcoma ”)
DAG	diacil-glicerol

DMEM	modifikovani rastvor za rast ćelija u kulturi - (engl. “ D ulbecco's M odified E agle's M edium”)
DMSO	dimetilsulfoksid
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
ECM	vanćelijski matriks - (engl. “ E xtracellular M atrix”)
EGF	epidermalni faktor rasta – (engl. “ E pidermal G rowth F actor”)
EGFR	receptor za epidermalni faktor rasta – (engl. “ E pidermal G rowth F actor R eceptor”)
EDTA	etilen-diamin-tetrasirćetna kiselina - (engl. “ E thylene D iamine T etraacetic A cid”)
EGTA	etilen-glikol-tetrasirćetna kiselina – (engl. “ E thylene G lycol T etraacetic A cid”)
ELISA	enzimom spregnut imunovezujući test - (engl. “ E nzyme L inked I mmuno- S orbent A ssay”)
eNOS	endotelna azot-monoksid-sintaza – (engl. “endothelial N itric O xide S ynthase”)
ERK1/2	ekstracelularnim signalima regulisane kinaze 1 i 2 – (engl. “ E xtracellular-signal R egulated K inase 1/2 ”)
ET-1	endotelin 1
FCS	fetalni teleći serum - (engl. “ F etal C alf S erum”)
FITC	fluorescein-izotiocijanat
GM	GM6001
GM6001	inhibitor ukupnih matriksnih metaloproteinaza
GPCR	receptor spregnut sa proteinom G – (engl. “ G P rotein C oupled R eceptor”)

Grb2	adaptorni protein Grb-2 (engl. “ G rowth F actor R eceptor B ound protein 2 ”)
GTP	guanozin trifosfat
HB-EGF	faktor rasta sličan epidermalnom faktoru rasta koji vezuje heparin (engl. “ H eparin B inding E pidermal G rowth F actor- like growth factor”)
HBSS	Hanks-ov puferisani fiziološki rastvor - (engl. “ H anks B uffered S aline S olution”)
IC₅₀	sredina (polovina) maksimalne koncentracije inhibicije
ICAM-1 Adhesion	međucelijski adhezioni molekul tipa 1 - (engl. “ I ntercellular C ell M olecule T ype- 1 ”)
IGF-1	insulinu sličan faktor rasta tipa 1 - (engl. “ I nsulin-like G rowth F actor T ype- 1 ”)
IL-1β	interleukin 1 beta
JAK	Jak kinaza - (engl. “ J ust A nother K inase”/ “ J anus K inase”)
JNK/SAPK	c-Jun N-terminalna kinaza - (engl. “ c - J un N - T erminal K inase/ S tress- A ctivated P rotein K inase”)
KB	KB-R7785
KB-R7785	specifični inhibitor ADAM 12
LDL	lipoproteini male gustine (engl. „ L ow- d ensity L ipoprotein”)
LPA	lizofosfatidna kiselina (engl. “ L ysophosphatidic A cid”)
MAPK	mitogenom aktivirane protein kinaze - (engl. “ M itogen- A ctivated P rotein K inases”)
MAPKK	kinaze MAPK - (engl. “ M APK K inases”)
MAPKKK	kinaze MAPKK - (engl. “ M APKK K inases”)

MCP-1	protein hemotaktičnog privlačenja monocita tipa 1- (engl. "Monocyte Chemoattractant Protein Type 1")
MMP	matriksne metaloproteinaze – (engl. "Matrix Metalloproteinase")
MMP-2	matriksna metaloproteinaza 2
MP	metaloproteinaze
MT1-MMP	transmembranska forma MMP tipa 1- (engl. "Membrane Type 1- Matrix Metalloproteinase")
NFκB	nuklearni faktor-κB - (engl. "Nuclear Factor-κB")
NO	azot-monoksid
p85α	regulatorna subjedinica fosfatidilinozitol-3 –kinaze
PAI	inhibitor aktivatora plazminogena - (engl. "Plasminogen Activator Inhibitor")
PAR	proteolitički aktiviran receptor - (engl. "Proteolytically Activated Receptor")
PBS	fosfatno puferisan rastvor kuhinjske soli - (engl. "Phosphate Buffered Saline")
PD	PD169540
PD 169540	ireverzibilni inhibitor receptora za epidermalni faktor rasta
PDGF	faktor rasta poreklom iz krvnih pločica - (engl. "Platelet Derived Growth Factor")
p-EGFR	fosforilisana forma EGFR receptora
p-ERK1/2	fosforilisana forma ERK1/2 kinaze
PH	plekstrinu homologni domeni, kratke oligopeptidne sekvence u proteinima - (engl. "Pleckstrin Homology")

PHEN	orto-fenantrolin, inhibitor ukupnih metaloproteinaza
PKA	protein kinaza A - (engl. “ P rotein K inase A ”)
PKC	protein kinaza C - (engl. “ P rotein K inase C ”)
PKCδ	protein kinaza C delta
PKCϵ	protein kinaza C epsilon
PI3-K	fosfatidilinozitol-3 –kinaza - (engl. “ P hosphoinositide 3-K inase”)
pro HB-EGF	transmembranski prekursor faktora rasta sličnog epidermalnom faktoru rasta koji vezuje heparin (engl. “ pro H eparin B inding- E pidermal G rowth F actor – like growth factor”)
pro-MMP-2	neaktivna, zimogena forma MMP-2
PVDF	polivinil-difluorid
Pyk2	ne-receptorska tirozin kinaza, bogata prolinom i zavisna od kalcijuma
Ras	mali GTP vezujući protein – (engl. “ R at sarcoma”)
Raf	Raf specifična serin/treonin protein kinaza – (engl. “ R apidly A ccelerated F ibrosarcoma kinase”)
ROS	reaktivne vrste kiseonika - (engl. “ R eactive O xygen S pecies”)
Rot	rotlerin, inhibitor protein kinaze C delta – (engl. “ R ottlerin”)
RTK	receptorske tirozin kinaze – (engl. “ R eceptor T yrosin K inase”)
SI-II	specifični inhibitor- II matriksne metaloproteinaze 2
SDS	natrijum dodecil sulfat - (engl. “ S odium D odecyl S ulphate”)
SDS-PAGE	poliakrilamidna gel elektroforeza u prisustvu deterdženta SDS - (engl. “ SDS P olyacrylamide G el E lectrophoresis”)
Ser	aminokiselina serin

Shc	Src homologni i kolagen protein (engl. “ S rc H omology and C ollagen P rotein”)
TGF-α	transformišući faktor rasta alfa – (engl. “ T ransforming G rowth F actor A lpha”)
TGF-β	transformišući faktor rasta beta – (engl. “ T ransforming G rowth F actor B eta”)
t-ERK1/2	ukupna ERK1/2 kinaza
t-EGFR	ukupni EGFR receptor
TEMED	tetrametiletildiamin
TIMP	tkivni inhibitori metaloproteinaza – (engl. “ T issue I nhibitor of M etaloproteinases”)
TBS	TRIS pufersan rastvor kuhinjske soli - (engl. “ T ris B uffered S aline”)
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
TNF-α	faktor nekroze tumora alfa – (engl. “ T umor N ecrosis F actor- A lpha”)
Thr	aminokiselina treonin
TRIS	tris(hidroksimetil)aminometan
Tyr	aminokiselina tirozin
VCAM-1	adhezioni molekul vaskularnih ćelija tipa 1 - (engl. “ V ascular C ell A dhesion M olecule T ype- 1 ”)
VSMC	glatke mišićne ćelije krvnih sudova - (engl. “ V ascular S mooth M uscle C ell”)
WST-1	tetrazolijum so tipa 1

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Građa, uloga i osobine VSMC u vaskulaturi.....	3
1.2. Poremećaji u kardiovaskularnom sistemu i kardiovaskularne bolesti uzrokovane prekomernom proliferacijom VSMC	7
1.3. Ćelijski ciklus i antiproliferativni terapijski pristupi u VSMC.....	10
1.4. Trombin u aterosklerozi i proliferaciji VSMC	12
1.4.1. Građa i funkcije trombina u vaskulaturi	12
1.4.2. Struktura trombinskih receptora.....	14
1.4.3. Uloga trombina u aterosklerozi.....	15
1.4.4. Uloga trombina u proliferaciji VSMC	17
1.5. EGFR i transaktivacija EGFR	18
1.5.1. Uloga HB-EGF u aktivaciji EGFR i proliferaciji VSMC	20
1.5.2. Uloga MMP u transaktivaciji EGFR i proliferaciji VSMC	21
1.5.3. Uloga ADAM u transaktivaciji EGFR i proliferaciji VSMC	23
1.6. Uloga PKC δ u proliferaciji VSMC	24
1.7. Uloga MAPK u proliferaciji VSMC	25
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	28
3. HIPOTEZA	29
4. MATERIJAL I METODE	30
4.1. Reagensi i antitela	30
4.2. Izolovanje VSMC iz aorte pacova.....	30
4.3. Uspostavljanje primarne kulture VSMC	32
4.4. Praćenje broja, vijabilnosti i čistoće dobijene primarne kulture VSMC.....	34
4.5. Eksperimentalni dizajn	36
4.6. Inhibitori molekula učesnika proliferativnog puta VSMC.....	38
4.6.1. PD169540, ireverzibilni i potentni inhibitor EGFR.....	38
4.6.2. AG 1478, potentni, reverzibilni inhibitor EGFR	39
4.6.3. Anti-HB-EGF neutrališuće antitelo kao imuno-blokator HB-EGF funkcije	40
4.6.4. o-fenantrolin, inhibitor ukupnih MP	40

4.6.5.	Inhibitor ukupnih MMP, GM6001	41
4.6.6.	MMP-2 Inhibitor II (SI-II)	42
4.6.7.	KB-R7785, potentni inhibitor ADAM 12	43
4.6.8.	Rotlerin, specifični inhibitor PKC δ	44
4.7.	Test kvantitativnog određivanja DNK sinteze (ELISA BrdU test).....	45
4.8.	Izolacija ukupnih proteina iz VSMC	46
4.9.	Određivanje koncentracije proteina.....	46
4.10.	Natrijum dodecil sulfat elektroforeza na poliakrilamidnom gelu	47
4.11.	Imuno blot (Western blot)	48
4.12.	Statistička obrada i prikaz rezultata.....	50
5.	REZULTATI.....	51
5.1.	Efekti trombina na proliferaciju VSMC	51
5.2.	Efekti trombina na fosforilaciju EGFR receptora u VSMC	52
5.3.	Efekti trombina na fosforilaciju ERK1/2 kinaze u VSMC.....	53
5.4.	Uloga EGFR u trombinom stimulisanj proliferaciji VSMC	54
5.4.1.	Efekti ireverzibilnog inhibitora PD na trombinom stimulisanu fosforilaciju EGFR, ERK1/2 i proliferaciju VSMC	54
5.4.2.	Efekti reverzibilnog inhibitora AG1478 na trombinom stimulisanu fosforilaciju EGFR, ERK1/2 i proliferaciju VSMC.....	57
5.5.	Uloga HB-EGF u regulaciji trombinom stimulisane proliferacije VSMC.....	61
5.5.1.	Efekat inhibicije HB-EGF na trombinom stimulisanu fosforilaciju EGFR, ERK1/2 i proliferaciju VSMC	61
5.6.	Uloga metaloproteinaza (MP) u regulaciji proliferacije VSMC stimulisane trombinom	64
5.6.1.	Uticaj PHEN inhibitora ukupnih MP na trombinom stimulisanu fosforilaciju EGFR i ERK1/2 i proliferaciju VSMC	65
5.6.2.	Uticaj GM inhibitora ukupnih MMP na trombinom stimulisanu fosforilaciju EGFR i ERK1/2 i proliferaciju VSMC	68
5.7.	Uloga MMP-2 u regulaciji proliferacije VSMC pod delovanjem trombina	71
5.7.1.	Efekat SI-II specifičnog inhibitora MMP-2 na trombinom stimulisanu fosforilaciju EGFR, ERK1/2 i proliferaciju VSMC.....	72
5.8.	Uloga ADAM 12 u regulaciji proliferacije VSMC pod delovanjem trombina.....	75

5.8.1.	Efekti KB inhibitora ADAM 12 na trombinom stimulisanu fosforilaciju EGFR, ERK1/2 i proliferaciju VSMC	76
5.9.	Uloga PKC δ u regulaciji proliferacije VSMC pod delovanjem trombina	79
5.9.1.	Efekat Rot inhibitora PKC δ na trombinom stimulisanu fosforilaciju EGFR, ERK1/2 i proliferaciju VSMC	80
6.	DISKUSIJA	83
6.1.	Dejstvo trombina na proliferaciju VSMC	84
6.2.	Uloga EGFR u proliferaciji VSMC pod delovanjem trombina.....	86
6.3.	Uloga ERK1/2 u EGFR- posredovanoj proliferaciji VSMC stimulisanom trombinom – da li je aktivacija EGFR zaista „neophodna”?.....	89
6.4.	Uloga HB-EGF u transaktivaciji EGFR, aktivaciji ERK1/2 i proliferaciji VSMC stimulisanih trombinom.....	92
6.5.	Uloga ADAM 12 i MMP-2 u proliferaciji VSMC pod delovanjem trombina.....	93
6.6.	Uloga PKC δ u trostrukoj kaskadi transaktivacije EGFR, aktivaciji ERK1/2 i proliferaciji VSMC pod delovanjem trombina.....	103
6.7.	Trostruka kaskada EGFR transaktivacije trombinom i nizvodni signali proliferacije VSMC	104
7.	ZAKLJUČCI.....	109
8.	REFERENCE	112

1. UVOD

Glatke mišićne ćelije krvnih sudova (VSMC, engl. “**V**ascular **S**mooth **M**uscle **C**ell”) od vitalnog su značaja za strukturu i funkcionisanje krvnih sudova. Proliferacija i abnormalna akumulacija VSMC među ključnim su događajima u nastanku raznih vaskularnih oboljenja, uključujući aterosklerozu i hipertenziju (Beckman i sar., 2002; Mnjoyan i sar., 2008). Kardiovaskularne bolesti su vodeći uzrok smrtnosti ljudske populacije u čijoj osnovi u najvećoj meri dominira ateroskleroza kao patološka komponenta (Hozawa i sar., 2007).

Trombin je moćni modulator mnogih procesa kao što su regulisanje tonusa i propustljivosti krvnih sudova, migracije i proliferacije VSMC, privlačenja monocita i raznih proinflamatornih markera u aterosklerotske lezije, a sve ovo takođe, doprinosi progresiji kardiovaskularnih oboljenja (Borissoff i sar., 2009). Trombin je agonist receptora spregnutog sa proteinom G (GPCR, engl. “**G** **P**rotein **C**oupled **R**eceptor”), čijom aktivacijom dolazi do stimulacije fosfolipaze C, porasta nivoa intracelularnog Ca^{2+} i aktivacije protein kinaze C (PKC), što sve zajedno aktivira signalni put mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK, engl. “**M**itogen-**A**ctivated **P**rotein **K**inases”), u kome centralno mesto zauzima ekstracelularnim signalom regulisana kinaza 1/2 (ERK1/2, engl. “**E**xtracellular-signal **R**egulated **K**inase **1/2**”) (Fager, 1995; Gutkind, 1998a). U prethodnim studijama potvrdili smo učešće ERK1/2 u regulaciji proliferacije VSMC izazvanoj trombinom (Bobe i sar., 2003; Isenovic i sar., 2010a). U okviru nekoliko ćelijskih vrsta pokazano je da trombin posreduje u njihovoj proliferaciji kroz transaktivaciju receptora za epidermalni faktor rasta (EGFR) koja uključuje metaloproteinaze (MP) koje cepaju ligande (engl. “shedding of ligands”) od membranskih prekursora kao što je prekursor faktora rasta sličan epidermalnom faktoru rasta koji vezuje heparin (pro-HB-EGF, engl. “**pro** **H**eparin **B**inding-**E**pidermal **G**rowth **F**actor – like growth factor”). Otcepljeni faktor rasta sličan epidermalnom faktoru rasta koji vezuje heparin (HB-EGF, engl. “**H**eparin **B**inding **E**pidermal **G**rowth **F**actor- like growth factor”), vezuje se za EGFR i aktivira ga (Bobe i sar., 2003; Hsieh i sar., 2009; Prenzel i sar., 1999).

Cepanje EGFR liganada vrše adamalizinske metaloproteinaze (ADAM, engl. “**A Disintegrin And Metalloproteinase**”) i matriksne metaloproteinaze (MMP, engl. “**Matrix Metalloproteinase**”). Transaktivacija EGFR kao posledica dejstva nekih GPCR agonista, bila je i još uvek je aktuelna tema u istraživanju ćelijskih signalnih puteva (Ohtsu i sar., 2006a). U literaturi postoje brojni podaci o efektima angiotenzina II (ANG II), transformišućeg faktora rasta alfa (TGF- α), lizofosfatidne kiseline (LPA), fenilefrina, endotelina-1 (ET-1), kao ćelijskim aktivatorima koji dovode do cepanja EGFR liganada aktivacijom različitih ADAM molekula i sledstvene EGFR transaktivacije i ćelijske proliferacije, ali ne i podaci o efektima trombina. Prema našim saznanjima, ne postoje literaturni podaci koji ukazuju na ADAM metaloproteinaznu aktivnost vezanu za EGFR transaktivaciju i proliferaciju bilo koje ćelijske linije uključujući i VSMC, pod delovanjem trombina.

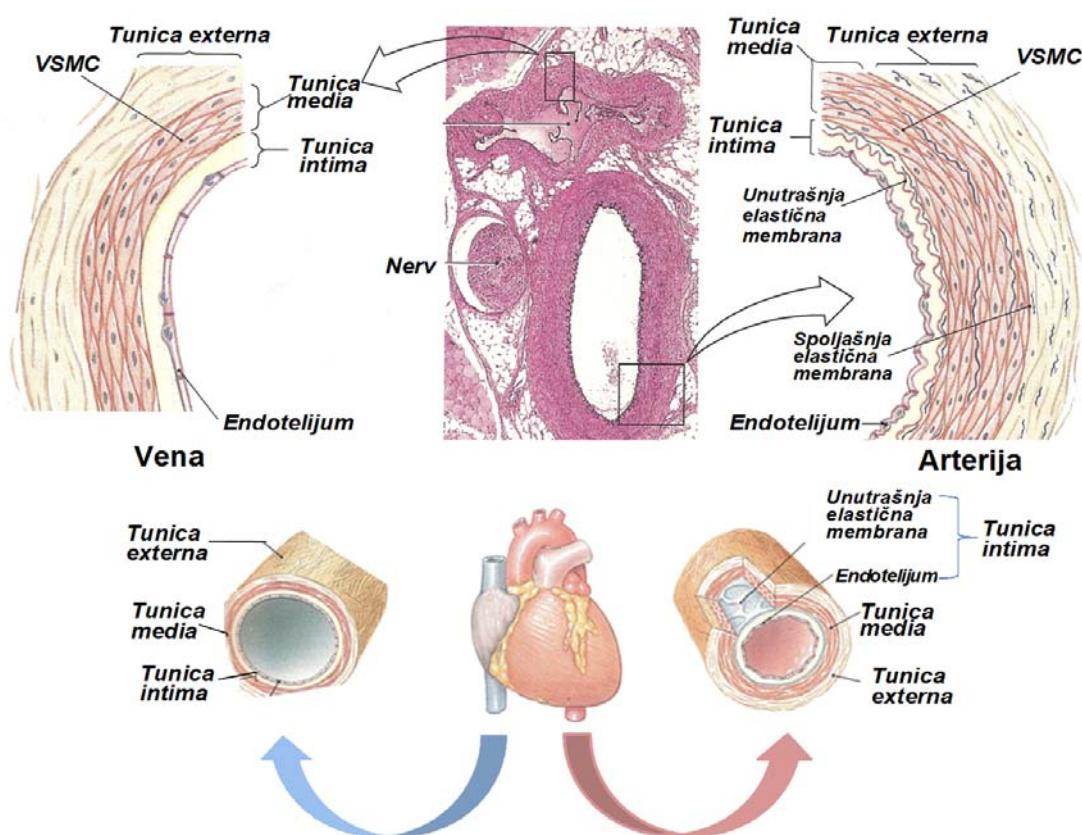
S druge strane, iako HB-EGF i matriksna metaloproteinaza 2 (MMP-2) u VSMC čine sastavni deo transaktivacione kaskade EGFR, koja vodi migraciji ovih ćelija pod uticajem trombina, još uvek nema potpunog odgovora na pitanje da li i na koji način MMP-2 utiče na proliferaciju VSMC pod delovanjem trombina, obzirom na kontroverzne literaturne podatke o uticaju MMP na proliferaciju VSMC (Huang i sar., 2009; Koo i sar., 2010; Newby, 2006; Ohtsu i sar., 2006a; Smiljanic i sar., 2011).

Brojna familija Ser/Thr PKC uključena je u mnoge ćelijske aktivnosti i regulaciju signalnih puteva (Mellor i sar., 1998; Rosse i sar., 2010) uključujući i proliferaciju glatkih mišićnih ćelija traheja čoveka i psa pod delovanjem trombina (Lin i sar., 2001; Lin i sar., 2002). Protein kinaza C delta (PKC δ), član podgrupe novih PKC kinaza (Mellor i sar., 1998), do skora je bila implicirana samo u negativnoj regulaciji proliferacije i apoptoze u velikom broju ćelijskih linija i tumorskih ćelija (Grossoni i sar., 2007; Yamaguchi i sar., 2007). Prvi izveštaj o pozitivnoj mitogenoj ulozi PKC δ u ćelijama mlečnih žlezda pacova je u studiji Grossoni i saradnika (2007). Nedavno, Hsieh i sar. (2009), a potom i Smiljanić i saradnici (2011) su ukazali na pozitivno učešće PKC δ u proliferaciji VSMC pacova stimulisanih trombinom ali je ostao nerazjašnjen mehanizam dejstva ove kinaze.

1.1. Građa, uloga i osobine VSMC u vaskulaturi

Glatko mišićno tkivo (*lat. „textus muscularis nonstriatus”*) ulazi u sastav krvnih i limfnih sudova, organa sistema za varenje, dušnika, mokraćne bešike, materice, kože, unutrašnjih mišića oka itd. Za razliku od skeletnih mišića, glatki mišići su sposobni za dugotrajne kontrakcije i veoma se teško zamaraju (Guyton i sar., 1999).

Zidovi arterija i vena sadrže 3 različita sloja. *Tunica intima* oblaže lumen krvnog suda i sačinjen je uglavnom od endotelnih ćelija i vezivnog tkiva bogatog elastičnim vlaknima (**Slika 1.1.1**).

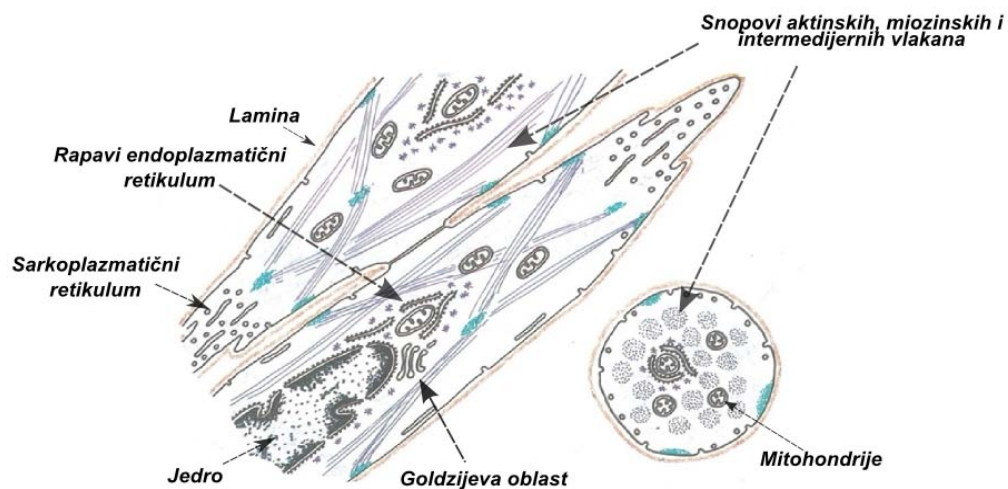


Slika 1.1.1 Poprečni i trodimenzionalni preseki prikaza građe krvnih sudova. Preuzeto i modifikovano iz „Fundamentals of Anatomy & Physiology”, (Martini i sar., 1995).

Tunica media je srednji deo koji sadrži koncentrične slojeve VSMC uronjene u rastresito vezivno tkivo koje oblaže endotel i reguliše dijаметar krvnog suda svojim kontrahovanjem i opuštanjem, omogućavajući kontrolu krvnog pritiska (Martini i sar., 1995). Spoljni sloj (*lat. „tunica adventitia”, „tunica externa”*), čine pretežno vezivno

tkivo koje u zavisnosti od veličine i vrste krvnog suda sadrži različit odnos i stepen elastičnih i kolagenih vlakana. Zidovi arterija su deblji i elastičniji od zidova vena jer sadrže više koncentričnih slojeva VSMC, i unutrašnju i spoljašnju elastičnu membranu (Slika 1.1.1).

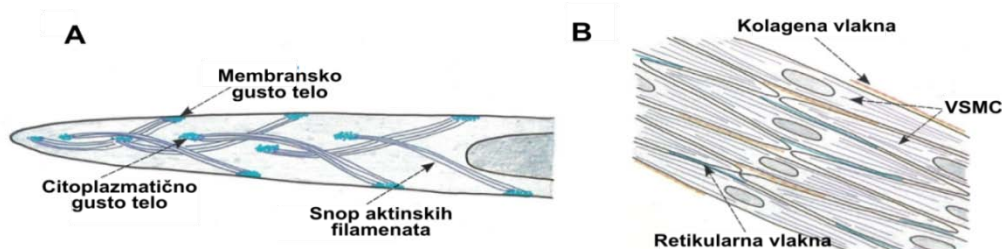
VSMC su vretenastog oblika i imaju jedno jedro postavljeno u središnjem delu citoplazme koje unekoliko prati oblik ćelije svojom spljošteno-jajolikom formom (Slika 1.1.2). Dužina im se kreće od 20 do 500 μm , a dijametar 2-5 μm (Guyton i sar., 1999).



Slika 1.1.2 Morfološke odlike VSMC – uzdužni i poprečni presek ćelije. Citoplazmatske organele uključene u sintetske procese, rapavi endoplazmin retikulum i deo Goldžijeve oblasti, kao i glikogenske čestice (ljubičasto), koncentrisane su u središnjem delu ćelije uz jajoliko euhromatsko jedro. Elementi sarkoplazminog retikuluma, pinocitotske vezikule i kaveoli nalaze se u perifernom delu ćelije. Oko svake ćelije zapaža se lamina (smeđe). Većinu citoplazme zauzimaju snopovi aktinskih, miozinskih i intermedijarnih filamenata (plavo) između kojih su smeštene mitohondrije. Preuzeto i modifikovano iz „Pokretne i nepokretne ćelije“ (Šerban, 1995).

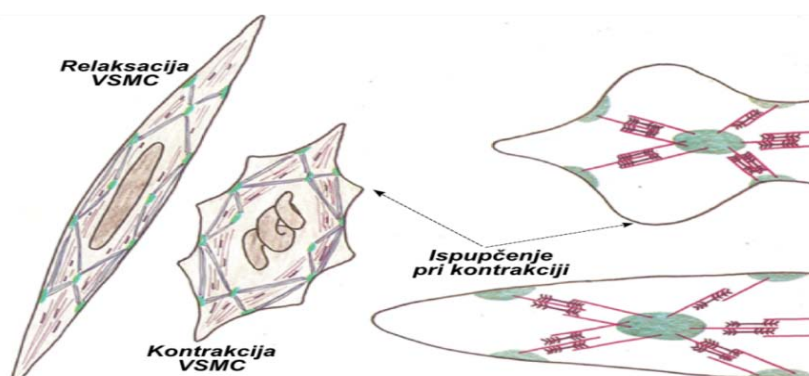
Aktinski filamenti su uronjeni u tzv. gusta amorfnu tela (engl. “dense body”), lokalizovana uz ćelijsku membranu ili su razasuta po citoplazmi (Slika 1.1.2). Gusta tela, danas poznatija kao jedna od formi fokalnih adhezija ćelije, predstavljaju velike, dinamične proteinske komplekse preko kojih se citoskelet povezuje sa vanćelijskim matriksom (ECM, engl. “**E**xtracellular **M**atrix”) (Gerthoffer i sar., 2001). Među tankim aktinskim filamentima raspoređeni su i miozinski debeli filamenti, 15 puta manje zastupljeni od aktinskih vlakana, zajedno raspoređeni u vidu spiralno zakrivljenih

snopova (**Slika 1.1.3**). U skupinama VSMC, pojedinačne ćelije su tako postavljene da izduženi i suženi krajevi jednih VSMC naležu na proširene središnje delove susednih ćelija (**Slika 1.1.3**), gradeći obrazac koji je poznat i kao „dolina-breg” (engl. “hill and valley pattern”).



Slika 1.1.3 Morfološke karakteristike VSMC (A) Snopovi aktinskih filamenata (plavo) u ćeliji se pružaju blago spiralno zakrivljeni; jednim svojim krajem uronjeni u citoplazmatsko gusto telo a drugim u membransko gusto polje. (B) VSMC koje grade glatku muskulaturu zida krvnog suda postavljene su međusobno paralelno. U organizovanju glatke muskulature učestvuju i retikularna (zeleno) i kolagena vlakna (smeđe). Preuzeto i modifikovano iz „Pokretne i nepokretne ćelije“ (Šerban, 1995).

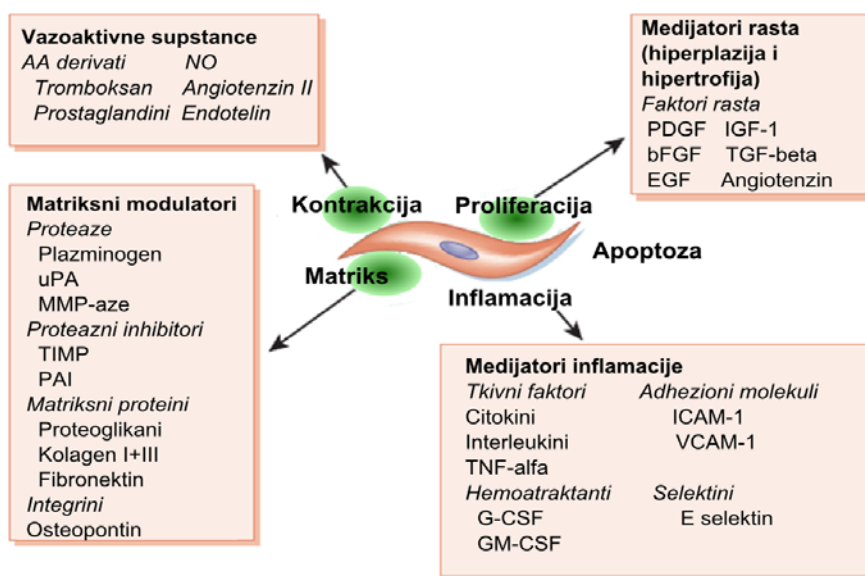
Između gustih tela susednih ćelija ponekad se uspostavljaju međućelijski proteinski mostovi (Guyton i sar., 1999) koji prenose kontraktilnu silu jedne ćelije na drugu pa se kontrahovanje i opuštanje skupine ćelija odigrava sinhrono (Walsh i sar., 1999). Prilikom kontrahovanja vretenast oblik VSMC se menja (**Slika 1.1.4**). U kontrahovanoj ćeliji promenjen je i izgled jedra koje se prilagođava promeni prostora i spiralno se uvija (**Slika 1.1.4**).



Slika 1.1.4 Kontrakcija i relaksacija VSMC. Pri kontrakciji glatka mišićna ćelija krvnog suda se skraćuje u odnosu na dužinu koju ima u stanju relaksacije. Njen prečnik se povećava a na površini, između susednih membranskih gustih tela (zeleno), zapaža se

pojava ispupčenja. Aktinski filament – ciklama; miozinski filament – ljubičasto; intermedijarni filament – plavo. Preuzeto i modificirano iz „Pokretne i nepokretne ćelije“ (Šerban, 1995).

VSMC nakon diferenciranja i sazrevanja ostaju sintetski aktivne i zadržavaju sposobnost deobe pod uticajem faktora rasta (Šerban, 1995). Aktivirane VSMC imaju funkcionalne i morfološke osobine embrionalnih VSMC, sposobnih da se dele, migriraju i sintetišu komponente ECM i faktora rasta (Walsh i sar., 1999) (Slika 1.1.5). Fenotipski prelaz VSMC je reverzibilan i naziva se fenotipska modulacija. Na jednom kraju fenotipskog spektra su visoko diferencirane, kontraktilne VSMC kakve se nalaze u adultnom, intaktnom krvnom sudu, koje omogućavaju vazokonstrikciju i vazorelaksaciju (Campbell i sar., 1985). Na suprotnom su VSMC sekretornog tipa nalik fibroblastima, sa aktivnim proliferativnim i migratornim kapacitetima, VSMC prisutne tokom embrionalnog razvika ili u lezijama krvnih sudova (Walsh i sar., 1999). Fenotipskom modulacijom objašnjava se rasprostranjeno učešće VSMC, kako u normalnim, fiziološkim procesima, tako i u patofiziološkim poremećajima poput ateroskleroze i hipertenzije (Berk, 2001; Campbell i sar., 1985; Dzau i sar., 2002).



Slika 1.1.5 Različite uloge VSMC u vaskulaturi u zavisnosti od uslova sredine: proliferacija, inflamacija, promena matriksa i kontrakcija. Mnogi od medijatora imaju višestruke funkcije. Na primer, trombin je vazodilatator, ali stimuliše i proliferaciju i inflamaciju. AA, arahidonska kiselina; TNF- α , faktor nekroze tumora alfa; G-CSF, faktor stimulacije kolonije granulocita; GM-CSF, faktor stimulacije kolonije granulocita i monocita; MCP-1, protein hemotaktičkog privlačenja monocita

tipa-1; ICAM-1, međucelijski adhezioni molekul tipa-1; VCAM-1, adhezioni molekul vaskularnih ćelija tipa-1; MMP – matriksne metaloproteinaze ; PDGF, faktor rasta porekom iz krvnih pločica; bFGF, osnovni faktor rasta fibroblasta; EGF, epidermalni faktor rasta; IGF-1, insulinu sličan faktor rasta tipa-1 ; TGF- β , transformišući faktor rasta beta; uPA, urokinazni tip plazminogen aktivatora; TIMP, engogeni tkivni inhibitori MMP; PAI, inhibitor aktivatora plazminogena. Preuzeto i modifikovano iz (Dzau i sar., 2002).

1.2. Poremećaji u kardiovaskularnom sistemu i kardiovaskularne bolesti uzrokovane prekomernom proliferacijom VSMC

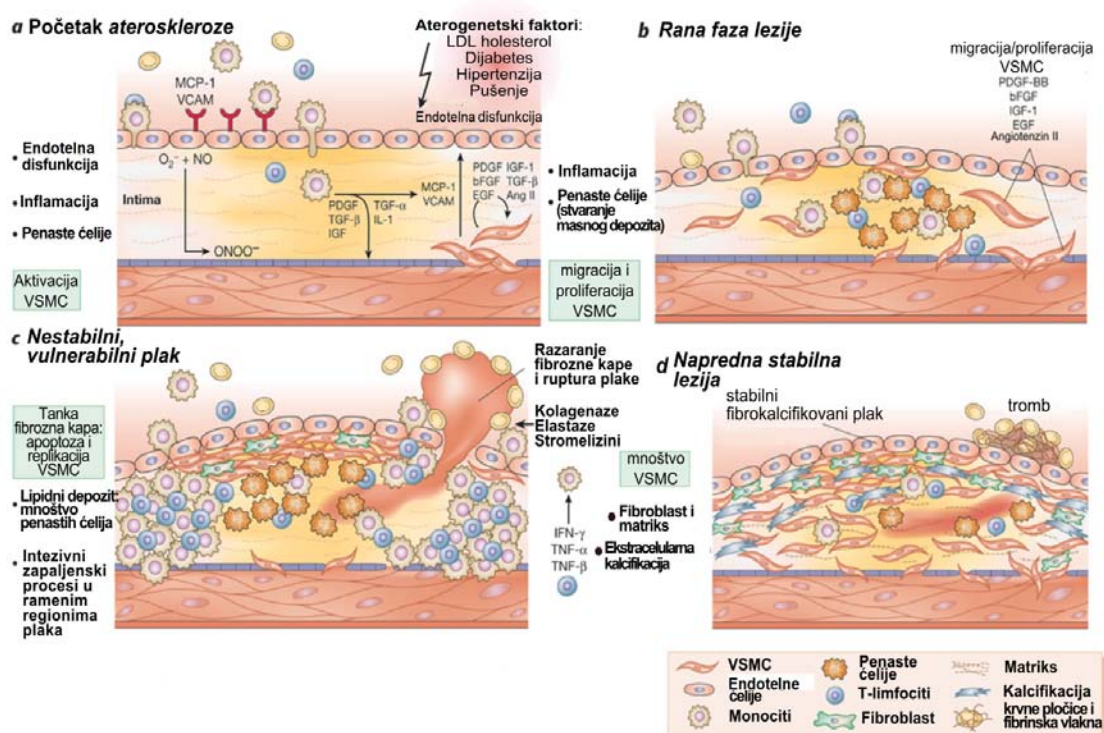
Kardiovaskularni sistem čini srce, čiji je zadatak da ispumpava krv, kao i sistem sudova za cirkulaciju, koji obuhvata arterije, vene, kapilare i limfne sudove (Martini i sar., 1995). Najčešće bolesti ovog sistema jesu slabljenje snage mišića srca (kardiomiopatije, kongestivna insuficijencija srca), poremećaj ritma rada srca (aritmije) i nedostatak kiseonika u srčanom mišiću zbog bolesti koronarnih sudova (ateroskleroza, ishemijska bolest srca, angina pectoris, infarkt srca) (Guyton i sar., 1999; Hozawa i sar., 2007). Opšta bolest vaskularnog sistema je hipertenzija (povišen arterijski pritisak), koja je faktor razvoja ostalih brojnih poremećaja kardiovaskularnog sistema (Hayashi i sar., 2009; Mulvany i sar., 1978). Kardiovaskularne bolesti su vodeći uzrok smrtnosti ljudske populacije u čijoj osnovi u najvećoj meri dominira ateroskleroza kao patološka komponenta (Beckman i sar., 2002; Hozawa i sar., 2007).

Ateroskleroza je bolest oštećenja i suženja krvnih sudova. Ona je i glavni uzrok infarkta miokarda, moždanog udara i perifernih vaskularnih bolesti, koje čine približno polovinu svih smrtnih slučajeva u razvijenim zemljama (Rivard i sar., 2000). Ateroskleroza uključuje orkestrirane procese endotelne disfunkcije, inflamacije, proliferacije VSMC i reorganizaciju vanćelijskog matriksa (Dzau i sar., 2002). Kompleksan proces ateroskleroze karakteriše formiranje neointimalnih lezija koje progresivno zagušuju arterijski lumen (Libby i sar., 2002; Ross, 1999).

Neointimalno zadebljanje nastaje kao akumulacija ćelijskih elemenata i vanćelijskih supstanci u prostoru između *tunica intima* (endotelnog sloja) i koncentričnih slojeva VSMC u *tunica media* (**Slika 1.2.1**). Studije sa hiperholesterolemičnim životinjama i na humanim aterosklerotskim arterijama identifikovale su tri procesa koji vode formiranju aterosklerotskih lezija: 1) proliferacija

VSMC, makrofaga i limfocita; 2) formiranje vezivnog tkivnog matriksa sastavljenog od elastičnih, kolagenih i proteoglikanskih vlakana i 3) akumulacije lipida, najviše slobodnog i esterifikovanog holesterola u okružujućem matriksu sa pridruženim ćelijama (Rivard i sar., 2000; Ross, 1993) (Slika 1.2.1).

Najnoviji podaci studija korelacije na humanom materijalu, kako u *in vitro* uslovima mehanističkih studija, tako i u *in vivo* uslovima, ukazuju na važnu ulogu VSMC u inicijaciji ateroskleroze (Doran i sar., 2008; Feil i sar., 2004; Wolfsgruber i sar., 2003). VSMC su glavni proizvođači komponenti ECM i u odgovoru na aterogene stimulse mogu modifikovati tip matriksnih proteina koje proizvode. Vrsta prisutnih komponenti ECM utiče na lipidni sadržaj plaka u razvoju i na proliferativni indeks ćelija koje se nalaze u njemu (Doran i sar., 2008).



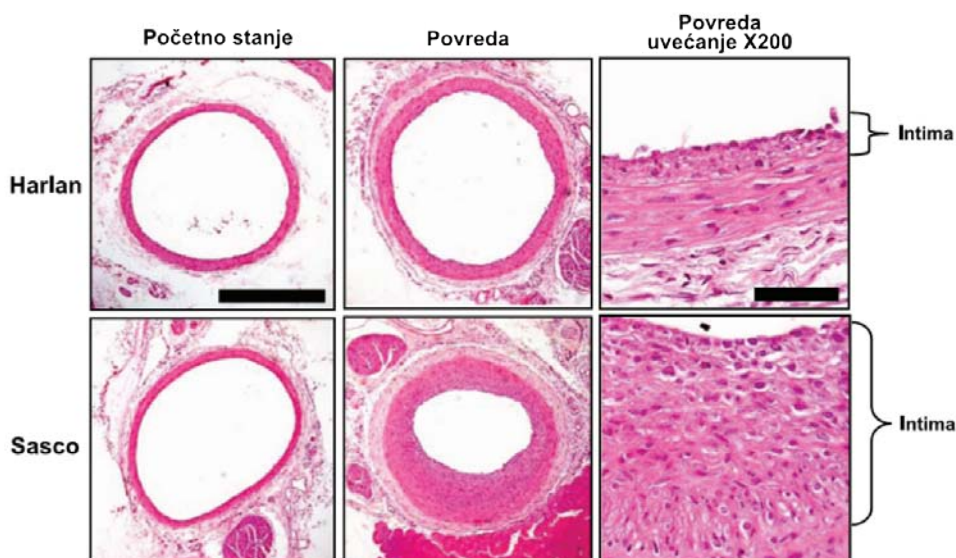
Slika 1.2.1 Funkcionisanje VSMC tokom različitih faza ateroskleroze. Kardiovaskularni rizici menjaju endotel, što uzrokuje kaskadu događaja uključujući i privlačenje leukocita. Citokini i faktori rasta proizvedeni od strane inflamatornih ćelija i VSMC stvaraju milje sa visokim mitogenim potencijalom. VSMC migriraju, dele se i sintetišu komponente ECM na unutrašnjoj strani krvnog suda, formirajući fibroznu kapu aterosklerotske lezije. Medijatori inflamacije potom indukuju stanjivanje fibrozne kape potičući ekspresiju metaloproteinaza, čineći plak slabim i podložnim pucanju i formiranju tromba. U podmakloj bolesti, fibroblasti i VSMC učestvuju u stvaranju

fibrokalcifikovanih lezija. LDL – lipoproteini male gustine; MCP-1 – protein hemotaktičnog privlačenja monocita tipa 1; VCAM-1 – molekul adhezije vaskularnih ćelija tipa 1; PDGF-BB – faktor rasta krvnih pločica BB, beta lanac homodimera; TNF – faktor nekroze tumora; TGF- β – transformišući faktor rasta beta; IL-1 - interleukin 1; IGF-1 – insulinu sličan faktor rasta tipa 1; bFGF - osnovni faktor rasta fibroblasta; Ang II - angiotenzin II; EGF – epidermalni faktor rasta; IFN γ – interferon gama. Preuzeto i modificirano iz (Dzau i sar., 2002).

Kao i makrofazi, VSMC eksprimiraju mnoge receptore za preuzimanje lipida i mogu formirati „penaste” ćelije, učestvujući u ranoj akumulaciji lipida u plaku. Takođe, poput endotelnih ćelija, VSMC eksprimiraju razne adhezione molekule kao što su molekul adhezije vaskularnih ćelija tipa 1 (VCAM-1, engl. „**V**ascular **C**ell **A**dhesion **M**olecule **T**ype-**1**”) i molekul međućelijske adhezije tipa 1 (ICAM-1, engl. „**I**nter**C**ellular **C**ell **A**dhesion **M**olecule **T**ype-**1**”) i migriraju kroz zid krvnog suda. Preko istih molekula VSMC mogu inhibirati apoptozu drugih ćelija, doprinoseći tako ranoj celularnosti lezije. I VSMC kao i druge ćelije proizvode citokine: faktor rasta poreklom iz krvnih pločica (PDGF, engl. „**P**latelet-**d**erived **G**rowth **F**actor”), transformišući faktor rasta beta (TGF- β , engl. „**T**ransforming **G**rowth **F**actor **b**eta”), interferon gama (IFN γ) i protein hemotaktičnog privlačenja monocita (MCP-1, engl. „**M**onocyte **C**hemoattractant **P**rotein **T**ype-**1**”), koji započinju i propagiraju zapaljenski odgovor na lipide.

U patofiziologiji in-stent i balon restenoze (ponovno sužavanje krvnog suda nakon ugradnje stenta i balona radi dilatacije krvnog suda), vaskulopatiji usled transplantacije (engl. “transplant vasculopathy”) i odbacivanju venskog kalema pri premošćavanju zapuštenih krvnih sudova (engl. “vein bypass graft failure”), proliferacija VSMC zauzima centralno mesto (Dzau i sar., 2002; Mnjoyan i sar., 2008; Ross, 1993). Važno je istaći da se ova patološka stanja poput angioplastične restenoze i odbacivanja venskog grafta, razvijaju kao posledica procedura primenjivanih da bi se otklonile okluzije nastale usled aterosklerotskih poremećaja. Stoga ne čudi da se još uvek veliki naponi ulažu u razvoj tretmana i lekova ciljanih na regulaciju ćelijskog ciklusa koji će inhibirati ćelijsku proliferaciju (Marche i sar., 1990; Mnjoyan i sar., 2008). VSMC na povredu krvnog suda reaguju ekstenzivnom proliferacijom i migracijom u intimalni deo zida krvnog suda (Mnjoyan i sar., 2008) (**Slika 1.2.2**). Primarna hipertenzija vodi hipertrofiji i/ili hiperplaziji VSMC i sledstvenoj promeni strukture krvnog suda (Marche i sar., 1995), obzirom da dugotrajan povišen krvni pritisak vodi stalnom pojačanom

istezanju krvnih sudova, te je i to jedna vrsta povređivanja strukture krvnog suda (Mulvany, 1991; Mulvany i sar., 1978). Takođe, pokazano je da VSMC izolovane iz spontano hipertenzivnih pacova brže proliferišu nego VSMC izolovane iz njihovih kontrolnih Wistar-Kyoto pacova (Yamori i sar., 1981).



Slika 1.2.2 Odgovor karotidnih arterija Sasco i Harlan soja pacova na povredu izazvanu ugradnjom balona. Drastična neointimalna proliferacija u povređenim karotidnim arterijama Sasco soja pacova 14 dana nakon povrede modelom ugradnje balona. Posmatrano pod mikroskopom na uvećanju X 25 (početno stanje i povreda) i uvećanju X 200 (povreda). Crne duži predstavljaju 500 μm i 50 μm na malom i velikom uvećanju. Preuzeto i modifikovano iz (Mnjoyan i sar., 2008).

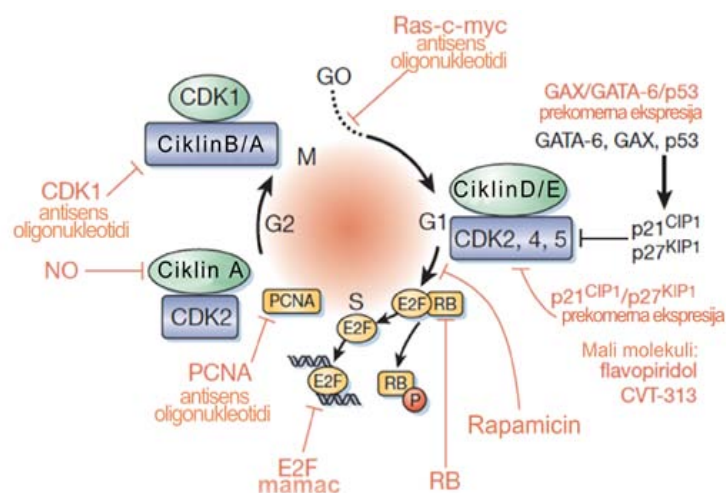
Glavne funkcionalne uloge VSMC u nastanku ateroskleroze su: (1) fenotipska modulacija VSMC odnosno njihov preokret iz mirnog, kontraktilnog oblika u aktivni, migratorno-sintetski fenotip; (2) depozicija ekstracelularnog matriksa, (3) proliferacija, (4) migracija, (5) ekspresija inflamatornih gena, (6) indukcija oksidativnog stresa, (7) zadržavanje i vezivanje monocita.

1.3. Ćelijski ciklus i antiproliferativni terapijski pristupi u VSMC

Ćelije sisara reaguju na stimulse iz spoljašnje sredine aktivacijom različitih signalnih transdukcionih puteva, koji vode procesima kao što su proliferacija, zaustavljanje rasta, hipertrofija, diferencijacija ili apoptoza (Rivard i sar., 2000).

Migratorne i proliferativne aktivnosti VSMC regulisane su pozitivnim promoterima rasta kao što su PDGF, ET-1, trombin, FGF, IL-1, mehanički stres poput hipertenzije (Dzau i sar., 2002) i negativnim stimulusima proliferacije kao što su heparin sulfat, azot-monoksid (NO), TGF- β (Rivard i sar., 2000).

Međutim, na kraju signalne mreže proliferativnog odgovora VSMC, mitogeni faktori rasta dele isti krajnji signalni put ćelijskog ciklusa (**Slika 1.3.1**). Mirne ćelije iz faze G_0 ulaze u period G1 (engl. "gap"), tokom kojeg se faktori potrebni za sledeću fazu DNK replikacije (S faza), grade.



Slika 1.3.1 Pojednostavljena šema ćelijskog ciklusa sa terapijskim pristupima vaskularnim proliferativnim poremećajima (narandžasto). Objašnjenje u tekstu. Preuzeto i modifikovano iz (Dzau i sar., 2002).

Nakon završene replikacije DNK, ćelija ulazi u drugu „gap” fazu (G2) gde se priprema za fazu mitoze (M faza). Restriktione tačke ćelijskog ciklusa su G1–S i G2–M interfaze koje obezbeđuju pravovremenu progresiju ćelijskog ciklusa (Elledge, 1996). Faze ćelijskog ciklusa koordinisane su sa ciklin-zavisnim kinazama (CDK, engl. “Cyclin Dependent Kinase”) koje formiraju holoenzime sa svojim regulatornim subjedinicama, ciklinima (Koepp i sar., 1999; Sherr, 1995). Aktivnosti ciklin–CDK kompleksa zavisi od fosforilacionog statusa CDK i nivoa ekspresije ciklina. U nastavku, progresija ćelijskog ciklusa regulisana je endogenim inhibitorima ciklin zavisnih kinaza (CKI, engl. “Cyclin Kinase Inhibitor”) kao što su p27^{KIP1} i p21^{CIP1} koji se vezuju za ciklin-CDK komplekse i inhibiraju njihovu aktivnost (Smith i sar., 1997).

Sintetički CDK inhibitori (CVT-313, flavopiridol), genska terapija sa „antisens” oligodeoksiribonukleotidima (ODN) prema CDK/ciklinima i prekomerna ekspresija CKI smanjuju neointimalnu hiperplaziju u eksperimentalnim postavkama ateroskleroze i angioplastične restenoze (Andres i sar., 2003). Najviše rezultata u ispitivanju prevencije stent restenoze ima makrolid rapamicin (Andres i sar., 2003), potentni imunosupresor koji snažno inhibira proliferaciju i migraciju VSMC (Marx i sar., 1995; Poon i sar., 1996; Sun i sar., 2001) preko p27^{KIP1}-zavisnih (Luo i sar., 1996; Sun i sar., 2001) i p27^{KIP1}-nezavisnih mehanizama (Braun-Dullaesus i sar., 2001; Roque i sar., 2001). Sledeći terapijski pristup je primena „mamca“ transkripcionog faktora E2 (E2F, engl. ”E2F decoy”), koji se pokazao kao bezbedna strategija inhibicije ekspresije gena ćelijskog ciklusa i DNK replikacije kod pacijenata sa ugrađenim bajpasom venskog kalema (Mangi i sar., 2001; Mann i sar., 1999). Progresija ćelijskog ciklusa VSMC je regulisana i specifičnim komponentama ECM i integrinima (Assoian i sar., 2001). Neointimalne VSMC sintetišu nove komponente ECM i indukuju ekspresiju MP, koje preoblikuju okružujući ECM. Ekspresija MP je indukovana unutar neointimalnih lezija (Bendeck i sar., 1994; Galis i sar., 1994; Southgate i sar., 1996; Zempo i sar., 1994). Uprkos ohrabrujućim rezultatima, značajni naporu u osnovnim istraživanjima su još uvek preko potrebni, kako bi se identifikovali dodatni ciljni geni i strategije za tretman različitih kardiovaskularnih poremećaja.

1.4. Trombin u aterosklerozi i proliferaciji VSMC

1.4.1. Građa i funkcije trombina u vaskulaturi

Zgrušavanje krvi je proces sekvencijalne aktivacije 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, krvnih pločica, endotelnih ćelija, VSMC i leukocita (Coughlin, 2000; Lane i sar., 2005). Aktivnost trombina je strogo regulisana putem nekoliko endogenih inhibitornih mehanizama, kao što su antitrombin-heparinski put i signalni put proteina C (Mann i sar., 2003).

Prekursorski protein, protrombin (faktor koagulacije II), sintetise se samo u jetri u inaktivnoj formi zimogena, sa prosečnim poluzivotom od 72h u cirkulaciji (Andrew i sar., 1987). Signal za stvaranje trombina pokreće se kada cirkulišući faktori koagulacije dođu u kontakt sa ekstravaskularnim tkivnim faktorom (na primer u slučaju povrede i razaranja endotelijskog sloja krvnog suda). Aktivirani faktor X zajedno sa aktiviranim kofaktorom V prevodi protrombin u aktivnu formu, trombin (Brass i sar., 1997; Esmon i sar., 1999). Pošto je tkivni faktor eksprimiran samo na površini ćelija koje u fiziološkim uslovima nisu u kontaktu sa krvlju (kao što su VSMC), za trombin je pretpostavljeno da predstavlja vezu između povrede tkiva i zarašćivanja rana (Borissoff i sar., 2009), odnosno da ima važnu ulogu u vaskularnom remodelovanju.

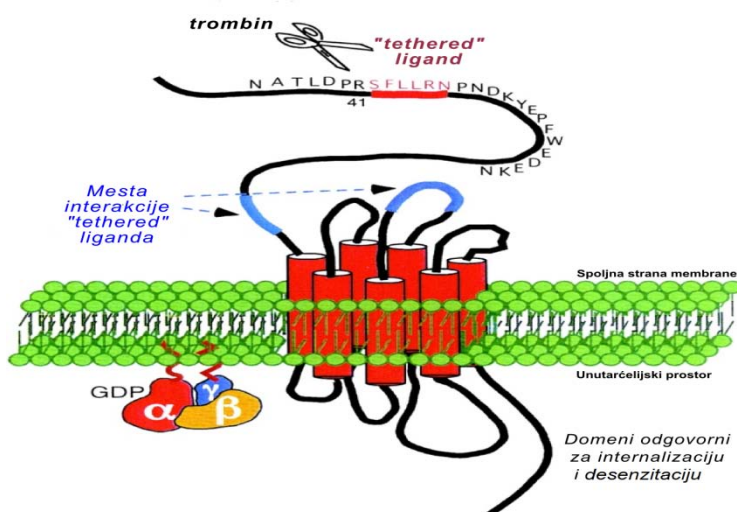
Uloga trombina u hemostazi je dvojaka i kontradiktorna. S jedne strane pretvaranje fibrinogena u fibrin predstavlja prokoagulantnu radnju, a vezivanje za protein C i njegovo subsekventno aktiviranje, antikoagulantnu funkciju (Lane i sar., 2005). Slično ponašanje trombin pokazuje u vaskularnoj reaktivnosti gde on iskazuje kako vazodilatatorne (Hamilton i sar., 2000) tako i vazokonstriktorne efekte (Hirano, 2007; Maki i sar., 2010).

Reakcije koje trombin potiče na ćelijskom nivou uključuju aktiviranje krvnih pločica i njihovu agregaciju, hemotaktički efekat na monocite (Bar-Shavit i sar., 1983), VSMC (Kalmes i sar., 2000), endotelne ćelije (Moy i sar., 1996), limfocite (Coughlin, 2000) i neutrofile (Bizios i sar., 1986). Mitogeni efekat trombina dokumentovan je u VSMC (McNamara i sar., 1993), fibroblastima (Carney i sar., 1992; Giacco i sar., 2006), endotelnim ćelijama (Zania i sar., 2008) i astrocitima (Wang i sar., 2002). U endotelnim ćelijama trombin stimuliše proizvodnju brojnih faktora: prostaciklina (Hallam i sar., 1988), faktora aktivacije krvnih pločica (PAF, engl. "Platelet-Activating Factor") (Prescott i sar., 1984), ET-1 (Schini i sar., 1989), von Willebrandovog faktora (Sporn i sar., 1989), aktivatora plazminogena (PA) (Levin i sar., 1984) i njegovog inhibitora (PAI, engl. "Plasminogen Activator Inhibitor") (Levin i sar., 1984). Ovi raznoliki ćelijski odgovori pokrenuti trombinom doprinose patologiji ateroskleroze, tromboze i drugih vaskularnih oboljenja putem inflamatornih i proliferativnih procesa na mestu vaskularne povrede (Borissoff i sar., 2009; Martorell i sar., 2008).

1.4.2. Struktura trombinskih receptora

Receptori aktivirani proteinzama (PAR, engl. “**P**rotease-**A**ctivated **R**eceptor”) pripadaju familiji receptora 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, -2, -3 i -4, s tim da su PAR-1, PAR-3 i PAR-4 trombinski receptori (Martorell i sar., 2008). Trombin prepoznaje amino kraj svog receptora i proteolitički ga cepa, generišući novi amino kraj sa funkcijom liganda, tzv. (engl. “tethered ligand”) (Slika 1.4.2.1).

Drugi važni domeni PAR-1 i PAR-3 trombinskih receptora su aminoterminalni hirudinu-sličan domen, takođe važan za vezivanje trombina i karboksilni kraj koji ima ulogu u usmeravanju internalizovanog receptora u lizozomsko odeljenje radi degradacije (Coughlin, 2000). Treća intracelularna petlja trombinskih PAR receptora doprinosi mehanizmu internalizacije receptora unutar ćelije (Vu i sar., 1991).



Slika 1.4.2.1 Šematski prikaz strukture trombinskog PAR receptora. Preuzeto i modifikovano od (Brass, 2003).

1.4.2.1. Molekularni mehanizam aktivacije PAR-1 receptora i njegove signalizacije

Trombin proteolitički cepa i aktivira PAR-1 sa visokom efikasnošću. Već jedan minut nakon aplikacije trombina od 10 nM skoro svi trombinski receptori na površini ćelije su aktivirani (Coughlin, 2000; McNamara i sar., 1993). Nakon vezivanja za dva specifična mesta na amino kraju trombin podleže konformacionoj promeni i izlaže

aktivno mesto sa katalitičkom trijadom (His³⁶⁵, Asp⁴¹⁹ i Ser⁵²⁷), odgovornom za sistem prenosa naelektrisanja (Bahou WF, 2003; Coughlin SR, 2000), što dovodi do efikasnog i trenutnog proteolitičkog cepanja aminoterminalnog kraja (**Slika 1.4.2.1**).

Kod ćelija u mirovanju, PAR su povezani sa heterotrimernom G_q familijom G proteina, koja se sastoji od tri različite subjedinice nazvane α , β , i γ (G $\alpha\beta\gamma_q$). Nakon aktiviranja PAR-1 receptora delovanjem trombina, vezani GDP se izmenjuje sa GTP što rezultira u disocijaciji $\beta\gamma$ od α subjedinice, aktivirajući signalne puteve inozitol-1,4,5-trifosfaat (IP₃) i diacilglicerola (DAG), kao i oslobađanje intracelularnog Ca²⁺. PAR-1 aktivacija takođe vodi aktivaciji PKC, MAPK kinaza, receptorske tirozin kinaze (RTK) i Rho kinaze koja fosforiliše laki lanac miozina u signalnom putu uključenom u promene strukture citoskeleta i ćelijskog oblika VSMC (Kahn i sar., 1998; van Nieuw Amerongen i sar., 2000). Druga signalna grana aktivacije PAR-1 receptora uključuje G α_i subjedinicu koja inhibira adenil ciklazu, sprečavajući pretvaranje ATP u cAMP (Zhang i sar., 2007b).

1.4.3. Uloga trombina u aterosklerozi

Endotelna disfunkcija, koju karakteriše nesposobnost endotela da reguliše svoje osnovne funkcije (tonus krvnog suda, hemostazu, ćelijsku adheziju, balans elektrolita), smatra se preduslovom za nastanak aterosklerotskog plaka, a trombin, jednim od njenih ključnih okidača (Borissoff i sar., 2009). Događaji poput vazokonstrikcije preko sekrecije prostaglandina H₂ i tromboksana A₂ (Hirano, 2007), smanjenja dostupnosti NO usled smanjene aktivnosti eNOS (Watts i sar., 2009), smanjene sinteze eNOS (Ming i sar., 2002) i povećanje aktivnosti arginaze (Lewis i sar., 2008; Yang i sar., 2006), samo su neki od mnogih efekata kojim se objašnjava ključna uloga trombina u endotelnoj disfunkciji. Tokom ateroskleroze nivo trombina je izrazito povećan (Husmann i sar., 2007).

Pod uticajem trombina povećava se proizvodnja reaktivnih vrsta kiseonika (ROS, engl. “**R**eactive **O**xygen **S**pecies”) u zidu krvnog suda (Brandes i sar., 2001; Colotta i sar., 1994) što olakšava lipidnu peroksidaciju i inicijaciju apoptotičnih procesa. Trombin indukuje proizvodnju pro-inflamatornih medijatora, uzrokujući promene u transkripciji gena za interleukine IL-1 β , IL-6 (Tokunou i sar., 2001) i faktor

nekroze tumora alfa (TNF- α) i MCP-1 u VSMC (Kranzhofer i sar., 1996), dok u endotelu povećava ekspresiju IL-6 (Marin i sar., 2001b), IL-8 (Marin i sar., 2001a), MCP-1, VCAM-1 i ICAM-1, itd., što olakšava regrutovanje cirkulišućih monocita i T limfocita u zidove arterija (Colotta i sar., 1994) i doprinosi stvaranju ranih plakova. Većina pomenutih aktivnosti trombina posredovana je receptorima za trombin (Martorell i sar., 2008).

Trombin takođe, posreduje u adheziji leukocita, njihovom kotrljanju (engl. “rolling of leukocytes”) i migraciji u aktivirani endotel (Borissoff i sar., 2009). U ovom procesu transmigracije leukocita, trombin utiče na povećanje oslobađanja Ca²⁺ iz intracelularnih skladišta (Sandoval i sar., 2001), što pomaže ligaciji ICAM-1 (van Nieuw Amerongen i sar., 2007), a sve ovo dalje vodi do raskidanja veza među ćelijama endotela (Delekta i sar., 2010; van Nieuw Amerongen i sar., 2008).

Kod monocita i makrofaga u aterosklerozi, trombin dovodi do povećanja ekspresije IL-1 β , IL-6 i TNF- α i MCP-1, pri višim koncentracijama nego u VSMC (Kranzhofer i sar., 1996).

Proces neoangiogeneze usko je povezan sa procesom progresije plaka krvnih sudova. Krvarenje unutar plaka smatra se kritičnim faktorom destabilizacije i vezano je predominantno za neovaskularizaciju *tunica intima* i *media* od strane nezrelih i „curećih” kapilara (Virmani i sar., 2005). Za trombin je pokazano da izaziva neoangiogenezu kako u *in vitro*, tako i u *in vivo* uslovima (Haralabopoulos i sar., 1997).

U odmakloj, naprednoj aterosklerotskoj leziji najznačajniji efekat trombina je aktivacija krvnih pločica, koja vodi daljoj inflamatornoj kaskadi i proizvodnji raznih aktivatora i faktora rasta od strane krvnih pločica. Tako aktivirani trombociti stimulišu nuklearni faktor κ B (NF- κ B) signalni put u VSMC, koji indukuje ekspresiju MMP, citokina i faktora rasta (Henn i sar., 1998), kao i MCP-1 (Gawaz i sar., 1998) što rezultuje u snažnoj proliferaciji i migraciji VSMC u aterosklerotsku leziju (Lutgens i sar., 2007). Svi ovi procesi zajedno doprinose progresiji plaka, potom njegovoj destabilizaciji i na kraju rupturi (Yu i sar., 2005), o čemu svedoče i *in vivo* nalazi (Bea i sar., 2006; Westrick i sar., 2001).

1.4.4. Uloga trombina u proliferaciji VSMC

Trombin je uključen u abnormalnu proliferaciju VSMC povezanu sa aterosklerozom i hipertenzijom (Doran i sar., 2008; Galis i sar., 1994; Isenovic i sar., 2010a; Isenovic i sar., 2010b; Marche i sar., 1990; McNamara i sar., 1996). Osim što posredno doprinosi fenotipskoj modulaciji, migraciji i proliferaciji VSMC, interakcijom sa drugim ćelijama kao što trombociti koji luče PDGF, snažan mitogen VSMC (Shankar i sar., 1994), trombin i direktno dovodi do proliferacije i migracije VSMC (Fager, 1995; Kalmes i sar., 2000; Kanda i sar., 2001; McNamara i sar., 1996; McNamara i sar., 1993).

Za VSMC je poznato da eksprimiraju trombinske PAR-1 i PAR-4 receptore, kao i PAR-2. Dominantni receptor preko koga trombin ostvaruje svoju mitogenu ulogu u VSMC je PAR-1 (Hsieh i sar., 2009). Pozitivna regulacija PAR-1 u VSMC u *in vivo* uslovima je pokazana nakon oslobađanja TGF- β_1 , PDGF i serotonina iz krvnih pločica (Schini-Kerth i sar., 1997) i veoma je važna za dalje direktne efekte trombina na proliferaciju i migraciju VSMC (Borisoff i sar., 2009).

Vezivanje trombina za receptore u VSMC dovodi do stimulacije fosfolipaze C, što rezultuje u povećanju intracelularnog nivoa Ca^{2+} i aktivaciji PKC (Bobe i sar., 2003; Lin i sar., 2001; McNamara i sar., 1996). Veliki broj studija je pokazao da je neophodan signalni korak transaktivacija EGFR od strane PAR-1 aktiviranog trombinom u proliferaciji VSMC u *in vitro* uslovima (Daub i sar., 1996; Kalmes i sar., 2000; Kanda i sar., 2001; Prenzel i sar., 1999).

Takođe, u brojnim radovima pokazano je učešće MAPK kaskade u proliferaciji VSMC pod delovanjem trombina, kao što su ERK1/2, p38 kinaza i PI3K/Akt kaskada (Hsieh i sar., 2009; Isenovic i sar., 2008; Kanda i sar., 2001; Lin i sar., 2002). Iz literaturnih radova može se primetiti da je nedovoljno rasvetljena uloga EGFR transaktivacije u aktivaciji MAPK kinaza i sledstvenoj proliferaciji VSMC pod delovanjem trombina. S jedne strane, radovi govore u prilog kritične uloge EGFR aktivacije potrebne za aktiviranje ERK1/2 kinaze (Hsieh i sar., 2008; Hsieh i sar., 2009; Kalmes i sar., 2000; Yin i sar., 2005), a drugi da postoje i putevi aktivacije ERK1/2 nezavisni od aktivacije EGFR (Bobe i sar., 2003; Yin i sar., 2005). Rezultati Hsieh i saradnika su pokazali da je pored aktivacije ERK1/2 kinaznog puta, takođe uključena i

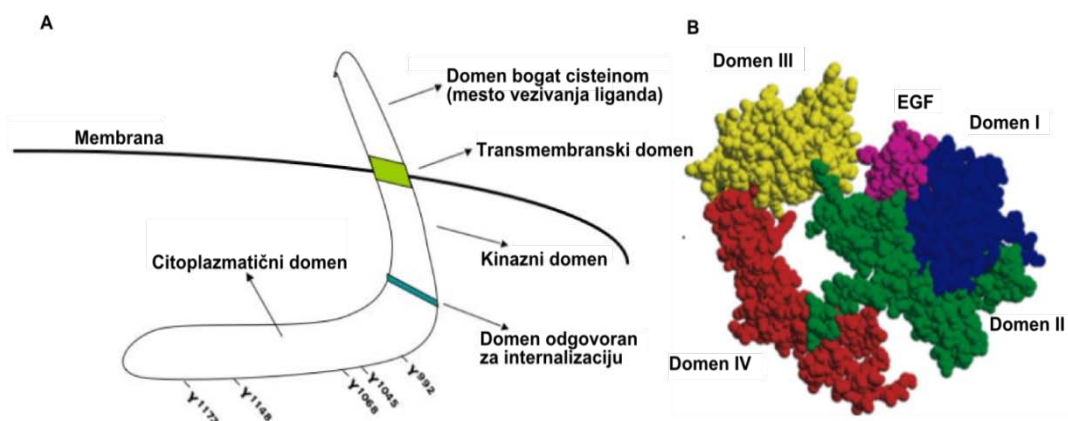
aktivacija PI3K/Akt kaskade u sprovođenju mitogenog signala od aktiviranog PAR-1 i transaktiviranog EGFR. Takođe, pokazana je i uloga NF- κ B i AP-1 u ekspresiji EGFR u VSMC pacova (Hsieh i sar., 2009). U signalnoj mreži transaktivacije EGFR i proliferacije VSMC pod delovanjem trombina, važno mesto zauzima i PKC δ , za koju je pokazano da predstavlja uzvodni signal EGFR transaktivacije (Hsieh i sar., 2009; Smiljanic i sar., 2011).

U VSMC pacova i PC3 ćelijama kancera prostate u *in vitro* uslovima pokazano je da trombin posreduje u ćelijskoj proliferaciji, transaktivacijom EGFR preko MP koja cepa membranski prekursor HB-EGF, (pro-HB-EGF) i oslobođeni HB-EGF se vezuje i aktivira EGFR (Bobe i sar., 2003; Isenovic i sar., 2010a; Prenzel i sar., 1999; Smiljanic i sar., 2011). Ovaj mehanizam je takođe demonstriran kod VSMC pacova i babuna i neophodan je za migraciju VSMC stimulisanu trombinom (Kalmes i sar., 2000).

1.5. EGFR i transaktivacija EGFR

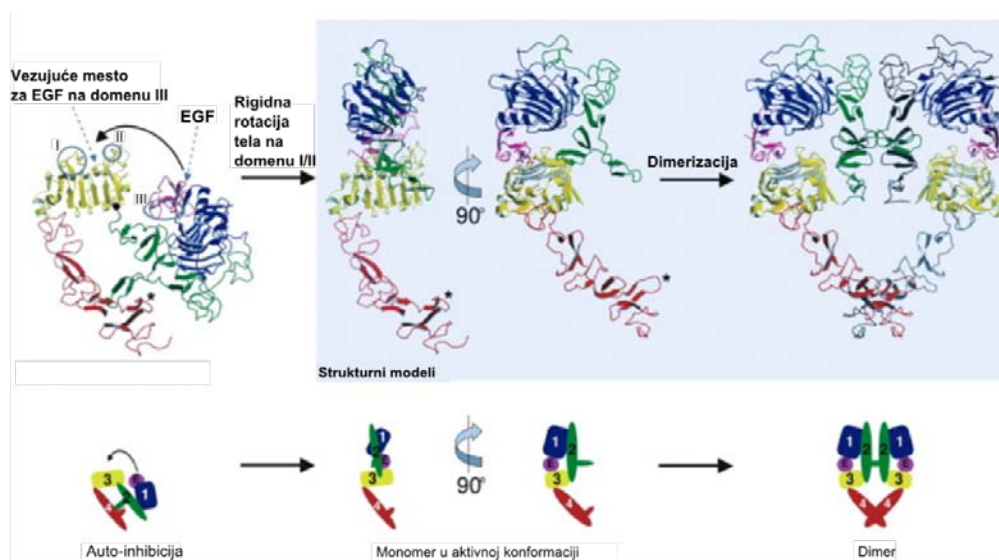
EGFR je jedan od četiri visoko srodna člana ErbB familije RTK (Yarden i sar., 2001). Genski simbol, ErbB, potiče od imena viralnog onkogeno sa kojima su ovi receptori homolozi (engl. “**E**rythroblastic Leukemia Viral Oncogene”). U fiziološkim uslovima za EGFR se vezuju sledeći članovi familije epidermalnih faktora rasta: epidermalni faktor rasta (EGF, engl. “**E**pidermal **G**rowth **F**actor”), TGF- α , HB-EGF, amfiregulin, epiregulin, betacelulin i epigen (Dreux i sar., 2006; Olayioye i sar., 2000). Poremećaj u mehanizmu ErbB signalizacije kod ljudi je povezan sa razvojem neurodegenerativnih bolesti, poput multiple skleroze i Alchajmerove bolesti (Bublil i sar., 2007), a njegova povišena ekspresija dokumentovana je u više vrsta tumora (Kohler i sar., 1989; Libermann i sar., 1985; Yoshida i sar., 1994).

EGFR je jednolančani transmembranski glikoprotein od 170 kDa i 1186 aminokiselina, sa mnoštvom N-glikozilovanih oligosaharidnih komponenti (približno 40 kDa) (**Slika 1.5.1**). Sastoji se od ekstracelularnog dela koji ima četiri domena (I i III odgovorni za specifičnost receptora ka ligandu, a II i IV su bogati cisteinom) (**Slika 1.5.1**), transmembranskog alfa heliksa i citoplazmatskog dela koji sadrži kinazni domen (Dreux i sar., 2006).



Slika 1.5.1 (A) Šematski prikaz celovite strukture monomernog neaktivnog molekula EGFR. (B) Trodimenzionalni model ektodomena EGFR za koji je vezan EGF. Preuzeto sa sajta: (http://en.wikipedia.org/wiki/File:EGF_Receptor.jpg).

Transdukcija signala započinje kada se ligand veže za vanćelijski deo EGFR, što vodi ka dimerizaciji, odnosno rearanžmanu monomera u već postojećem dimeru (Adak i sar., 2011; Jiang i sar., 1999; Schlessinger i sar., 2000). U aktivnom dimeru domeni dve tirozinske kinaze idealno su orijentisani da dovedu do uzajamne fosforilacije i aktivacije (Slika 1.5.2) (Ferguson i sar., 2003).



Slika 1.5.2 Šematski prikaz vezivanja EGF za EGFR receptor. Vezivanje EGF dovodi do konformacionih promena i dimerizacije receptora što rezultuje u aktivaciji tirozin kinaznih domena EGFR dimera. Preuzeto i modifikovano iz (Ferguson i sar., 2003).

Događaj koji još uvek privlači veliku pažnju naučne javnosti je upravo transaktivacija EGFR odnosno posredna aktivacija EGFR preko aktivacije GPCR. Prvi korak GPCR indukovane transaktivacije EGFR poznate još i kao „trostruko prelazeća membranska kaskada (engl. “triple membrane passing cascade”) je direktna uključenost sekundarnih glasnika i/ili signalnih puteva pod delovanjem sekundarnih glasnika kao što je povećanje intracelularnog nivoa Ca^{2+} (Eguchi i sar., 2001; Zwick i sar., 1997), aktivacije PKC (Frank i sar., 2003; Hsieh i sar., 2009; Isenovic i sar., 2010a; Smiljanic i sar., 2011) ili proizvodnje ROS (Frank i sar., 2003). Drugi korak predstavlja uključenje ne-receptorskih tirozin kinaza kao što su c-Src i prolinom bogate tirozin kinaze Pyk2 (Andreev i sar., 2001; Bobe i sar., 2003; Luttrell i sar., 1997). Poslednji u nizu, treći događaj, je proteolitičko cepanje EGFR liganda (engl. “ligand shedding”) od strane aktivirane MP (Eguchi i sar., 2001; Prenzel i sar., 1999) koji se vezuje za EGFR i na taj način ga aktivira.

Mnoge studije su ukazale da aktivacija EGFR vodi širokom spektru bioloških odgovora, uključujući proliferaciju i inflamaciju (Dreux i sar., 2006; Wahl i sar., 1987; Woodworth i sar., 2005). EGFR su identifikovani u humanim aterosklerotskim plakovima imunocitohemijskim putem (Tamura i sar., 2001). U kulturi VSMC poreklom iz aorte pacova pokazano je učešće EGFR u ćelijskoj proliferaciji i DNK sintezi (Nanney i sar., 1988; Tomita i sar., 1986). Centralna uloga EGFR u proliferaciji VSMC dokumentovana je u brojnim studijama, sa mnogim faktorima rasta uključujući i trombin. Međutim, može se primetiti da je nedovoljno rasvetljena veza EGFR aktivacije i proliferacije VSMC. Većina dosadašnjih radova ukazuje na to da bez aktivacije EGFR nema ni proliferacije VSMC (Hsieh i sar., 2009; Reynolds i sar., 2002). Ali postoje i radovi koji ukazuju da je aktivacija ovog receptora važna ali ne i neophodna za proces proliferacije VSMC (Schreier i sar., 2011; Smiljanic i sar., 2011). Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se razrešila ova dilema imajući u vidu i različitu biologiju samog EGFR receptora u fenotipskim modulacijama VSMC (Ivanov i sar., 2006).

1.5.1. Uloga HB-EGF u aktivaciji EGFR i proliferaciji VSMC

HB-EGF je član familije EGF faktora rasta i sintetiše se kao transmembranski prekursor od 208 aminokiselina (pro-HB-EGF), poznat i kao receptor za toksin difterije,

koji nakon proteolitičkog cepanja od strane metaloproteinaze, postaje zreo, solubilisan EGFR ligand od 86 aminokiselina (Prenzel i sar., 1999; Raab i sar., 1997). Od njegovog pronalaska 1991. godine, smatran je važnim činiocem u nastanku ateroskleroze, hipertrofije miokarda, zarašćivanju rana o čemu svedoče brojne studije (Asakura i sar., 2002; Matsumoto i sar., 2002; Miyagawa i sar., 1995). HB-EGF je eksprimiran u VSMC, makrofazima, T limfocitima i endotelnim ćelijama, a pokazao se i kao faktor proliferacije glatkih mišićnih ćelija i fibroblasta (Dluz i sar., 1993; Higashiyama i sar., 1991; Nakano i sar., 1994; Raab i sar., 1997).

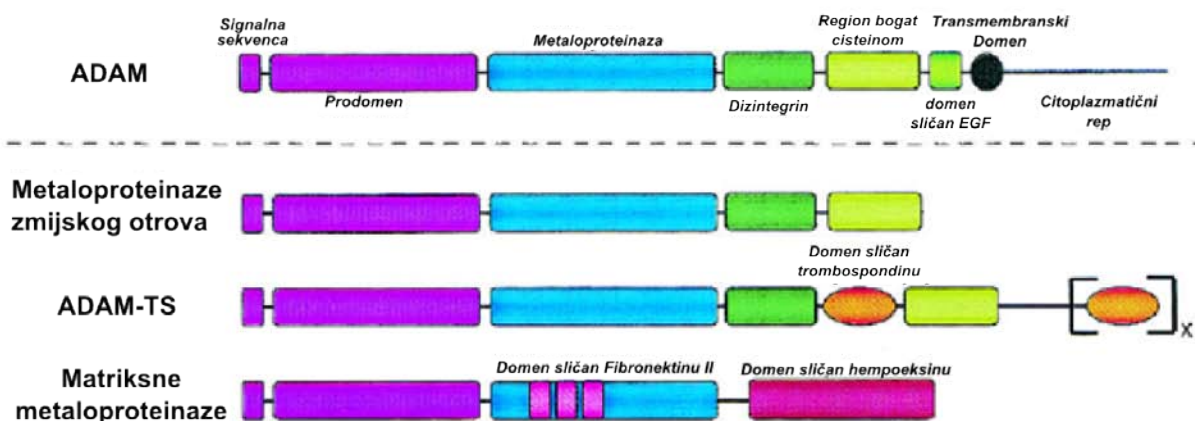
Pod dejstvom heparina blokira se HB-EGF zavisna transaktivacija EGFR i sledstvena migracija VSMC pacova i babuna pod delovanjem trombina (Kalmes i sar., 2000). HB-EGF je takođe aktiviran (odcepljen) kao odgovor na aktivaciju PKC sa forbol estrima (npr., TPA) (Gechtman i sar., 1999). Smatra se da je PKC δ kao enzim, odgovoran za stimulaciju HB-EGF cepanja izazvan TPA aktivacijom (Izumi i sar., 1998).

Dominantni ligand detektovan u kulturi VSMC kao ligand aktivacije EGFR i proliferacije VSMC stimulacijom sa GPCR agonistima, jeste HB-EGF (Kalmes i sar., 2001; Prenzel i sar., 1999). Mnoštvo literaturnih nalaza govori u prilog uloge HB-EGF u proliferaciji VSMC, aktivacijom EGFR sa raznim GPCR agonistima uključujući trombin, ANG II, ET-1, ATP, itd. (Asakura i sar., 2002; Dreux i sar., 2006; Ohtsu i sar., 2006b; Reynolds i sar., 2002). HB-EGF-indukovana proliferacija uključuje aktivnost ERK1/2 kinaze i PI3/Akt kinaze ali ne i p38 kinaze (Reynolds i sar., 2002). Postoji radovi o učešću HB-EGF u transaktivaciji EGFR i proliferacije VSMC pod delovanjem trombina (Hsieh i sar., 2009; Kalmes i sar., 2000) ali se do skora nije znalo koje su MP uljučene u proteolitičko cepanje HB-EGF (Huang i sar., 2009; Smiljanic i sar., 2011).

1.5.2. Uloga MMP u transaktivaciji EGFR i proliferaciji VSMC

MMP i ADAM pripadaju „metzincinskoj” grupi superfamilije cink zavisnih metaloproteinaza koju čini pet grupa podeljenih na osnovu primarne strukture katalitičkog mesta (Hooper, 1994). „Metzincinska“ grupa kojoj pripadaju MMP i ADAM, sadrži još dve podgrupe MP: seralizinke i astacinske MP (Stocker i sar., 1995).

MMP su poznate i kao kolagenaze, uglavnom su solubilne i nalaze se u blizini ili na površini ćelija, mada postoje i transmembranske forme MMP (**Slika 1.5.2.1**). Ovi enzimi su odgovorni za degradaciju i remodeliranje ECM, igraju važnu ulogu u razviću, zarastanju rana i nastanku oboljenja kao što su ateroskleroza, artritis i kancer (Chang i sar., 2001; Newby, 2006).



Slika 1.5.2.1 Topograski prikaz domenskih struktura ADAM i MMP. Prikazana MMP odgovara potklasi želatinaza; druge MMP potklase nemaju hemopeksinu sličnu sekvencu i /ili fibronektinu II sličnu sekvencu. ADAM sa trombospondinu sličnim domenima (ADAM-TS) sadrži i varijabilni broj domena sličnih trombospondinu. Preuzeto i modifikovano iz (Seals i sar., 2003).

VSMC proizvode čitav spektar solubilnih i membranskih MMP (MMP-1,-2,-3,9,11,13, i membranska MT1-MMP), neke konstitutivno a neke kao odgovor na istezanje, povredu ili delovanje faktora rasta (Lutgens i sar., 2007; Newby, 2006). Analiza humanih aterosklerotskih lezija i naprednih plakova pokazala je visoku ekspresiju MMP posebno želatinaza MMP-2 i MMP-9, prevashodno od strane VSMC (Galis i sar., 1994; Li i sar., 1996).

MMP regulišu migraciju, proliferaciju i smrt VSMC degradacijom komponenti ECM i drugih supstrata (Newby, 2006). One su uveliko odgovorne za promenu (engl. “switch”) fenotipa VSMC iz tihog, mirnog u migratorni (Risinger i sar., 2006). Jasno je da MMP posreduju u migraciji VSMC u *in vivo* i *in vitro* uslovima, dok je uloga MMP u proliferaciji VSMC još uvek nedovoljno razjašnjena (Newby, 2006). Inhibicija MMP blokirala je proliferaciju glatkih mišićnih ćelija traheja u odgovoru na serum, trombin i PDGF (Johnson i sar., 1999), proliferaciju VSMC iz komadića tkiva aorte (tzv. eksplanti aorte) (Bendeck i sar., 1994), VSMC proliferaciju *in vivo* (Kenagy i sar.,

1997; Zempo i sar., 1996), MMP-2-posredovanu VSMC migraciju nakon kateterizacije balonom (Bendeck i sar., 1994; Cheng i sar., 1998; Jenkins i sar., 1998), i nastanak neointimalnog zadebljanja (Cheng i sar., 1998). Većina radova pokazala je inhibiciju proliferacije VSMC sa sintetičkim MMP inhibitorima u *in vitro* uslovima (Lovdahl i sar., 2000; Southgate i sar., 1992; Uglow i sar., 2003), ali neke i nisu (Zempo i sar., 1996). Dalja istraživanja u ovom pravcu su potrebna kako bi se doprinelo objašnjenju uloge i mehanizma učešća MMP u proliferaciji VSMC sa naglaskom na ulogu MMP-2.

1.5.3. Uloga ADAM u transaktivaciji EGFR i proliferaciji VSMC

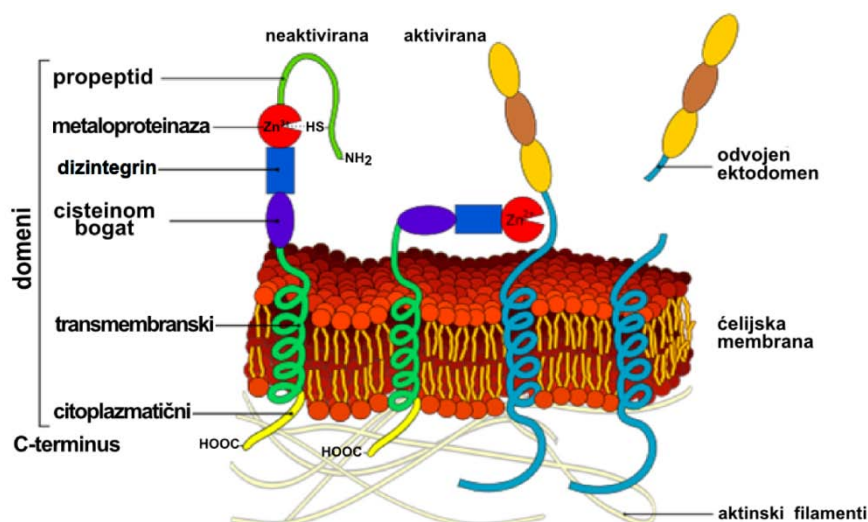
ADAM su transmembranske metaloproteinaze koje pripadaju adamalizinjskoj grupi i razlikuju se od MMP po tome što imaju vanćelijski deo sa dizintegrinskim domenom i citoplazmatski domen koji može da stupa u interakciju sa unutarćelijskim proteinima (**Slika 1.5.3.1**). Adamalizinjska grupa takođe sadrži i klasu III metaloproteinaza zmijskog otrova i podgrupu ADAM-TS, koja je se od ADAM familije razlikuje po tome što sadrži trombospondinu slične domene (Seals i sar., 2003) (**Slika 1.5.2.1**).

ADAM su uključene u važne procese kao što su: proteoliza membranskih prekursora faktora rasta i citokina, degradacija ECM i odsecanje drugih membranskih proteina uključujući i obradu priona (Huovila i sar., 2005). Pored ADAM i neke MMP mogu odcepiti membranske proteine i proizvoditi ligande za aktivaciju EGFR (Seals i sar., 2003). ADAM, kao i MMP su osetljive na endogene, tkivne inhibitore metaloproteinaza (TIMP, engl. “**T**issue **I**nhibitor of **M**etaloproteinases”) (Seals i sar., 2003).

Do sada je opisano 35 ADAM molekula iz raznih vrsta. Kod čoveka opisano je 19 od kojih ADAM-9, -10, -12, -15, -17 i -19 su uključene u EGFR transaktivaciju u VSMC stimulacijom ograničenog broja GPCR agonista (Ohtsu i sar., 2006a).

Malo je literaturnih podataka o ulozi članova ADAM familije u proliferaciji VSMC. U *in vitro* uslovima pokazano je da ADAM-17 transaktivira EGFR i dovodi do proliferacije VSMC u kulturi (Ohtsu i sar., 2006b). Takođe, i u *in vivo* uslovima, ADAM 17 dovodi do aktivacije EGFR i subsekventne neointimalne hiperplazije nakon povrede krvnog suda delovanjem ANG II (Takaguri i sar., 2011b).

ADAM 12 učestvuje u proliferaciji hondrocita proteolitičkim cepanjem proteina 5 koji vezuje insulinu sličan faktor rasta (IGFBP5) u osteoartritičnoj hrskavici (Okada i sar., 2008). Zatim, visoko pojačana selektivna ekspresija ADAM 12 u ćelijama glioblastoma povezuje se sa ćelijskom proliferacijom i proteolitičkim cepanjem HB-EGF (Kodama i sar., 2004). Asakura i saradnici (2002) sugerisali su da je ADAM-12 učesnik HB-EGF otcepljivanja (engl. “shedding”) i hipertrofije miokarda pod delovanjem fenilefrina, ANG II i ET-1. Međutim do skora nije bilo objavljenog rada o ulozi ADAM 12 u proliferaciji VSMC. Prvi izveštaj o identitetu i učešću ADAM molekula u transaktivaciji EGFR i proliferaciji VSMC, odsecanjem HB-EGF, pod delovanjem trombina, objavila je naša grupa (Smiljanic i sar., 2011).



Slika 1.5.3.1 Šematski prikaz strukture ADAM molekula. Preuzeto i modifikovano sa sajta: (http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Shedding_01.svg).

1.6. Uloga PKCδ u proliferaciji VSMC

PKC su familija serin i treonin specifičnih proteinskih kinaza koje mogu biti aktivirane sa Ca²⁺, fosfolipidima i DAG. Članovi PKC familije fosforilišu širok spektar proteinskih „meta“ i poznate su po učešću u širokom spektru ćelijskih događaja, poput ćelijske adhezije, transformacije, kritičnih tačaka ćelijskog ciklusa i kontrole ćelijske zapremine (Mellor i sar., 1998). Svaki član PKC familije ima poseban ekspresioni profil i ima različitu ulogu u ćelijama. Kod sisara, PKC familija kinaza podeljena je na 4 grupe na osnovu strukturnih i funkcionalnih razlika njihovih regulatornih domena:

klasične izoforme (PKC α,β,γ), nove izoforme (PKC $\delta,\epsilon,\eta,\theta$), atipične izoforme (PKC ζ,λ) i kinaze slične PKC kinazama (PKN1,2,3) (Rosse i sar., 2010).

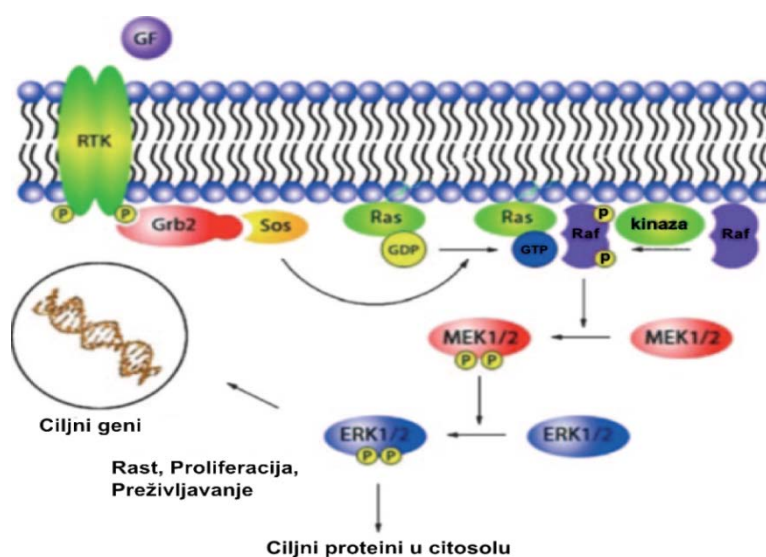
Najprisutnija, najviše eksprimirana izoforma PKC u humanim i pacovskim VSMC je PKC δ (Assender i sar., 1994; Fukumoto i sar., 1997), mada su prisutne i PKC α,β i ϵ (Ding i sar., 2011). Za razliku od klasičnih PKC koje su aktivirane vezivanjem DAG, fosfolipida i Ca²⁺ za odgovarajuće domene, PKC δ nije direktno aktivirana sa Ca²⁺ jer nema Ca²⁺-vezujući domen (Mellor i sar., 1998).

PKC učestvuje u proliferaciji glatkih mišićnih ćelija traheje čoveka i psa pod delovanjem trombina (Lin i sar., 2001; Lin i sar., 2002). PKC δ , član podgrupe novih PKC kinaza (Mellor i sar., 1998), do skora je bila uključena samo u negativnu regulaciju proliferacije i apoptoze u velikom broju ćelijskih linija i tumorskih ćelija, noseći atribut tumorskog supresora (Grossoni i sar., 2007; Yamaguchi i sar., 2007). Prvi izveštaj o pozitivnoj mitogenoj ulozi PKC u mlčnim ćelijama pacova objavili su Grossoni i saradnici (2007). Nedavno, Hsieh i sar. (2009), a potom i Smiljanić i sar. (2011) su ukazali na pozitivno učešće PKC u proliferaciji VSMC pacova stimulisanih trombinom, ali je ostala nerazjašnjena precizna uloga i mehanizam učešća ove kinaze u kompleksnoj mreži proliferativnog odgovora VSMC pod delovanjem trombina.

1.7. Uloga MAPK u proliferaciji VSMC

MAPK su familija serin (Ser)/treonin (Thr) protein kinaza, koje učestvuju u regulaciji više signalnih puteva uključenih u osnovne ćelijske procese kao što su rast, proliferacija, diferencijacija i ćelijski opstanak (Isenovic i sar., 2009b; Isenovic i sar., 2010a; Lewis i sar., 1998; Seger i sar., 1995). U osnovi signalnih puteva MAPK su tri kinaze: MAPK kinaze kinaza (MAPKKK; MEKK tj. MEK kinaza; Raf) koja fosforiliše i aktivira MAPK kinazu (MAPKK; MEK; MKK), koja zatim aktivira MAPK (Chang i sar., 2001) (**Slika 1.7.1**). Postoji najmanje pet različitih signalnih puteva MAPK nazvanih po specifičnoj MAPK sa kojom je povezan (Lewis i sar., 1998; Yap i sar., 2011). Najvažnije su izoforme MAPK od 42 i 44 kDa, poznate i kao ERK1/2, c-Jun N-terminalna kinaza (JNK/SAPK, engl. “c-Jun N-Terminal Kinases/Stress-Activated Protein Kinase”) i p38 kinaza.

Aktivacija signalnih puteva MAPK uključuje male GTP hidrolaze, tzv., male GTP vezujuće proteine (Ras, engl. “**R**at **s**arcoma”), koja regrutuje Raf kinazu u membranu, što dovodi do fosforilacije i aktivacije ERK1/2 (Minden i sar., 1994), (**Slika 1.7.1**). Za punu aktivnost ERK1/2 neophodna je fosforilacija na dva aminokiselinska mesta: Thr²⁰² i Tyr²⁰⁴ za ERK1 i Thr¹⁸³ i Tyr¹⁸⁵ na ERK2. Aktivirana ERK1/2 zatim može da fosforiliše različite Ser/Thr ostatke više od 50 različitih citosolnih i nuklearnih proteina i transkripcionih faktora i time utiče na ekspresiju gena koji vode povećanju proliferacije, diferencijacije i preživljavanja ćelije (Taniguchi i sar., 2006; Yap i sar., 2011), (**Slika 1.7.1**).



Slika 1.7.1 Šematski prikaz aktivacije Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2 kaskade. Grb2 - adaptorni protein Grb-2 (engl. “**G**rowth factor **R**eceptor **B**ound protein-2”); Sos -faktor izmene nukleotida Sos - (engl.”**S**on of **S**evenless”); Ras – mali GTP vezujući protein. Preuzeto i modifikovano iz (Yap i sar., 2011).

Od tri MAPK, pokazano je da ERK1/2 i p38 kinaze imaju aktivnu ulogu u prenosu signala faktora rasta i proliferaciji VSMC (Force i sar., 1998; Kanda i sar., 2001). Znatno je više objavljenih rezultata o učešću ERK1/2 nego p38 u transaktivaciji EGFR i subsekventnoj proliferaciji VSMC (Bobe i sar., 2003; Brandes i sar., 2001; Hsieh i sar., 2009; Huang i sar., 2009; Isenovic i sar., 2008; Kalmes i sar., 2000; Molloy i sar., 1996).

S jedne strane, postoje radovi koji govore u prilog kritične uloge aktivacije EGFR potrebne za aktiviranje ERK1/2 kinaze (Hsieh i sar., 2008; Hsieh i sar., 2009; Kalmes i sar., 2000; Yin i sar., 2005), a takođe postoje i radovi koji ukazuju da se MAPK signalni

put može aktivirati nezavisno od aktivacije EGFR (Bobe i sar., 2003; Yin i sar., 2005). Skoro kompletna inhibicija ERK1/2 aktivacije izazvane trombinom u VSMC, pomoću dva inhibitora EGFR kinazne aktivnosti, AG-1478 i PD 153035 ipak govori u prilog zavisnosti aktivacije ERK1/2 od transaktivacije EGFR (Bobe i sar., 2003) što je u skladu sa centralnom ulogom koju EGFR ima u prenosu GPCR signala (Zwick i sar., 1999).

S druge strane, u astrocitima transaktivacija EGFR nije neophodna da bi trombin aktivirao ERK1/2 (Wang i sar., 2002). Takođe, u našim prethodnim studijama pokazano je da pretretman VSMC sa BAPTA-AM (Ca^{2+} helirajuće jedinjenje, membranski propusno, koristi se kao intracelularni „sunder” za Ca^{2+}) potpuno inhibira fosforilaciju EGFR izazvanu trombinom, a ERK1/2 samo parcijalno, što ukazuje na postojanje EGFR-zavisnih i EGFR-nezavisnih puteva ERK1/2 aktivacije odmaskiranih u uslovima unutarćelijske deprivacije Ca^{2+} (Bobe i sar., 2003; Isenovic i sar., 2008) (Slika 1.7.2).



Slika 1.7.2 (A) EGFR zavistan put aktivacije ERK1/2 u VSMC. (B) EGFR nezavistan put aktivacije ERK1/2 u VSMC. Preuzeto i modifikovano iz (Bobe i sar., 2003; Isenovic i sar., 2008).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Molekularni mehanizam regulacije proliferacije VSMC pod delovanjem trombina nije u potpunosti razjašnjen. Malo je podataka u literaturi o učešću matriksnih i adamalizinskih metaloproteinazama i PKC δ u trostrukoj kaskadi transaktivacije EGFR i proliferacije VSMC stimulisanih trombinom.

Na osnovu gore iznetog, definisani su ciljevi ove doktorske disertacije:

1. Izučavanje efekata trombina na proliferaciju VSMC pacova preko transaktivacije EGFR i aktivacije MAP kinaznog puta. Definisanje precizne uloge EGFR i ERK1/2 u proliferaciji primarnih kultura VSMC pod delovanjem trombina;
2. Izučavanje uloge liganda EGFR, HB-EGF, u regulaciji proliferacije primarnih kultura VSMC pacova i aktivnosti EGFR, ERK1/2 pod delovanjem trombina;
3. Izučavanje uloge ukupnih metaloproteinaza, ADAM 12 i MMP-2 u regulaciji aktivnosti EGFR, ERK1/2 i proliferacije primarnih kultura VSMC pacova pod delovanjem trombina;
4. Izučavanje uloge PKC u regulaciji aktivnosti EGFR, ERK1/2 i proliferacije primarnih kultura VSMC pacova pod delovanjem trombina i
5. Izučavanje međusobnog odnosa transaktivacione kaskade EGFR (uloga ADAM 12, liganda HB-EGF, ADAM 12, MMP-2 i EGFR) i aktivacije MAP kinaznog puta u proliferaciji primarnih kultura VSMC pacova stimulisanim trombinom.

3.HIPOTEZA

Radna hipoteza ove doktorske disertacije je da je trombin uključen u regulaciju proliferacije VSMC pacova, molekularnim mehanizmom koji uključuje transaktivaciju EGFR receptora preko enzima: ADAM 12, MMP-2 kao i PKC δ .

Takođe, u okviru ove doktorske disertacije, postavljena je i dodatna hipoteza da u određenim fiziološkim uslovima EGFR aktivacija nije neophodna za ERK1/2 aktivaciju i proliferaciju VSMC pod delovanjem trombina, već se pretpostavlja postojanje EGFR nezavisnih signalnih puteva ERK1/2 aktivacije i proliferacije VSMC u kojima je PKC δ jedan od mogućih aktera.

4. MATERIJAL I METODE

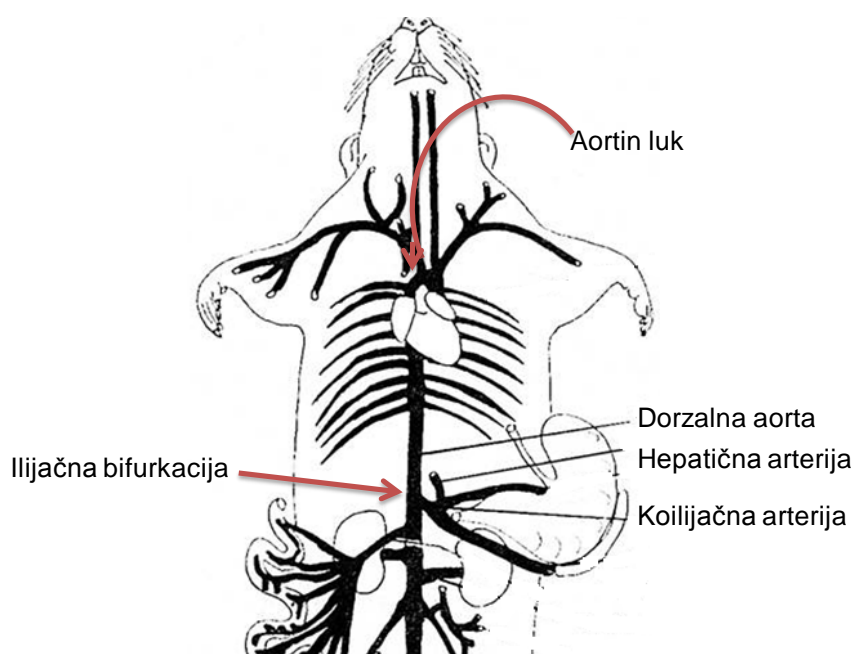
4.1. Reagensi i antitela

Materijal i medijumi za kulturu ćelija poreklom su od Costar and Life Technologies, osim fetalnog telećeg seruma (FCS; *engl. „Fetal Calf Serum“*) koji je nabavljen od Roche Diagnostic (Gagny, Francuska). Antitela korišćena za sve eksperimente su naručena od Cell Signaling Technology (Beverly, Maryland, USA). Poreklo inhibitora molekula proliferativnog puta VSMC (EGFR, HB-EGF, MP, MMP, MMP-2, ADAM 12 i PKC δ) naznačeni su u posebnom delu o inhibitorima (poglavlje 4.6). Sve druge hemikalije uključujući i trombin potiču od Sigma Aldrich (St. Quentin Fallavier, Francuska).

4.2. Izolovanje VSMC iz aorte pacova

Za eksperimente sa primarnom kulturom, izolovane su glatke mišićne ćelije iz torakalnog dela aorte Wistar pacova, starih 10 nedelja i telesne mase između 220-240 g (odgajališta Medicinskog fakulteta Instituta „Pierre et Marie Curie“ u Parizu i Instituta “Vinča”, Univerzitet u Beogradu). Sve životinje su održavane na standardnom režimu laboratorijske ishrane i vode *ad libitum*. Po dostizanju pomenute starosti i mase, operisane su u opštoj anesteziji izazivanoj intraperitonealnom injekcijom Narketobarbitala u dozi od 45-50 mg/kg. Eksperimentalne životinje su postavljale na leđa i pričvršćivane za disekcionu ploču. Grudni koš i trbušni deo dezinfikovani su sa 70% alkoholom. Sterilnim makazama i pincetom uklanjana je koža sa torakalnog dela i otvaran je toraks tako da su srce i pluća bili lako dostupni i vidljivi. Isecanje torakalnog dela aorte odvijalo se odmah iznad srca do ilijačne bifurkacije, prosečne dužine 1,6-1,7 cm (**Slika 4.2.1**). Torakalni deo aorte prebacivao se u Petri šolju sa ledenim rastvorom fosfatnog pufera A ((PBS, *engl. “Phosphate Buffered Saline”*) sa 0,2 mM CaCl₂, 100 U/ml penicilina i 100 µg/ml streptomocina), na ledenom kupatilu za dalju disekciju pod

mikroskopom. Upotrebom prave i zakrivljene sterilne pincete pažljivo je uklanjano masno i vezivno tkivo oko aorte, a spoljni sloj aorte (*tunica adventitia*) se skidao u jednom komadu brzim potezom. Nakon istiskivanja ostatka krvi iz isečene aorte, ubrizgavanjem hladnog rastvora A špricom sa iglom debljine 28G, aorta je longitudinalno sečena i *tunica intima* uklanjana nežnim četkanjem sa nazubljenom pincetom. Zaostala *tunica media*, sloj aorte bogat VSMC, ispiran je tri puta hladnim PBS rastvorom i prenošen u temperirani modifikovani rastvor za rast ćelija u kulturi (DMEM, engl. "Dulbecco's Modified Eagle's Medium"), obogaćen sa 10% fetalnim telećim serumom (FCS, engl. "Fetal Calf Serum"), gde je sa finim mini-disekcionim makazama sitnjen na komadiće prosečne veličine 1 mm².



Slika 4.2.1 Grafički prikaz torakalne duplje pacova i tačaka disekcije torakalne aorte. Preuzeto i modifikovano sa sajta: <http://brcr.bio.umass.edu/intro/content/rat-dissection-preparation-page> od (Barlow-Coleman, 2011).

Eutanazija pacova vršena je gušenjem u atmosferi CO₂. Etička komisija za rad sa oglednim životinjama Instituta za nuklearne nauke „Vinča” iz Beograda i Instituta „Pierre et Marie Curie” iz Pariza su odobrili eksperimente na životinjama opisanim u ovoj doktorskoj disertaciji.

4.3. Uspostavljanje primarne kulture VSMC

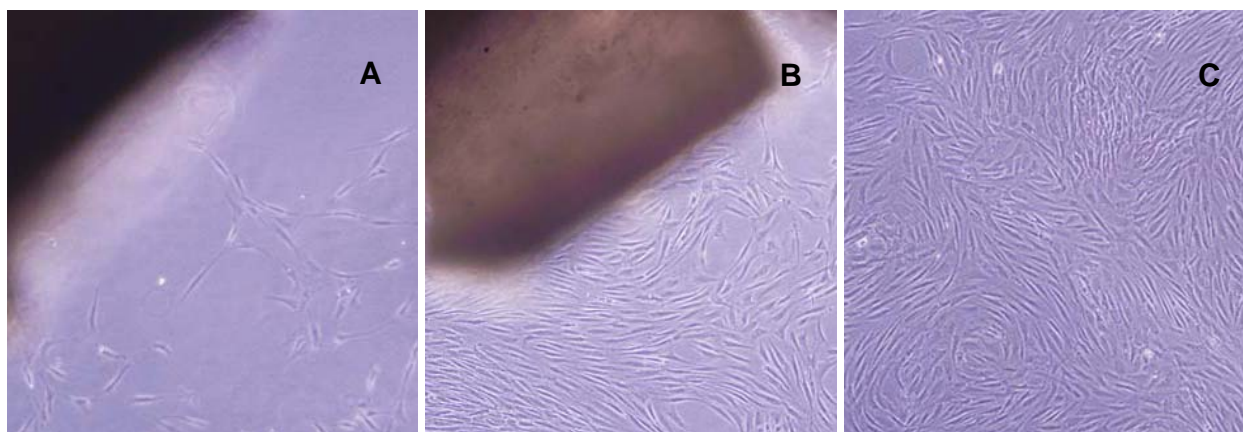
Postupak uspostavljanja primarne ćelijske kulture VSMC, izolovanih iz torakalnog dela aorte Wistar pacova, predstavlja kombinaciju eksplant tehnike po metodi Ross i saradnika (Bobe i sar., 2003; Marche i sar., 1995; Ross, 1971) i enzimske digestije (Isenovic i sar., 2009b; Isenovic i sar., 2004; Standley i sar., 1991) koja nakon devet dana daje visoko čistu primarnu kulturu VSMC sa održanim potencijalom za proliferaciju i visokom vijabilnošću i kontraktilnošću.

Eksplant tehnikom se nakon nekoliko nedelja dobija primarna kultura VSMC. Sama metoda je jednostavna za izvođenje i ne zahteva znatna materijalna sredstva, ali se često dešava da su primarne kulture VSMC kontaminirane endotelnim ćelijama iz sloja intime i fibroblastima iz adventicionog sloja aorte, što predstavlja veliki problem. Prednosti kombinovane metode nad eksplant tehnikom su u znatno brže dobijenoj i većoj količini primarne kulture VSMC dobijene od iste količine polaznog materijala (torakalna aorta). Nakon 9 dana dobija se primarna kultura VSMC sa čistoćom iznad 98%. Takođe, nije retko da se pri tehnikama enzimske digestije pretera sa koncentracijama tripsina što rezultuje u niskoj kontraktilnosti i vijabilnosti primarne kulture ili da se usled nedovoljne količine enzima za digestiju, dobiju niski prinosi primarne kulture. U odnosu na klasičnu enzimsku digestiju, kombinovana metoda je pokazala uštedu u materijalnim sredstvima potrebnim za nabavku tripsina. Kombinovanu metodu uspostavljanja primarne ćelijske kulture VSMC, vrlo sličnu našoj, objavili su (Xu i sar., 2009a).

Nakon disekcije *tunica media*, delovi tkiva su podrgavani enzimskoj digestiji u 0,2% rastvoru tripsina u koničnoj flaši uz konstantno mešanje (150–200 rpm, IKA, Nemačka), na 37 °C tokom 8 minuta. U odbacivanom supernatantu ostajali su fibroblasti i endotelne ćelije. Ovaj korak tripsinizacije je još jednom ponavljan. Nakon toga, enzimska digestija je zaustavljena dodatkom DMEM rastvora obogaćenog sa 10% FCS. Inokulacija delića tkiva vršena je u T25 flašama za kulturu ćelija, tako što su se raspoređivali na razdaljinu od jednog cm. Otprilike 15-20 komadića se moglo rasporediti iz jednog isečka aorte. Flaša je postavljena uspravno u CO₂-inkubator na 37 °C i atmosferi od 5% CO₂ i 95% vazduha i to bez DMEM medijuma tokom 4-6h kako bi se obezbedilo i olakšalo adekvatno pričvršćivanje (adhezija) VSMC za podlogu

flaše za kulturu ćelija. Nakon toga dodavano je 2 ml DMEM medijuma sa 10% FCS, 100 U/ml penicilina i 100 µg/ml streptomicina i flaša je pažljivo spuštana u horizontalni položaj. Važno je bilo ne uznemiravati primarnu kulturu tokom prvih 48h kultivacije. Medijum je prvi put menjan nakon 72h, a potom na svakih 48h.

Tri dana nakon inokulacije u primarnoj kulturi su fazno-kontrastnim mikroskopom raspoznavane VSMC koje su se množile i migrirale od dela tkiva, a nakon 5 dana od inokulacije, kultura ćelija je već bila subkonfluentna (**Slika 4.3.1**). Potpuna konfluentnost javljala se devet dana nakon inokulacije (**Slika 4.3.1**). Nedeljno presađivanje (fr. “passage”) je izvođeno tako što je 90% konfluentna kultura VSMC, tretirana sa 0.2% tripsina-EGTA u Ca^{2+} -Hanks-ovom fiziološkom balansiranom rastvoru bez Mg^{2+} jona (HBSS, engl. “**H**anks **B**uffered **S**aline **S**olution”).

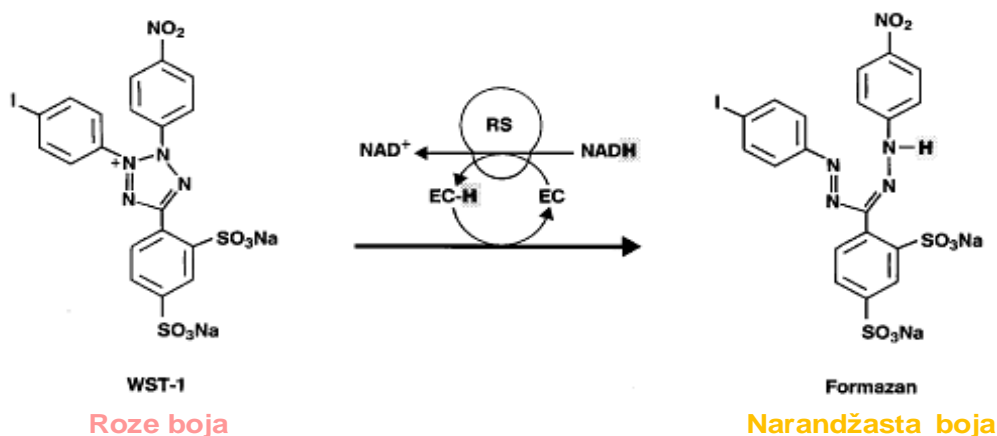


Slika 4.3.1 (A) Nakon 3 dana od inokulacije primetna je migracija VSMC iz originalnog komadića tkiva torakalnog dela aorte (tamno braon polje u gornjem levom uglu) (svetlosna mikroskopija, uvećanje x100). (B) Pet dana nakon inokulacije, VSMC kultura je subkonfluentna (uvećanje X100). U gornjem levom uglu, uočava se i originalni komadić tkiva aorte iz koga su VSMC migrirale. (C) Devetog dana u konfluentnoj VSMC kulturi raspoznaje se karakterističan obrazac (engl. “*hill and valley*”)(uvećanje X100).

Pri trećem presadu (prelazu) određivana je vijabilnost, broj i čistoća gajenih VSMC u kulturi. Za eksperimente su korišćene subkonfluentne ćelije iz četvrtog, petog i šestog prelaza. Pre svakog ekperimenta ćelije su 3 dana gajene u pločama za mikrokulturu sa 96 bunarčića sa DMEM obogaćenim 10% FCS, a potom u medijumu bez seruma 48h da bi se dovele u stanje mirovanja (engl. “quiescent”).

4.4. Praćenje broja, vijabilnosti i čistoće dobijene primarne kulture VSMC

Pri trećem presadu (prelazu) određivana je vijabilnost i broj gajenih VSMC u kulturi. Merena je aktivnosti dehidrogenaza mitohondrijskog lanca pomoću citotoksičnog detekcionog seta oznake „WST-1” proizvođača Boehringer Mannheim. Princip ovog kontinuiranog kolorimetrijskog testa baziran je na kovalentnom raskidanju veze u tzv. WST-1 tetrazolijum soli od strane mitohondrijskih dehidrogenaza (**Slika 4.4.1**), što govori o nivou respiracije i brzine metabolizma kulture ćelija. Klasičnim testom bojenja ćelija sa tripan plavim reagensom (engl. “Trypan blue dye”) određivan je broj vijabilnih od ukupnog broja ćelija (**Slika 4.4.1**).



Slika 4.4.1 Raskidanje veze u WST-1 tetrazolijum soli blage roze boje od strane aktivne sukcinat-tetrazolijum reduktaze (EC 1.3.99.1) i nastanak stabilnog, rastvornog produkta formazana, intenzivne narandžaste boje. Sukcinat-tetrazolium reduktaze pripadaju mitohondrijskom respiratornom lancu i aktivne su samo u metabolički očuvanim ćelijama. Legenda: WST-1 – tetrazolijum so; RS – respiratorni sistem mitohondrije; EC – oksidovana forma sukcinat-reduktaze (EC 1.3.99.1); EC-H – redukovana forma sukcinat-reduktaze (EC 1.3.99.1). Preuzeto i modifikovano sa sajta: (www.roche-applied-science.com).

Obzirom da je ćelijski metabolizam zavistan od temperature, a WST-1 reagens osetljiv na svetlo, posebna pažnja je posvećivana održavanju konstantne temperature VSMC kultura od 37 °C i smanjenju ekspozicije svetla. Žuto-narandžasti proizvod reakcije, stabilni i rastvorljivi formazan, kvantifikovan je na talasnoj dužini 450nm sa ELISA mikrolejt fotometrijskim čitačem (model LP 400, Diagnostics Pasteur, Pariz).

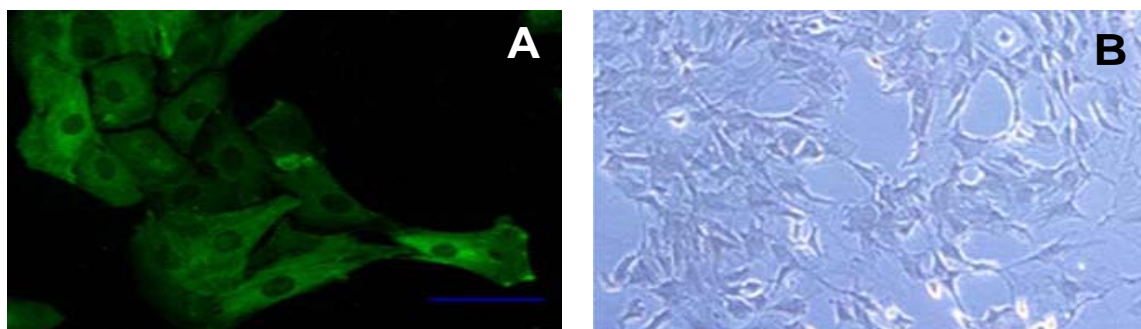
Ovaj model optičkog čitača simultano meri apsorbanciju sadržaja svih 96 bunarčića, tako sa temperatura, sterilnost i pH ćelijske kulture održavaju konstantnim. Pozadinska apsorbancija određivana je na osnovu čitanja apsorbancije kulture ćelija VSMC u medijumu na početku testa, pre dodatka WST-1 reagensa. Za potrebe standardizacije, VSMC kulturama je dodavano 1, 10, ili 20 μl koncentrovanog WST-1 reagensa u 100 μl svežeg medijuma (37 °C). Zasnvano na ovim rezultatima, rutinska ispitivanja su vršena sa 10 μl koncentrovanog WST-1 reagensa tokom 1h.

Klasičan test ispitivanja vijabilnosti ćelija u suspenziji jeste test isključenja primanja boje tripan plavo. Ovi testovi isključenja primanja boje (odbacivanja, ne primanja boje) zasnovani su na činjenici da vijabilne ćelije poseduju intaktnu ćelijsku membranu, koja ne propušta boje kao što su eozin, propidijum i tripan plavo, za raliu od membrana mrtvih ćelija. U ovom testu suspenzija VSMC se meša sa tripan plavim i vizuelno, pod mikroskopom proučava se da li VSMC propuštaju boju ili ne. Vijabilne ćelije imaju prozirnu citoplazmu, dok je ona kod mrtvih ćelija plava.

Prethodni medijum nakon WST-1 ispitivanja je uklonjan aspiracijom iz 96 bunarčića i zamenjivan sa po 50 μl 1:10 (v/v) mšavine 0.4% sterilno -filtriranog tripan plavog i HBSS rastvora. Nakon 2 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi, bojeni rastvor je aspiriran i zamenjivan sa 200 μl DMEM medijuma. VSMC u kulturi posmatrane su pod invertnim mikroskopom, a mrtve ćelije brojane pod uvećanjem od 40 puta. Vijabilnost kulture izražavana je kao procenat nebojenih ćelija od ukupnog broja ćelija, što zahteva tačan ukupni broj ćelija koje se broje. Vijabilnost pojedinačnih primarnih VSMC kultura u našim eksperimentima iznosila je $\geq 96\%$.

Čistoća primarne ćelijske kulture praćena je imunofluorescentnim bojenjem alfa-aktina specifičnim za VSMC (alfa-SM-aktin) sa fluorescein-izotiocijanat (FITC)-konjugovanim antitelom, obzirom da se alfa-SM-aktin smatra dobro poznatim, diferenciranim i priznatim markerom specifičnosti VSMC (Hu i sar., 2003). VSMC su preko noći inkubirane na 4 °C sa primarnim antitelom, mišijim monoklonskim anti alfa-SM-aktin u razblaženju 1:200. Potom su primarne VSMC kulture inkubirane sa sekundarnim antitelom tokom 2h u razblaženju 1:50 (kozije FITC-konjugovano antitelo upereno protiv mišijeg antitela), nakon čega su ćelije ispirane sa PBS rastvorom. Jedra ćelija su bojena sa Hoechst 33342 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma). Alfa-SM-aktin pozitivne ćelije brojane su pod imunofluorescentnim mikroskopom (Olympus, Japan). Čistoća VSMC

kultura je bila iznad 98% (Slika 4.4.2). Za analizu eliminacije ćelija endotela, bila je primenjena kao negativna kontrola inkubacija sa primarnim antitelom uperenim protiv von Willebrand faktora (vWF). Sa ovom tehnikom podizanja primarne VSMC kulture, one su bile potpuno oslobađane od ćelija endotela (Slika 4.4.2).



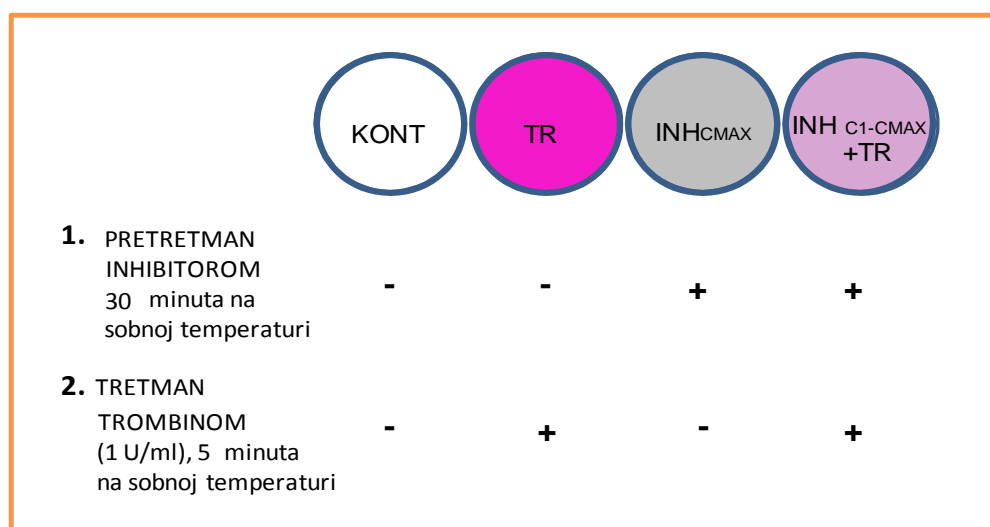
Slika 4.4.2 Praćenje vijabilnosti i čistoće dobijene primarne ćelijske kulture VSMC. (A) Identifikacija kultura VSMC pomoću, imunofluorescentnog bojenja alfa-SM-aktina sa FITC- konjugovanim antitelom (1:200) tokom trećeg presada. Uočava se fibrilarni obrazac alfa-SM-aktinskih niti (uvećanje x100). (B) Određivanje prisustva endotelne ćelije imunocitohemijskim bojenjem sa primarnim antitelom uperenim protiv vWF faktora (razblaženje 1:20). Uočava se negativan rezultat, tj., odsustvo endotelne ćelije u kulturi VSMC (uvećanje x 40).

4.5. Eksperimentalni dizajn

Izučavanje efekata trombina i inhibitora molekula-učesnika signalnog puta proliferacije na nivo fosforilacije ERK1/2 i EGFR iz VSMC i njihove proliferacije vršeno je na glatkim mišićnim ćelijama aorte (Slika 4.5.1):

- 1) Nestimulisanim, označenim kao KONT;
- 2) Tretiranim trombinom koncentracije 1U/ml u trajanju od pet minuta na sobnoj temperaturi i označene kao TR;
- 3) Tretiranim prethodno utvrđenom maksimalnom koncentracijom specifičnog inhibitora molekula od interesa u trajanju od 30 minuta na sobnoj temperaturi označenih skraćenicom imena inhibitora (PD, AG, At HB-EGF, PHEN, GM, SI-II, KB, Rot), koja ne izaziva toksični efekat kod ispitivanih VSMC i
- 4) Prethodno tretiranim specifičnim inhibitorom molekula od interesa u različitim koncentracionim opsezima u trajanju od 30 minuta a potom sa trombinom (1 U/ml) u trajanju od pet minuta i označenih kao (PD+TR, AG+TR, At HB-EGF+TR, GM+TR,

SI-II+TR, KB+TR i Rot+TR). Pojedini koncentracioni opsezi, tzv., radna razblaženja za svaki inhibitor pojedinačno, izloženi su u poglavlju 4.6.



Slika 4.5.1 Šematski prikaz dizajna eksperimenata. Tretmani eksperimentalnih grupa VSMC primenjivanih u istraživanjima uticaja inhibicije molekula kandidata učesnika proliferativnog puta VSMC na nivoe aktivacije EGFR receptora i ERK1/2 kinaze. Svaki eksperiment je rađen u triplikatu i ponovljen minimum 4-6 puta na posebnim primarnim kulturama VSMC. Legenda :-odsustvo; + prisustvo; KONT – kontrolna grupa VSMC; TR – VSMC tretirane trombinom; INH_{cmax} – VSMC tretirane samo sa najvišom koncentracijom inhibitora nekog od pretpostavljenih molekula učesnika proliferativnog puta koja ne dovodi do toksičnog efekta na VSMC; INH_{c1-c_{max}}+TR – VSMC prethodno tretirane sa inhibitorom od najniže (c_1), pa do maksimalne (c_{max}) koncentracije, potom sa trombinom.

Isti raspored eksperimentalnih grupa primarnih kultura ćelija je primenjivan i za izučavanje efekata trombina i inhibicije molekula signalnog puta na nivo sinteze DNK odnosno proliferacije VSMC, s tim da su inkubirane trombinom iste koncentracije od 1 IU/ml u trajanju od 24h.

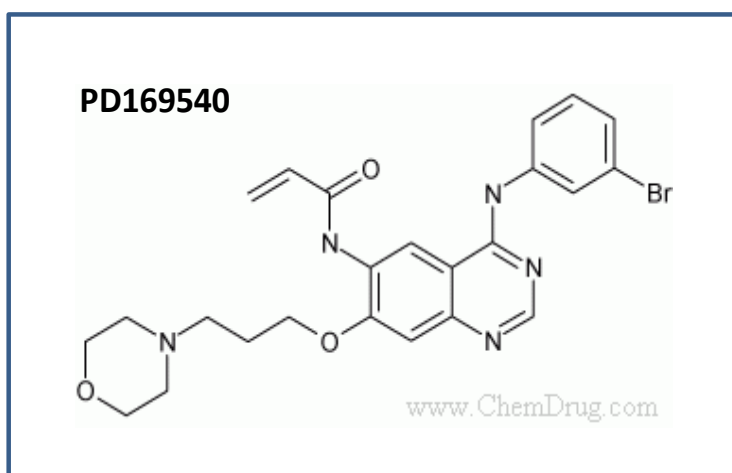
U posebnim eksperimentima gore pomenutog dizajna, istraživani su uticaji inhibicije HB-EGF liganda, ukupnih cink i matriksnih metaloproteinaza, MMP-2, ADAM 12 i PKC δ na nivo fosforilacije ERK1/2 i EGFR i proliferacije VSMC, kao i uticaj inhibicije EGFR na fosforilaciju ERK1/2 i proliferaciju VSMC pod delovanjem trombina. Korištene su western blot tehnika i proliferativni BrdU test, a primenjivani su njihovi farmakološki inhibitori: PD169540 (PD) - ireverzibilni i potentni EGFR

inhibitor; AG1478 (AG) - potentni reverzibilni inhibitor EGFR; monoklonsko antitelo upereno protiv HB-EGF (At HB-EGF); o-fenantrolin (PHEN) - inhibitor ukupnih cink metaloproteinaza; GM 6001 (GM) - inhibitor ukupnih MMP; specifični inhibitor II MMP-2 (SI-II); KB-R7785 (KB) - ADAM 12 specifični inhibitor i rotlerin (Rot) - specifični inhibitor PKC δ kinaze.

4.6. Inhibitori molekula učesnika proliferativnog puta VSMC

4.6.1. PD169540, ireverzibilni i potentni inhibitor EGFR

Jedinjenje označeno kao PD169540 (PD), predstavlja akrilamidom supstituisan 4-anilinopirido[d]pirimidin (Slika 4.6.1.1), jedan od novijih predstavnika ireverzibilnih inhibitora tirozin kinaza. Dizajniran je tako da vodi ireverzibilnoj alkilaciji Cys⁷⁷³ u okviru ATP-vezujućeg džepa tirozin-kinaznog domena familije EGF receptora (Smaill i sar., 2000a). Ispitivanja PD inhibitora na izolovanom EGFR, kao i autofosforilacije EGFR u A431 ćelijama i MDA-MB 453 tumorskih ćelijskih linija stimulisanih heregulinom, pokazala su da se radi o izuzetno snažnom i ireverzibilnom pan Erb inhibitoru sa IC₅₀ vrednostima od 2 do 4 nM (Smaill i sar., 2000a).

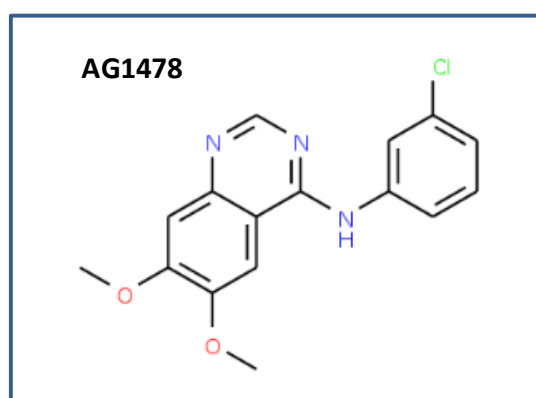


Slika 4.6.1.1 Strukturna formula PD169540, potentnog ireverzibilnog inhibitora EGFR (N-[4-(3-bromofenilamino)-7-[3-(4-morfolinil)propoksi]-6-kinazolinil]-2-propenamid). Preuzeto i modifikovano sa sajta: (www.ChemDrug.com).

Osim superiorne inhibicije, dalji eksperimenti su pokazali znatno povećanu rastvorljivost u vodi i stabilnost vodenog rastvora PD u odnosu na molekule ireverzibilnih EGFR inhibitora prethodne generacije. Upravo zbog ovih svojstava je i izabran za eksperimente u okviru kojih smo želeli da inhibiramo aktivnost EGFR. PD je dobijen na poklon od Pfizer Global Research and Development. Rastvaran je prvo u dimetilsulfoksidu (DMSO) do koncentracije 10 mM, a od tog rastvora su potom pravljena radna razblaženja sa DMEM (za 20 μ M PD rastvor: 14 μ l koncentrovanog rastvora PD +7 ml DMEM) u opsegu od 0,1 μ M do 10 μ M.

4.6.2. AG 1478, potentni, reverzibilni inhibitor EGFR

Tirfostin, 4-(3-hloroanilino)-6,7-dimetoksikinazolin, poznatiji i kao AG 1478 (AG) (**Slika 4.6.2.1**), naručen je od Cell Signaling Technology u formi praška, pakovanja od 400 μ g i čuvan na -20 °C. Obzirom da je u praškastom stanju stabilniji nego u koncentrovanom rastvoru, nisu pravljene zalihe koncentrovanog rastvora već je pre eksperimenta rastvaran u 0,123 ml DMSO i dobijan koncentrovan 10 mM rastvor AG razblaživan do radnih koncentracija: 0,1 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M i 20 μ M sa DMEM.



Slika 4.6.2.1 Strukturna formula AG1478, potentnog reverzibilnog inhibitora EGFR. Preuzeto i modifikovano sa sajta: (www.ChemDrug.com).

AG je potentni i reverzibilni inhibitor tirozin kinaza i to specifično selektivan prema EGFR, sa vrednošću IC_{50} (kompetitivno vezivanje za ATP džep tirozin-kinaznog domena) od 3 nM *in vitro* u mnogim ćelijskim linijama (Levitzki i sar., 1995; Osherov i

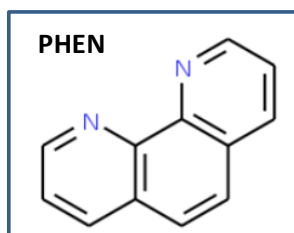
sar., 1994). Tretman kancerske ćelijske linije A 431 sa AG u opsegu od 50-150 nM značajno je smanjio aktivaciju EGFR i EGFR zavisnih Src protein kinaza, kao i rast pomenute ćelijske linije *in vivo* (Fan i sar., 1995). U fibroblastima tipa 1 kod pacova, AG je pokazao značajnu inhibiciju DNK sinteze regulisane preko EGFR (Daub i sar., 1996). U istoj studiji je pokazano da administracija AG vodi smanjenju ERK fosforilacije bez uticaja na aktivnost Src i Akt (Daub i sar., 1996).

4.6.3. Anti-HB-EGF neutrališuće antitelo kao imuno-blokator HB-EGF funkcije

Kozije monoklonsko anti HB-EGF antitelo (At HB-EGF) upereno protiv HB-EGF pacova poručeno je od Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Nemačka (pakovanje sadrži 200 µg IgG u 1.0 ml PBS sa < 0.1% natrijum azid rastvora i 0.1% želatina). Za potrebe imunoprecipitacije, 1-2 µg antitela je mešano sa 100-500 µg totalnih proteina. U našim eksperimentima, radne koncentracije od 5 µM, 10 µM i 20 µM dobijane su mešanjem originalnog rastvora antitela sa odgovarajućom zapreminom DMEM tako da je dobijana najviša radna koncentracija od 20 µM, a njenim daljim razblaživanjem ostale koncentracije At HB-EGF. Kao kontrola korišćeno je izotipsko 20 µM IgG antitelo (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Nemačka).

4.6.4. o-fenantrolin, inhibitor ukupnih MP

O-fenantrolin (PHEN) je često korišćeni metal-helirajući agens koji se ponaša kao inhibitor ukupnih MMP (Stix i sar., 2001; Uhm i sar., 1996) sa spektrom inhibitornog dejstva i van ove grupe jer sem cinka helira gvožđe i druge divalentne metale, pa se zato češće svrstava u inhibitore ukupnih MP (**Slika 4.6.4.1**) (Stix i sar., 2001).

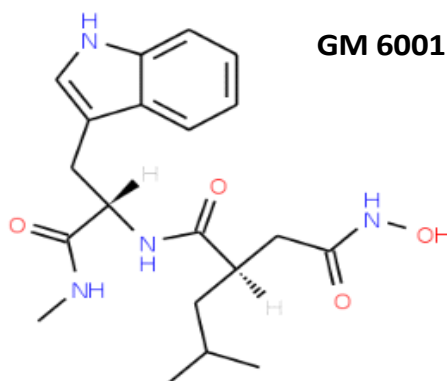


Slika 4.6.4.1 Strukturna formula *o*-fenantrolina (PHEN). Preuzeto sa sajta: (www.ChemDrug.com).

Njegove helirajuće osobine su korišćene za fotometrijsko određivanje gvožđa (Fe^{2+}) na 510 nm (McCarty, 1992). Efektivne koncentracije su mu u opsegu 0,1-10 mM. Za potrebe naših eksperimenata naručen je PHEN od Sigma Aldrich (St. Quentin Fallavier, Francuska), rastvaran u metanolu u koncentraciji od 200 mM (ovaj rastvor je 3 meseca stabilan ako se čuva na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Radne koncentracije od 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM i 5 mM dobijane su mešanjem originalnog rastvora PHEN sa odgovarajućom zapreminom DMEM tako da se dobijana najviša radna koncentracija od 5 mM, a njenim daljim razblaživanjem ostale radne koncentracije PHEN rastvora.

4.6.5. Inhibitor ukupnih MMP, GM6001

GM6001 (GM), poznat i kao Galardin, pripada grupi reverzibilnih metaloproteinaznih inhibitora, klase hidroksiamidne kiseline (Slika 4.6.5.1). Anjonsko stanje ove kiseline formira bidentatni kompleks sa cinkom u aktivnom centru MMP (Nishino i sar., 1978). Pored mnogih MMP, GM inhibira i termolizin (Grobely i sar., 1992) i antraksov letalni faktor endopeptidaza koje proizvode bakterije roda *Bacillus* (Kocer i sar., 2005). Takođe, pokazano je da GM inhibira oslobađanje $\text{TNF}\alpha$ (Solorzano i sar., 1997). Objavljene vrednosti IC_{50} za GM u humanim MMP-1,-2,-3,-8 i -9 iznose: 0.4 nM, 0.5 nM, 27 nM, 0.1 nM i 0.2 nM, respektivno (Grobely i sar., 1992).

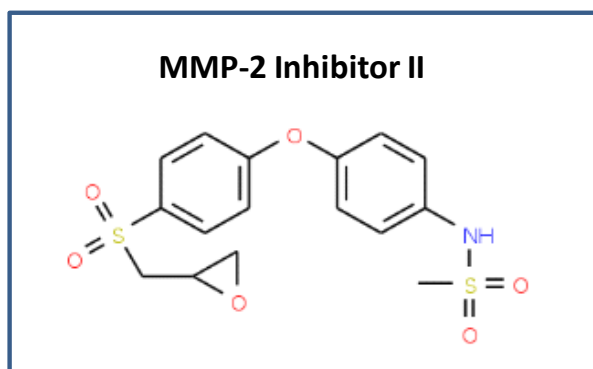


Slika 4.6.5.1 Strukturna formula GM6001, inhibitora ukupnih MMP. Preuzeto i modificirano sa sajta: (www.ChemDrug.com)

Za potrebe naših eksperimenata GM je nabavljan od Sigma Aldrich (St. Quentin Fallavier, Francuska). Tipična razblaženja za upotrebu u eksperimentima sa ćelijskim kulturama su od 10-25 μM (1 mg/ml rastvora u DMSO odgovara 2.57 mM rastvoru GM). U koncentracijama preko 100 μM , GM precipitira iz vodenih rastvora, pa je preporuka da se koriste rastvori sa nižim sadržajem soli kako bi se sprečila njegova precipitacija. Radna razblaženja za naša ispitivanja od 10 do 50 μM dobijana su razblaživanjem 10 mM GM rastvora sa 7ml DMEM tako da je dobijana najviša radna koncentracija (50 μM), od koje su pravljeni ostala razblaženja.

4.6.6. MMP-2 Inhibitor II (SI-II)

MMP-2 Inhibitor II, u daljem tekstu označen kao specifični inhibitor II (SI-II) je oksiranski analog jedinjenja označenog kao SB-3CT (Slika 4.6.6.1). Poručen je od Calbiochem, Nemačka (Kat. br. 444286), kao pakovanje od 5 mg praška rastvorljivog u DMSO. Deluje kao selektivni i ireverzibilni inhibitor koji se vezuje za aktivno mesto MMP-2 sa vrednošću $\text{IC}_{50} = 2.4 \mu\text{M}$. Iako je manje potentan od SB-3CT, pokazuje veću selektivnost za MMP-2 ($\text{IC}_{50} = 45$ i $379 \mu\text{M}$ za MMP-1 i MMP-7, respektivno) u odnosu na SB-3CT (Ikejiri i sar., 2005). Radna razblaženja za naše eksperimente u opsegu od 0,5 μM pa do 20 μM , pravljeni su razblaživanjem koncentrovanog 1 mM rastvora SI-II sa DMEM.

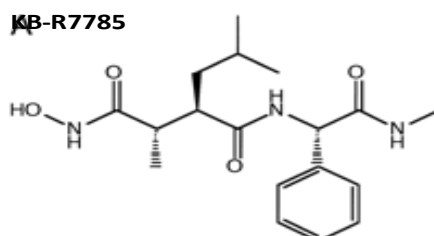


Slika 4.6.6.1 Strukturna formula MMP-2 inhibitora II (SI-II) ((4-(4-(metanesulfonamido)fenoksi)fenilsulfonyl)metiloksiran). Preuzeto i modificirano sa sajta: (www.millipore.com)

4.6.7. KB-R7785, potentni inhibitor ADAM 12

KB-R7785 (KB), derivat hidoksiaminske kiseline (**Slika 4.6.7.1**), prvobitno je bio dizajniran kao MMP inhibitor (Hirayama i sar., 1997). Kasnije je pokazana njegova selektivnost prema ADAM 12 ($c=1-10 \mu\text{M}$) naspram ADAM 17 ($c >10 \mu\text{M}$) (Asakura i sar., 2002; Ichikawa i sar., 2004; Lozonschi i sar., 1999; Mochizuki i sar., 2007; Smiljanic i sar., 2011). Naručen je od New Drug Discovery Research Laboratory (Kanebo LTD, Osaka, Japan).

Radna razblaženja u opsegu od 1-50 μM KB, za naše eksperimente, dobijana su razblaživanjem koncentrovanog 10mM KB (rastvorenog inicijalno u DMSO) u DMEM do 50 μM , od koje su razblaživanjem sa DMEM dobijane niže radne koncentracije.

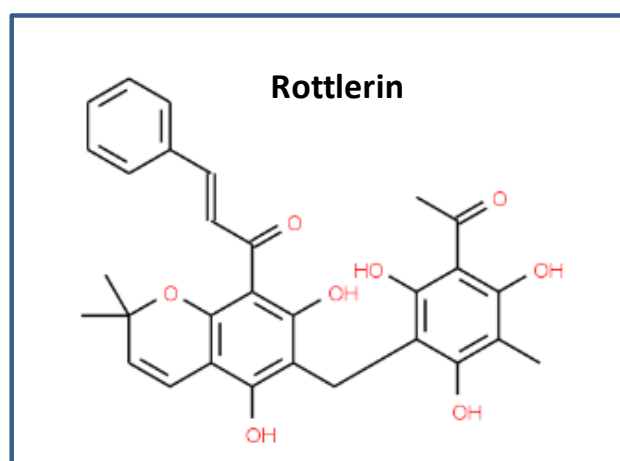


Slika 4.6.7.1 Strukturna formula KB-R7785, potentnog inhibitora ADAM 12. [4-(N-hidoksiamino)-2R-izobutil-3S-metilsukcinil]-1-fenil-glicin-N-metilamid. Preuzeto i modificirano sa sajta (www.ChemDrug.com).

4.6.8. Rotlerin, specifični inhibitor PKC δ

Rotlerin (Rot, engl. “**R**ottlerin”), glavno fenolno jedinjenje biljke *Mallotus philippinensis*, je široko korišćen inhibitor PKC δ (IC_{50} =3-6 μ M). Rot takođe inhibira PKC α , PKC β , PKC γ , PKC ϵ , PKC ζ i CaM kinazu III (IC_{50} vrednosti su 30, 42, 40, 100, 100 μ M i 5.3 μ M, respektivno)(Gschwendt i sar., 1994). U humanim HT1080 fibrosarkoma ćelijama, Rot indukuje apoptozu i autofagiju preko PKC δ -zavisnog puta (Song i sar., 2008). Takođe, Rot usporava deaktivaciju humanih hERG kanala (engl. “Ether-á-go-go Channel”) (Zeng i sar., 2006), inhibira širok spektar protein kinaza, najpotentnije PRAK i MAPKAP-K2 (IC_{50} vrednosti su 1.9 i 5 μ M respektivno) (Davies i sar., 2000; Way i sar., 2000). U *in vivo* i *in vitro* modelima Parkinsonove bolesti, pokazano je da Rot ima neuroprotektivno dejstvo (Zhang i sar., 2007a). Takođe, pokazano je i njegovo apoptotsko dejstvo preko povećanja regulacije receptora smrti 5 (DR5), putem nezavisnim od PKC δ u mnogim linijama humanih malignih ćelija (Lim i sar., 2009).

Rot (Slika 4.6.8.1) je naručen od Sigma Aldrich (St. Quentin Fallavier, Francuska) i čuvan na -20 °C. Rastvaran je u DMSO u koncentraciji od 5 mM, a radne koncentracije u opsegu od 1-10 μ M dobijane su razblaživanjem sa DMEM.

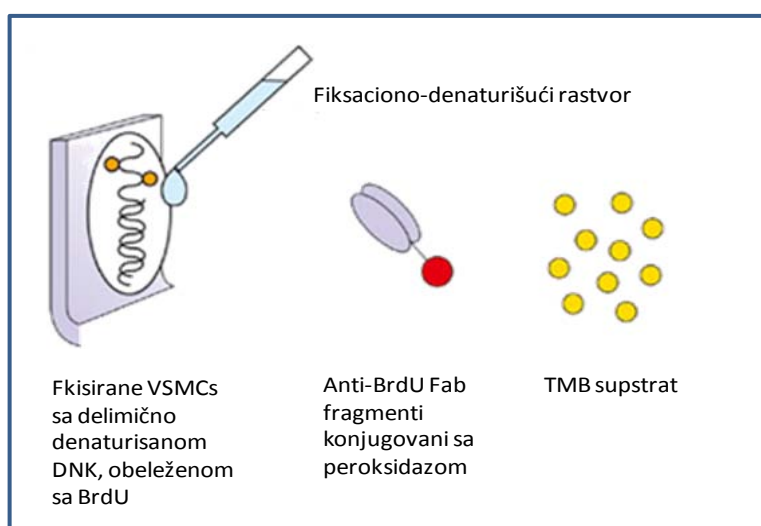


Slika 4.6.8.1 Strukturna formula Rot specifičnog inhibitora PKC δ . Preuzeto i modifikovano sa sajta: (www.ChemDrug.com)

4.7. Test kvantitativnog određivanja DNK sinteze (ELISA BrdU test)

DNK sinteza, odnosno proliferacija VSMC merena je preko inkorporacije 5-bromo-2-dezoksiuridina (BrdU) u replikujuću DNK VSMC, upotrebom BrdU proliferativnog seta proizvođača Boehringer Mannheim na osnovu uputstva proizvođača i naših ranije publikovanih radova (Bobe i sar., 2003; Isenovic i sar., 2009b).

Ukratko, VSMC rasejane 3000 ćelija po bunarčiću, gajene su u pločama za mikrokulturu sa 96 bunarčića i tretirane 30 minuta prema ranije opisanom protokolu sa ili bez pomenutih specifičnih inhibitora pojedinačno, a nakon toga trombinom 1 IU/ml tokom 24h. Nakon 22h od inkubacije trombinom dodavan je i 10 mM BrdU, tako da je inkubacija trajala 2h na 37 °C. Sledeći korak bio je fiksiranje VSMC pomoću gotovog fiksacionog rastvora iz seta (engl. "FixDenat solution") u trajanju od 30 minuta na sobnoj temperaturi, koji istovremeno i delimično denaturiše DNK, izlažući tako ugrađeni BrdU daljoj imunodetekciji (**Slika 4.7.1**). Nakon toga, fiksacioni rastvor je dekantovan (aspiriran), a fiksirane VMSCs se inkubirane sa antitelom na BrdU za koje je povezana peroksidaza, tokom 1h na sobnoj temperaturi. Po dekantovanju ovog rastvora, fiksirane VSMC su tri puta prane puferom iz seta i potom inkubirane 15 minuta na sobnoj temperature sa 3,3',5,5'-tetrametilbenzidinom (TMB) kao supstratom.



Slika 4.7.1 Šematski prikaz protokola ELISA BrdU testa. Objašnjenje u tekstu. Preuzeto i modifikovano iz teksta uputstva BrdU test-seta proizvođača Roche Boehringer Mannheim, sajt: (www.roche-applied-science.com).

Reakcija između dodatog TMB supstrata i enzima peroksidaze konjugovane za anti BrdU-Fab fragment, prekidana je dodavanjem 1 M H₂SO₄ a optička gustina na 450 nm u svakom bunarčiću fotometrijski je čitana pomoću ELISA „mikroplejt“ čitača.

Jedino proliferišuće ćelije ugrađuju BrdU u svoju DNK, tj., što je više sintetisane DNK, više je ugrađenih BrdU molekula, a time i intenzivnija optička gustina. Svaki eksperiment sa određenim inhibitorom molekula od interesa, rađen je od 5-7 puta na posebnim VSMC kulturama i to svako merenje u triplikatu. Srednja vrednost dobijana za eksperimentalnu grupu VSMC tretiranih samo sa trombinom postavljena je kao maksimalni odgovor od 100% proliferacije, pri čemu su apsolutne srednje vrednosti ostalih ekperimentalnih grupa preračunavane u odnosu na nju (100%) i izražavane kao procenat od njegovog odgovora.

4.8. Izolacija ukupnih proteina iz VSMC

Izolacija ukupnih proteina iz VSMC kultura izvođena je u puferu za liziranje sastava: 1% Triton X-100, 10% glicerola, 50 mM TRIS-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA i koktel inhibitora proteaza (Complete Mini Roche, Francuska) uz dodatak 2 mM PMSF (engl. “**Phenylmethanesulphonylfluoride**”) – inhibitora serinskih i cisteinskih proteaza i 2 mM Na-ortovanadata, inhibitora tirozinskih fosfataza. Kulture VSMC inkubirane su 15 minuta na ledu (4 °C) u puferu za liziranje i nakon toga lizirani uzorci su centrifugirani 20 minuta na 14 000 g i temperaturi od 4 °C. Supernatanti su prebacivani u prohlađene epruvete i deljeni u porcije koje su čuvane na -70 °C do daljih analiza.

4.9. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina određivana je upotrebom komercijalnog BCA testa (Pierce, Rockford, IL, SAD), koji se zasniva na biuretskoj reakciji redukcije jona bakra: Cu²⁺ u Cu⁺ od strane proteina, a zatim kolorimetrijskoj detekciji ovako redukovanoj jona bakra pomoću bicinoninične kiseline (BCA, engl. “**Bicinchoninic Acid**”) (Smith i sar., 1985). Merenjem absorbance formiranog produkta reakcije ljubičaste boje na

talasnoj dužini od 562 nm, određivana je koncentracija totalnih proteina u uzorku. Intenzitet boje je proporcionalan koncentraciji ukupnih proteina i izražavan je u [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$].

Postupak je izvođen prema uputstvu proizvođača dodavanjem prvo odgovarajućih razblaženja proteinskih lizata, a potom unapred pripremanog BCA radnog reagensa u odnosu 1:20. Uzorci sa reagensom su nakon 30 sekundi intenzivnog mešanja inkubirani 30 minuta na 37 °C. Posle hlađenja na sobnoj temperaturi određivana je absorbanca na aparatu Biochrom ultrospec II (LKB, Belgija). Koncentracija proteina je određivana na osnovu standardne prave konstruisane na osnovu vrednosti absorbanci, očitavanim za seriju rastvora goveđih serum albumina (BSA; engl. “**Bovine Serum Albumine**“) poznate koncentracije.

4.10. Natrijum dodecil sulfat elektroforeza na poliakrilamidnom gelu

Kao prvi korak u imuno-blot proceduri primenjivana je diskontinuirana poliakrilamid gel elektroforeza (SDS-PAGE, engl. “**Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylAmide Gel Electrophoresis**“) u prisustvu deterdženta natrijum dodecil sulfata. Ova specifična elektroforetska tehnika obezbeđuje razdvajanje proteinskih frakcija u uzorku na osnovu njihove molekulske mase (Laemmli, 1970).

Da bi se postigla visoka rezolucija u razdvajanju proteinskih frakcija primenivana je sistem gradijentnog gela: 4% gel za koncentrovanje (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, akrilamid, bisakrilamid, SDS, amonijumpersulfat (APS), tetrametiletilendiamin (TEMED) i H₂O) i 8% ili 10% gel za razdvajanje (1.5 M Tris-HCl pH 8.8, akrilamid, bisakrilamid, SDS, APS, TEMED i H₂O) kao i dva različita puferska sistema: pufer za uzorkovanje (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 20% glicerola, 0.5% 2- β -mercaptoetanol, 0.1% bromofenol plavo) i pufer za elektroforezu (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicin, 0,1% SDS i H₂O). Elektroforetska separacija proteinskih frakcija izvođena je u Bio-Rad Mini-Protean 3 Cell electrophoresis sistemu za vertikalnu elektroforezu (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, SAD).

Iste zapremine (10 μl ili 20 μl) proteinskih lizata svakog uzorka primarnih VSMC kultura (koncentracije ukupnih proteina 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) su razblaživane sa 5 puta koncentrovanim redukujućim puferom za uzorkovanje, tako da pufer čini 1/5 ukupnog

volumena smeše, a zatim su ove smeše kuvane 5 minuta na 95 °C, kako bi se proteini potpuno denaturisali.

Ovako pripremljeni uzorci su nanošeni u bunariće gela u volumenu od 12.5 µl (50 µg ukupnih proteina), odnosno 25 µl (100 µg ukupnih proteina) i razdvajani SDS-PAGE elektroforezom prvo 15 minuta pri naponu od 100V, a zatim 60 minuta pri naponu od 200V.

Na svaki gel su nanošeni i proteini poznatih molekulskih masa-marker PageRegular™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas, Vilnius, Litvanija), radi lokalizovanja ispitivanih proteina po završetku elektroforeze, prema molekulskoj masi.

4.11. Imuno blot (Western blot)

Neposredno nakon razdvajanja proteina elektroforezom na gelu, izvođena je Imuno blot (Western blot) analiza za detekciju specifičnih proteina u proteinskim lizatima VSMC. Identifikacija ispitivanih proteina u uzorcima je vršena na osnovu reakcije sa specifičnim monoklonskim ili poliklonskim antitelima. S obzirom da se u gelu poliakrilamida ne može izvesti reakcija antigen-antitelo, neophodno je proteine iz gela prebaciti na membranu.

Elektrotransfer razdvojenih proteinskih frakcija sa gelova vršen je na PVDF (engl. "Polyvinyliden Difluoride") membranama, Immobilon-P Transfer Membrane (Millipore, Bilerica, MA, SAD), tokom 1h pri struji intenziteta 250 mA na +4°C, u aparatu za transfer, Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, SAD). Pufer za transfer proteina sadržao je 25 mM Tris-HCl, 192 mM glicin, 20% metanol i H₂O, a efikasnost transfera proteina proverena je bojenjem membrana sa 0.5% rastvorom PonsoS tokom 1 minuta. Po vizuelizaciji crveno obojenih proteinskih traka, membrane su ispirane destilovanom vodom i TBS-T puferom (0.1% Tween 20 u TBS puferu (engl. "Tris-Buffered Saline")), a zatim inkubirane tokom 1 h na sobnoj temperturi, u puferu za blokiranje (5% nemasno mleko u TBS-T puferu ili 5% BSA/TBS-T) kako bi se umanjilo nespecifično vezivanje antitela za PVDF membranu.

Nakon blokiranja, membrane su ispirane TBS-T puferom, a zatim inkubirane preko noći na +4 °C sa primarnim antitelima određene specifičnosti, razblaživanim do odgovarajućih koncentracija u 5% nemasnom mleku u TBS-T ili u 5% BSA/TBS-T. Za

potrebe ovih istraživanja membrane su inkubirane sa sledećim specifičnim antitelima: zečjim anti-fosfo-ERK1/2 (p44/42) uperenim protiv fosforilisane ERK 1/2 pacova (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ i zečjim anti-total-ERK1/2 (p44/42) poliklonskim antitelom ili zečjim anti-fosfoEGFR uperenim protiv fosforilisanog EGFR pacova (Tyr¹⁰⁶⁸) i zečjim anti-total-EGFR poliklonskim antitelom.

Nakon inkubacije sa primarnim antitelima, membrane su ispirane tri puta po 10 minuta, na sobnoj temperaturi, TBS-T puferom, a zatim inkubirane 2h na sobnoj temperaturi sa odgovarajućim sekundarnim antitelom, kozijim anti-zečjim IgG-HRP (HRP, engl. "Horseradish Peroxidase"). Sekundarna antitela razblaživana su do odgovarajućih koncentracija u 5% nemasnom mleku u TBS-T puferu. Nakon inkubacije sa sekundarnim antitelima, membrane su, takođe, ispirane tri puta po 10 minuta, na sobnoj temperaturi, TBS-T puferom.

U slučaju kada su sekundarna antitela bila konjugovana sa HRP, analizirani proteini u uzorku su vizualizovani na autoradiografskom filmu pomoću ECL (engl. "Enhanced Chemiluminescence") reagensa. Metoda se zasniva na reakciji luminiscencije, koja je brza i veoma osetljiva. U prisustvu H₂O₂, peroksidaza katalizuje oksidaciju luminola. Nastali intermedijarni produkt prelazi u stabilnu formu uz emisiju svetlosti koja svetli film. Detekcija se vrši u mračnoj sobi sa crvenom svetlošću. Membrana je postavljena između dve providne folije u kaseti za detekciju (Hypercassette, Amersham Biofarmacia Biotech, Orsay, Francuska), a preko membrane je stavljen film (AGFA, Medical X-ray film, Belgija). Ekspozicija filma je trajala od nekoliko sekundi do nekoliko minuta (zavisno od intenziteta dobijenog signala). Otisci koji su dobijeni na filmu, odgovaraju proteinima membrane za koje su vezana odgovarajuća primarna i sekundarna antitela sa peroksidazom.

Intenzitet signala, odnosno koncentracija ispitivanih proteina, određivani su denzitometrijski. Filmovi su skenirani, a optička gustina detektovanih proteinskih traka kvantifikovana je pomoću računarskog programa Image J 1.37 V. software (<http://rsb.info.nih.gov>). Prosečan broj piksela po otisku uzoraka definisan je kao 1 arbitrarna jedinica (AJ)/μg proteina, a vrednosti dobijene za koncentraciju proteina eksperimentalnih uzoraka poređene su sa kontrolom i izražavane u AJ/μg proteina.

U slučaju kada je na istoj membrani, pored ispitivanog, trebalo detektovati i internu kontrolu kao ukupne ERK1/2 i EGFR (engl. "total ERK1/2, total EGFR")

primenjivano je čišćenje membrane, tj. otklanjanje vezanih primarnih i sekundarnih antitela (engl. “stripping“) određene specifičnosti. U tu svrhu, membrane su inkubirane 10 minuta na sobnoj temperaturi u 0,2 M NaOH. Nakon toga su ispirane pet puta po 10 minuta u puferu TBS-T, te je ponavljanjem Western blot postupka od faze blokiranja, uz upotrebu odgovarajućih specifičnih antitela određivano prisustvo drugog proteina.

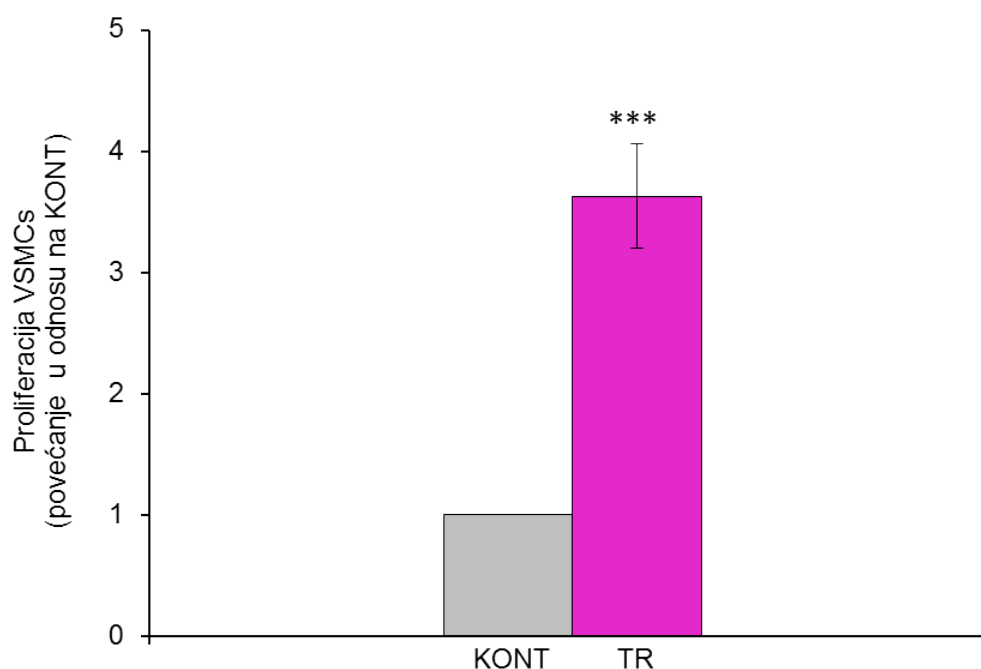
4.12. Statistička obrada i prikaz rezultata

Dobijeni rezultati su izražavani u vidu srednje vrednosti \pm standardne greške merenja (SEM) od n eksperimenata. Svaki eksperiment uključio je posebnu kulturu ćelija. Značajnost nađenih razlika ispitivanih parametara između eksperimentalnih i kontrolnih uzoraka VSMC određivana je pomoću Student-ovog t-testa ili primenom jednodimenzionalne analize varijanse (engl. “one way ANOVA”). Verovatnoća p manja od 0.05 smatrana je statistički značajnom razlikom. Za statističku obradu podataka korišćen je program Sigma XL 6.1 (proizvođač Sigma XL, Toronto, Kanada).

5. REZULTATI

5.1. Efekti trombina na proliferaciju VSMC

Prvi u nizu eksperimenata bili su dizajnirani sa ciljem da se utvrdi da li i u kojoj meri trombin dovodi do proliferacije izolovanih primarnih kultura VSMC. Na **Slici 5.1.** prikazani su rezultati ispitivanja trombina (1 IU/ml) u trajanju od 24 h na nivo proliferacije VSMC pacova. Rezultati su dobijeni metodom merenja količine ugradnje 5 bromo dezoksi uracila u replicirajuću DNK (BrdU test) i pokazuju statistički značajno povećanje proliferacije VSMC od $3,6 \pm 0,4$ puta ($p < 0.001$) kod TR grupe u odnosu na KONT grupu. U ranije objavljenim radovima pokazano je da je proliferativni odgovor VSMC na trombin najizraženiji u periodu od 24-72 h (Fager, 1995; Hsieh i sar., 2009).

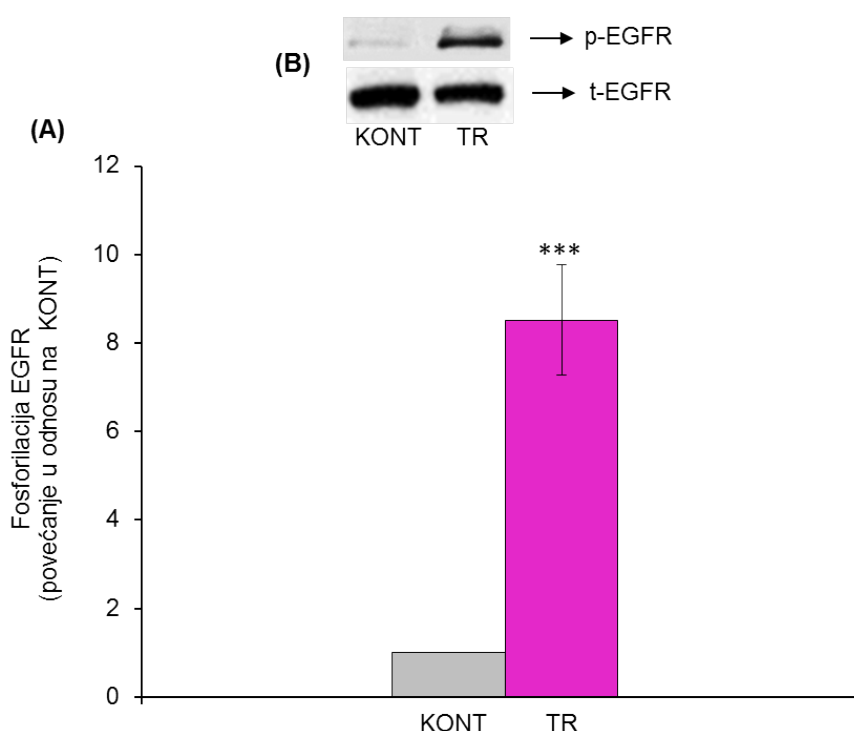


Slika 5.1 Efekti trombina na proliferaciju VSMC. Vrednosti proliferacije izražene su kao povećanje u odnosu na kontrolu i predstavljene su kao aritmetička srednja vrednost \pm SEM ($n=7$). Svaki eksperiment je rađen na posebnoj kulturi ćelija u triplicatu. Legenda: KONT – kontrolna grupa VSMC; TR – VSMC tretirane trombinom. ***Statistički značajna razlika između KONT i TR ($p < 0.001$).

5.2. Efekti trombina na fosforilaciju EGFR receptora u VSMC

Obzirom da smo pokazali da trombin utiče na proliferaciju VSMC, narednim eksperimentima ispitivali smo njegov efekat na fosforilaciju EGFR receptora i ERK1/2 kinaze kao centralnih učesnika prenosa proliferativnog signala u VSMC. Imajući u vidu da je utvrđeno, da se u uslovima eksperimenata koje smo izvodili, vrednost za nivo ukupnog ERK1/2 i EGFR proteina ne menja, fosforilacija ERK1/2 kinaze (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) i EGFR receptora (Tyr¹⁰⁶⁸) je izražavana u odnosu na ukupni nivo ERK1/2 (t-ERK1/2, engl. “total ERK1/2”) i ukupni nivo EGFR receptora (t-EGFR, engl. “total EGFR”). Ovakav način izražavanja rezultata se odnosi i na sve sledeće prikaze rezultata western blotova EGFR i ERK1/2.

Na **Slici 5.2** prikazani su rezultati istraživanja uticaja trombina na fosforilaciju EGFR receptora u VSMC. Inkubacija VSMC pacova sa trombinom (1 IU/ml) tokom pet minuta rezultirala je u statistički značajnom povećanju nivoa fosforilacije EGFR od $8,5 \pm 1,3$ puta ($p < 0.001$) u poređenju sa KONT. Dobijeni rezultat sugerise učešće trombina u transaktivaciji EGFR u VSMC.

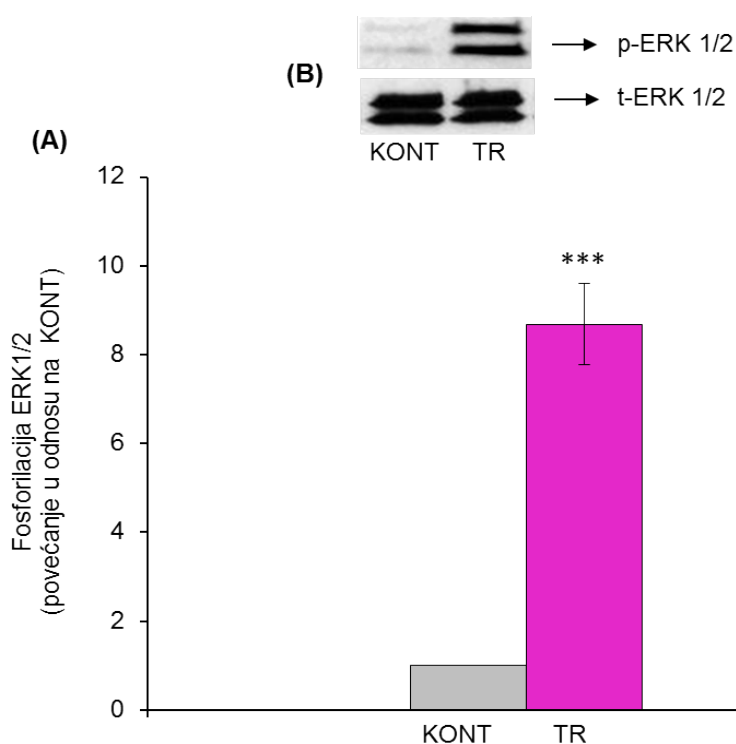


Slika 5.2 Efekti trombina na fosforilaciju EGFR receptora u VSMC. (A) Vrednosti su izražene kao povećanje u odnosu na kontrolu i predstavljene su kao aritmetička srednja vrednost \pm SEM ($n=7$). Svaki eksperiment je rađen na posebnoj kulturi ćelija u triplikatu. (B) Reprezentativni western blot. Legenda: KONT – kontrolna grupa VSMC;

TR – VSMC tretirane trombinom; p-EGFR – fosforilisana forma EGFR; t-EGFR – ukupni EGFR. ***Statistički značajna razlika između KONT i TR ($p < 0.001$).

5.3. Efekti trombina na fosforilaciju ERK1/2 kinaze u VSMC

Rezultati ispitivanja efekata trombina na fosforilaciju ERK1/2 kinaze u VSMC, prikazani su na **Slici 5.3**. Petominutna inkubacija VSMC pacova sa trombinom (1 IU/ml) rezultirala je u statistički značajnom povećanju fosforilacije ERK1/2 od $8,7 \pm 0,9$ puta ($p < 0.001$) u poređenju sa fosforilacijom detektovanom kod KONT. Dobijeni rezultati zajedno sa rezultatima prethodno prikazanim na **Slikama 5.1 i 5.2** ukazuju da u trombinom stimuliranoj proliferaciji VSMC, EGFR receptor i ERK1/2 kinaza mogu imati važnu ulogu, obzirom na statistički značajno povećanje njihove fosforilacije, odnosno aktivacije stimulirane trombinom u VSMC.



Slika 5.3 Efekti trombina na fosforilaciju ERK1/2 kinaze u VSMC. **(A)** Vrednosti su izražene kao povećanje u odnosu na kontrolu i predstavljene su kao aritmetička srednja vrednost \pm SEM ($n=7$). Svaki eksperiment rađen je na posebnoj kulturi ćelija u triplikatu. **(B)** Reprezentativni western blot. Legenda: KONT – kontrolna grupa VSMC; TR – VSMC tretirane trombinom. p-ERK1/2 – fosforilisana forma ERK1/2; t-ERK1/2 – ukupna ERK1/2; ***Statistički značajna razlika između KONT i TR ($p < 0.001$).

5.4. Uloga EGFR u trombinom stimulisanom proliferaciji VSMC

Kako bi se potvrdila uloga fosforilacije EGFR u proliferaciji VSMC (na koju ukazuju rezultati prikazani u poglavljima 5.1-5.2) i izučila međusobna zavisnost transaktivacije EGFR sa njihovom proliferacijom stimulisanom trombinom, primenjena je farmakološka inhibicija EGFR receptora putem njegovih potentnih inhibitora: reverzibilnog AG1478 i ireverzibilnog PD169540. Efekti tih inhibicija posmatrani su na nivou proliferacije VSMC stimulisane trombinom, kao i na nivou, trombinom stimulisane, fosforilacije važnih molekula signalnog proliferativnog puta, EGFR receptora i ERK1/2 kinaze, kako bi se u signalnoj mreži proliferacije rasvetlio njihov međusobni odnos.

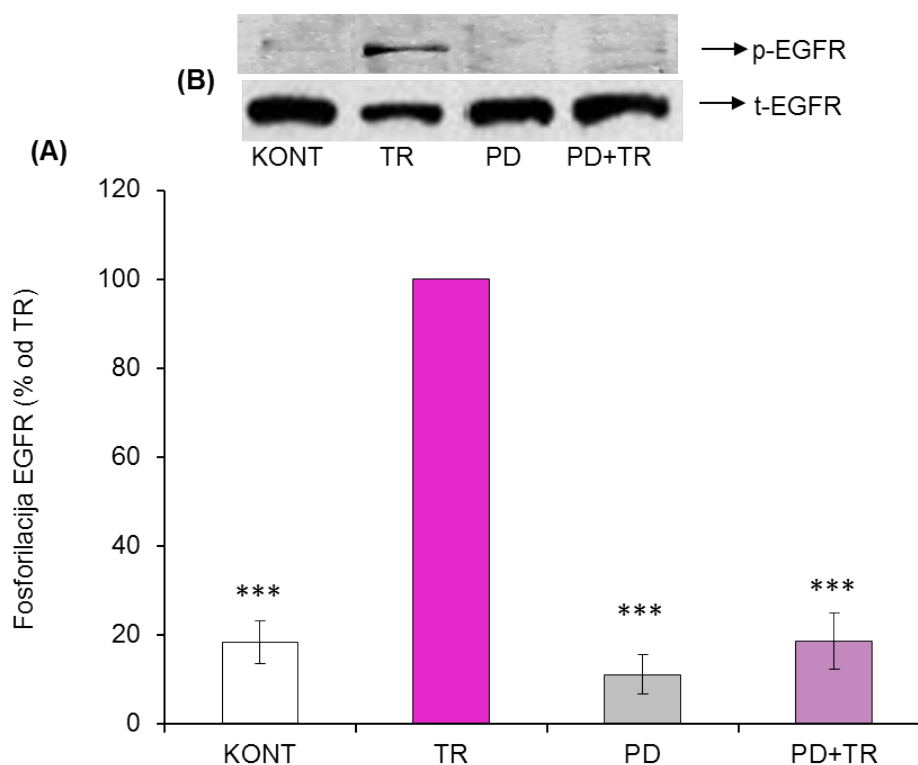
5.4.1. Efekti ireverzibilnog inhibitora PD na trombinom stimulisanu fosforilaciju EGFR, ERK1/2 i proliferaciju VSMC

Prvi u nizu od primenjenih EGFR inhibitora bio je PD169540 (PD). Obzirom da ne postoje prethodno objavljeni podaci o njegovoj upotrebi u VSMC, početni eksperimenti su se odnosili na utvrđivanje maksimalne bezbedne koncentracije PD za rad sa primarnim kulturama VSMC. Tretman VSMC samo sa 10 μ M PD inhibitorom, nije doveo do statistički značajne promene u fosforilaciji EGFR u odnosu na KONT što ukazuje da koncentracija inhibitora od 10 μ M nema toksičan efekat na VSMC (**Slika 5.4.1.1**, KONT= 18 \pm 4%, PD=11 \pm 3%), za razliku od viših koncentracija od 20 μ M PD koje dovode do toksičnog efekta (KONT=19 \pm 3%, PD=3 \pm 1%). Stoga smo u našim daljim eksperimentima koristili PD inhibitor u maksimalnoj koncentraciji od 10 μ M.

Sledeći eksperimenti su ispitali zavisnost stepena inhibicije fosforilacije EGFR od različitih koncentracija PD inhibitora (dozna zavisnost). Međutim, grafički će biti prikazani samo rezultati inhibicija sa maksimalnom bezbednom dozom inhibitora u svim narednim poglavljima.

Polučasovni pretretman trombinom stimulisanih VSMC sa 10 μ M PD, statistički značajno je smanjio fosforilaciju EGFR receptora za 81% (**Slika 5.4.1.1** TR=100%; PD+TR=19 \pm 5%), odnosno na nivo KONT. Statistički značajna inhibicija fosforilacije

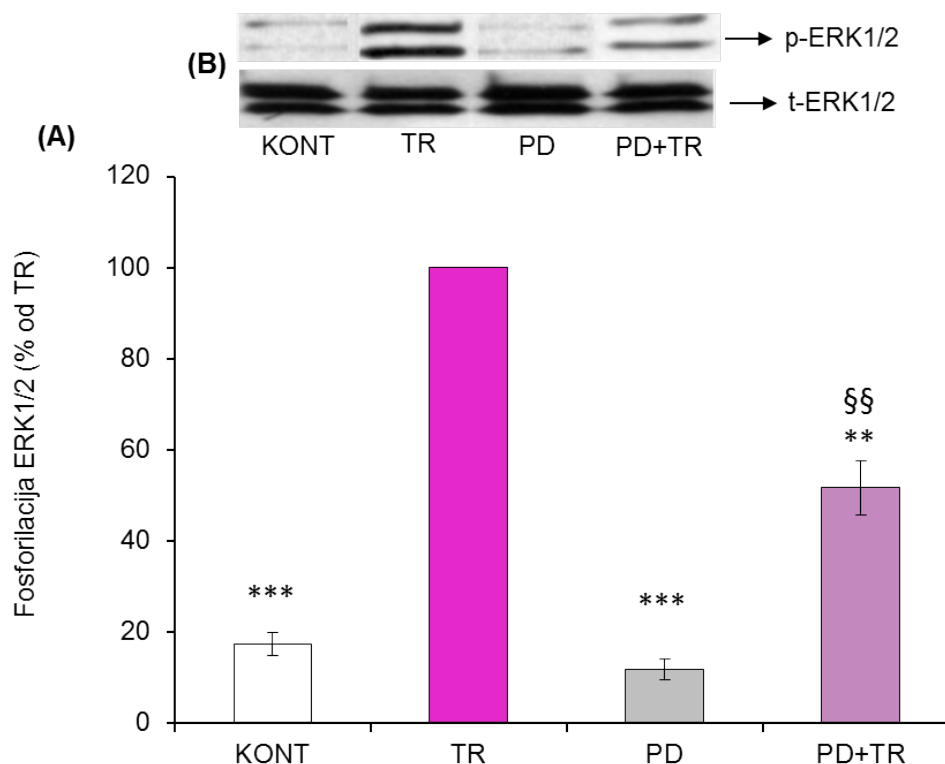
EGFR receptora postignuta je i pri nižim koncentracijama PD inhibitora ($5 \mu\text{M}$ PD, PD+TR=51±7%; TR=100%; $p<0.01$).



Slika 5.4.1.1 Efekat $10 \mu\text{M}$ ireverzibilnog inhibitora PD na fosforilaciju EGFR u VSMC stimulisanu trombinom (A) Vrednosti su izražene kao procenat od vrednosti dobijene za trombin i predstavljene su kao aritmetička srednja vrednost ± SEM ($n=5$). Svaki eksperiment rađen je na posebnoj kulturi ćelija VSMC u triplicatu. (B) Reprerzentativni western blot. Legenda: KONT – kontrolna grupa VSMC; TR – VSMC tretirane trombinom; PD – VSMC tretirane samo sa $10 \mu\text{M}$ PD inhibitorom; PD+TR – VSMC prethodno tretirane sa $10 \mu\text{M}$ PD inhibitorom, potom sa trombinom; p-EGFR – fosforilisana forma EGFR; t-EGFR – ukupni EGFR; ***Statistički značajna razlika u odnosu na TR ($p<0.001$).

U ovom poglavlju sledi prikaz rezultata ispitivanja uticaja inhibitora EGFR receptora, PD, na trombinom stimulisanu fosforilaciju ERK1/2, kako bi rasvetlili njihov odnos u mehanizmu proliferativnog signala. Pretretman VSMC sa $10 \mu\text{M}$ PD, smanjio je statistički značajno fosforilaciju ERK1/2 za 48 % (Slika 5.4.1.2, PD+TR=52±6%; TR=100%). Dobijeni rezultat inhibicije fosforilacije ERK1/2 je takođe statistički značajno različit i od KONT (KONT=18±3%; PD+TR=52±6%; $p<0.01$), što ukazuje na delimičnu inhibiciju. Primena nižih koncentracija istog inhibitora dovela je do

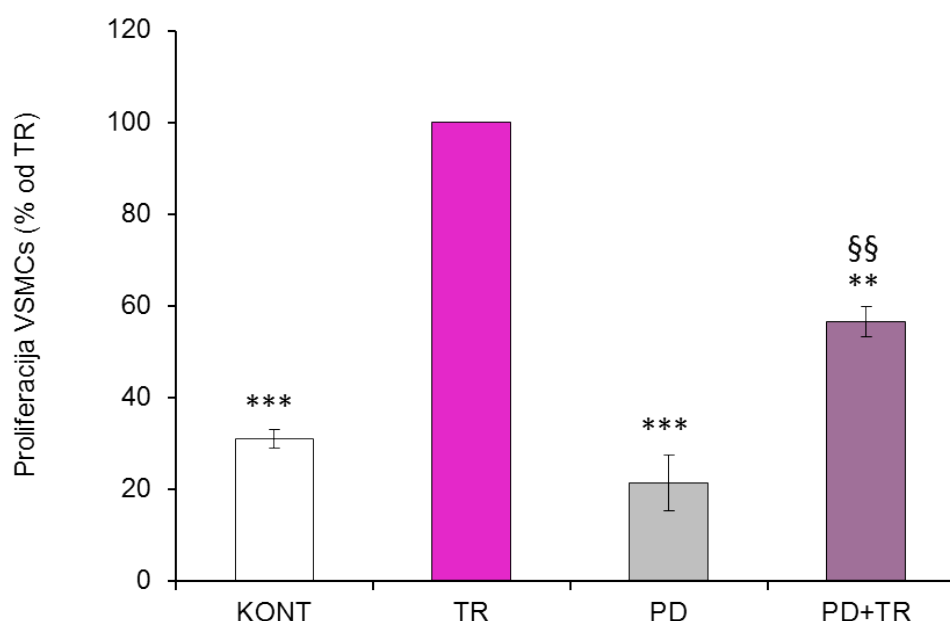
značajnog, parcijalnog smanjenja ERK1/2 fosforilacije u iznosu od 20% (5 μ M PD, PD+TR=80 \pm 11%, $p<0,05$).



Slika 5.4.1.2 Uticaj ireverzibilnog 10 μ M PD inhibitora na fosforilaciju ERK1/2 u VSMC stimulisanu trombinom. (A) Vrednosti su izražene kao procenat od vrednosti za trombin i predstavljene su kao aritmetička srednja vrednost \pm SEM ($n=5$). Svaki eksperiment rađen je na posebnoj kulturi ćelija VSMC u triplikatu. (B) Reprerzentativni western blot. Legenda: KONT – kontrolna grupa VSMC; TR – VSMC tretirane trombinom; PD – VSMC tretirane samo sa 10 μ M PD inhibitorom; PD+TR – VSMC prvobitno tretirane sa 10 μ M PD inhibitorom, potom sa trombinom; p-ERK1/2 – fosforilisana forma ERK1/2; t-ERK1/2 – ukupna ERK1/2; ***Statistički značajna razlika u odnosu na TR ($p<0.001$). **Statistički značajna razlika u odnosu na TR ($p<0.01$). §§ Statistički značajna razlika između KONT i PD+TR ($p<0.01$).

Trombinom stimulisana proliferacija VSMC značajno je smanjena nakon polučasovnog pretretmana sa 10 μ M PD inhibitorom u iznosu od 44% (Slika 5.4.1.3, PD+TR=56 \pm 3%, TR=100%), što ukazuje na parcijalnu prirodu inhibicije obzirom na statistički značajno veću vrednost proliferacije PD+TR grupe u odnosu na KONT (Slika 5.4.1.3, KONT=31 \pm 2%; PD+TR=56 \pm 3%; $p<0.01$). Statistički značajna inhibicija

proliferacije VSMC od 40% postignuta je i pri nižim koncentracijama PD inhibitora (5 μ M PD, PD+TR=60 \pm 6%; TR=100% ; p<0.01).



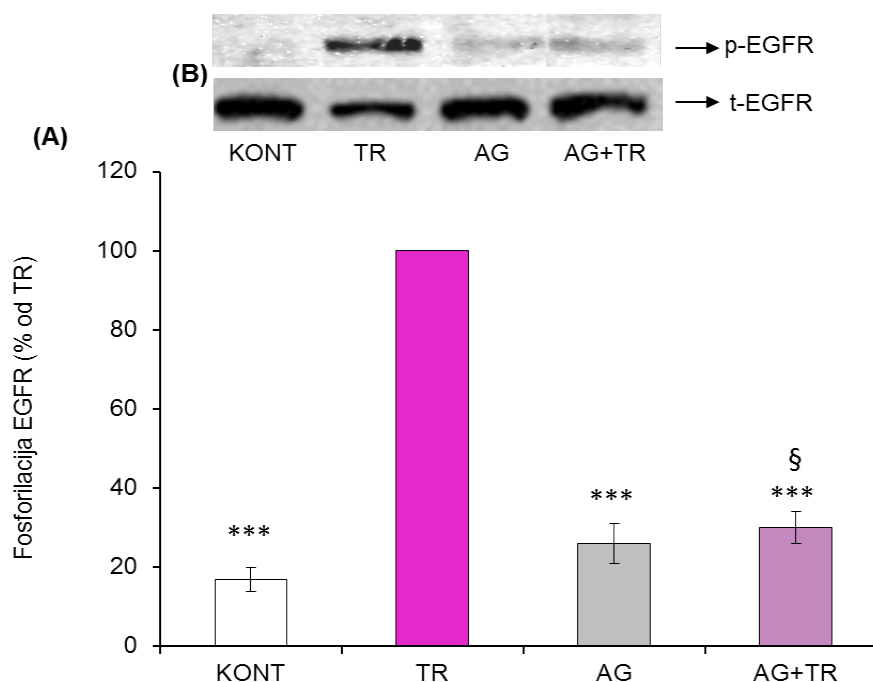
Slika 5.4.1.3 Efekat 10 μ M ireverzibilnog inhibitora PD na trombinom stimulisanu proliferaciju VSMC. Vrednosti DNK sinteze na osnovu BrdU testa su izražene kao procenat od vrednosti dobijene za trombin i predstavljene su kao aritmetička srednja vrednost \pm SEM (n=6). Svaki eksperiment je rađen na posebnoj kulturi ćelija VSMC u triplikatu. Legenda: KONT – kontrolna grupa VSMC; TR – VSMC tretirane trombinom; PD – VSMC tretirane samo sa 10 μ M PD inhibitorom; PD+TR – VSMC prvobitno tretirane sa 10 μ M PD inhibitorom, potom sa trombinom. ***Statistički značajna razlika u odnosu na TR (p<0.001). **Statistički značajna razlika u odnosu na TR (p<0.01). §§ Statistički značajna razlika između KONT i PD+TR (p<0.01).

5.4.2. Efekti reverzibilnog inhibitora AG1478 na trombinom stimulisanu fosforilaciju EGFR, ERK1/2 i proliferaciju VSMC

AG1478 (AG), poznatiji kao tirfostin spada u dobro proučene potentne reverzibilne inhibitore EGFR receptora (Bublil i sar., 2007; Dreux i sar., 2006). U našim eksperimentima smo poredili njegov uticaj na inhibiciju fosforilacije EGFR i ERK1/2, kao i na proliferaciju VSMC stimulisane trombinom sa novim, ireverzibilnim inhibitorom PD169540. Prethodno smo utvrdili da je maksimalna doza AG inhibitora 20 μ M, ona koja je bezbedna za ispitivane primarne kulture (KONT=18 \pm 4%;

AG=25±6%). Stoga smo u našim daljim ispitivanjima zavisnosti fosforilacije EGFR, ERK1/2 i proliferacije VSMC od različitih koncentracija AG, koristili maksimalnu koncentraciju AG inhibitora od 20 μM.

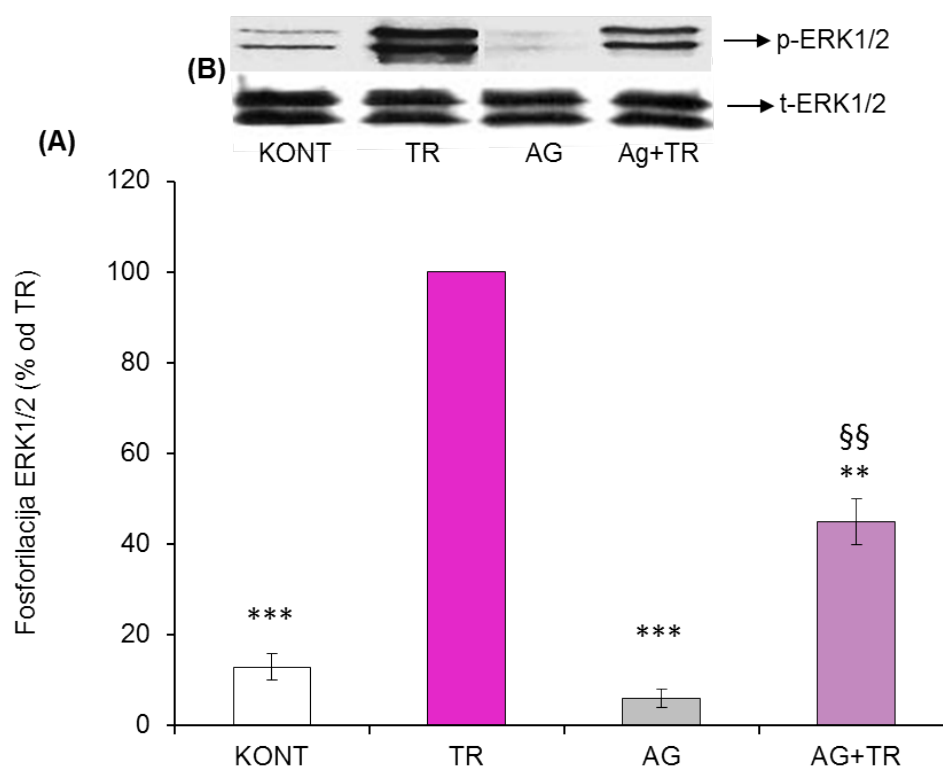
Na **Slici 5.4.2.1** su prikazani rezultati ispitivanja efekata inhibicije trombinom stimulisane fosforilacije EGFR receptora u VSMC. Pretretman VSMC sa 20 μM AG statistički značajno je smanjio za 70% fosforilaciju EGFR (**Slika 5.4.2.1**, TR=100%; AG+TR=30±4%). Statistički značajno smanjenje fosforilacije EGFR receptora postignuto je i pri nižoj koncentraciji AG inhibitora u iznosu od 65% (10 μM AG, AG+TR=35±4%; TR=100%; p<0.01). Rezultati takođe ukazuju da primena ove maksimalne koncentracije inhibitora nije dovela do potpune blokade fosforilacije EGFR, već do parcijalne inhibicije obzirom na malu ali statistički značajnu razliku u odnosu na KONT grupu (**Slika 5.4.2.1**, KONT=17±3%; AG+TR=30±4%; p<0.05), što iznenađuje obzirom na druge literaturne podatke koji svedoče o potpunoj inhibiciji EGFR pri koncentracijama AG inhibitora većim od 10 μM (Bobe i sar., 2003 {Kalmes, 2000 #78}).



Slika 5.4.2.1 Efekat 20 μM reverzibilnog inhibitora AG na trombinom stimulisanu fosforilaciju EGFR u VSMC. (A) Vrednosti su izražene kao procenat od vrednosti za trombin i predstavljene su kao aritmetička srednja vrednost ± SEM (n=5). Svaki eksperiment je rađen na posebnoj kulturi ćelija VSMC u triplikatu. (B) Reprezentativni western blot. Legenda: KONT – kontrolna grupa VSMC; TR – VSMC tretirane

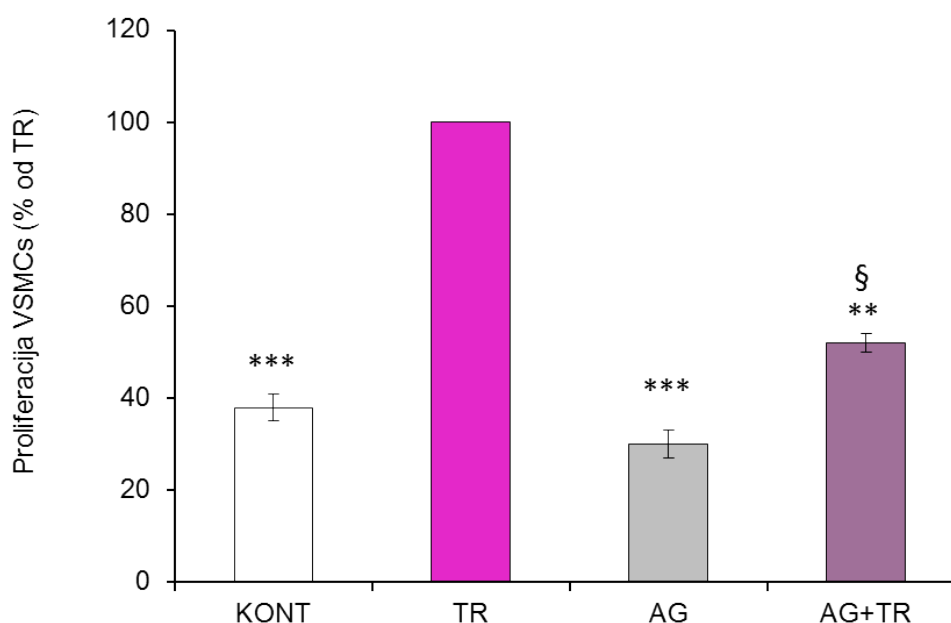
trombinom; AG – VSMC tretirane samo sa 20 μ M AG inhibitorom; AG+TR – VSMC prethodno tretirane sa 20 μ M AG inhibitorom, potom sa trombinom; p-EGFR – fosforilisana forma EGFR; t-EGFR – ukupni EGFR; ***Statistički značajna razlika u odnosu na TR ($p < 0.001$). § Statistički značajna razlika između KONT i AG+TR ($p < 0.05$).

Pretretman VSMC sa 20 μ M AG značajno je smanjio fosforilaciju ERK1/2 u iznosu od 55% (Slika 5.4.2.2, AG+TR=45 \pm 5%; TR=100%). Takođe se uočava i to da je fosforilacija ERK1/2 bila značajno veća u odnosu na KONT (Slika 5.4.2.2, KONT=13 \pm 3%; AG+TR=45 \pm 5%; $p < 0.01$) što ukazuje na parcijalni karakter inhibicije fosforilacije ERK1/2 stimulisane trombinom.



Slika 5.4.2.2 Uticaj 20 μ M reverzibilnog AG inhibitora na trombinom stimulisanu fosforilaciju ERK1/2 u VSMC. (A) Vrednosti su izražene kao procenat od vrednosti dobijene za trombin i predstavljene su kao aritmetička srednja vrednost \pm SEM ($n=4$). Svaki eksperiment rađen je na posebnoj kulturi ćelija VSMC u triplikatu. (B) Reprezentativni western blot. Legenda: KONT – kontrolna grupa VSMC; TR – VSMC tretirane trombinom; AG – VSMC tretirane samo sa 20 μ M AG inhibitorom; AG+TR – VSMC prethodno tretirane sa 20 μ M AG inhibitorom, potom sa trombinom; p-ERK1/2 – fosforilisana forma ERK1/2; t-ERK1/2 – ukupna ERK1/2; ***Statistički značajna razlika u odnosu na TR ($p < 0.001$). **Statistički značajna razlika u odnosu na TR ($p < 0.01$). §§ Statistički značajna razlika između KONT i AG+TR ($p < 0.01$).

Slika 5.4.2.3 pokazuje isti trend kao prethodna slika kada je u pitanju ispitivanje AG inhibitora na proliferaciju glatkih mišićnih ćelija aorte. AG inhibitor je za 48% smanjio trombinom stimulisanu proliferaciju (AG+TR=52±2%; TR=100%) i priroda ove inhibicije je takođe delimična (**Slika 5.4.2.3**, KONT=39±3; AG+TR=52±1; $p<0.05$), kao i u slučaju PD inhibitora. Primena nižih koncentracija AG inhibitora dovodi do statistički značajnog smanjenja proliferacije VSMC u odnosu na TR (1 μM AG, AG+TR=83±1%, $p<0.05$; 5 μM AG, AG+TR=69±1%; 10 μM AG, AG+TR=57±1%; $p<0.01$).



Slika 5.4.2.3 Efekat 20 μM reverzibilnog AG inhibitora na trombinom stimulisanu proliferaciju VSMC. Vrednosti DNK sinteze na osnovu BrdU testa su izražene kao procenat od vrednosti dobijene za trombin i predstavljene su kao aritmetička srednja vrednost \pm SEM (n=5). Svaki eksperiment rađen je na posebnoj kulturi ćelija VSMC u triplikatu. Legenda: KONT – kontrolna grupa VSMC; TR – VSMC tretirane trombinom; AG – VSMC tretirane samo sa 20 μM AG inhibitorom; AG+TR – VSMC prethodno tretirane sa 20 μM AG inhibitorom, potom sa trombinom. ***Statistički značajna razlika u odnosu na TR ($p<0.001$). **Statistički značajna razlika u odnosu na TR ($p<0.01$). § Statistički značajna razlika između KONT i AG+TR ($p<0.05$).

Rezultati prikazani u poglavljima 5.4.1 i 5.4.2 ukazuju, između ostalog, da je fosforilacija ERK1/2 kinaze bitna u signalnom putu proliferacije VSMC koji vodi od EGFR, obzirom da je primena njegovih potentnih ireverzibilnih (PD) i reverzibilnih (AG) inhibitora statistički značajno smanjila fosforilaciju ERK1/2 kinaze. Analizirajući

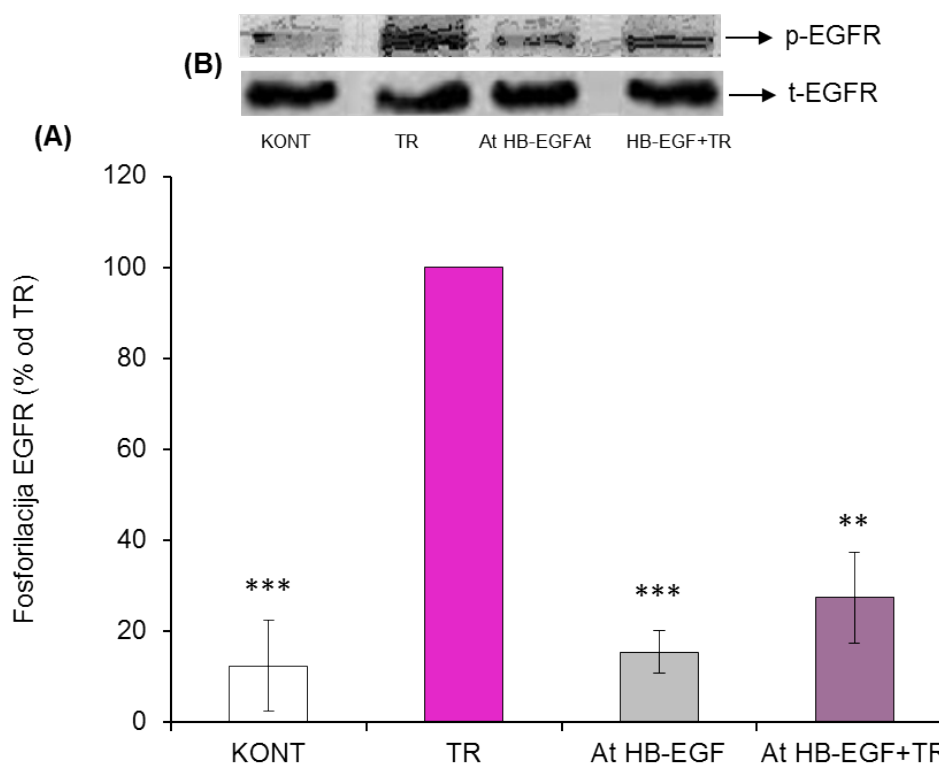
dobijene rezultate oba poglavlja, uočava se da su u trendu inhibicija fosforilacije ERK1/2 i proliferacije VSMC u odnosu na inhibiciju fosforilacije EGFR. Naime, ireverzibilni 10 μ M PD inhibitor je za **44%** smanjio proliferaciju VSMC, za **48%** smanjio ERK1/2 fosforilaciju i za 81% fosforilaciju EGFR. Reverzibilni 20 μ M AG inhibitor je za **48%** smanjio VSMC proliferaciju, za **55%** smanjio fosforilaciju ERK1/2 i za 70% fosforilaciju EGFR.

5.5. Uloga HB-EGF u regulaciji trombinom stimulisanе proliferacije VSMC

Prethodno prikazani rezultati (**Slike 5.4.1.3 i 5.4.2.3**) ukazali su na značaj samog EGFR receptora na proliferaciju VSMC, što nas je navelo na istraživanje uticaja inhibicije drugih članova trostruke kaskade transaktivacije EGFR na proliferaciju VSMC stimulisanu trombinom. Stoga je ispitivan efekat inhibicije HB-EGF, liganda aktivatora EGFR, sa anti HB-EGF monoklonskim antitelom na trombinom stimulisanu fosforilaciju EGFR, ERK1/2 i proliferaciju VSMC. Inicijalnim eksperimentima određena je maksimalna bezbedna koncentracija antitela od 20 μ M za rad sa VSMC i primenjena u daljim ispitivanjima zavisnosti stepena inhibicije od primenjene koncentracijene antitela. Grafički su prikazani samo rezultati sa maksimalnom bezbednom koncentracijom HB-EGF neutrališućeg antitela.

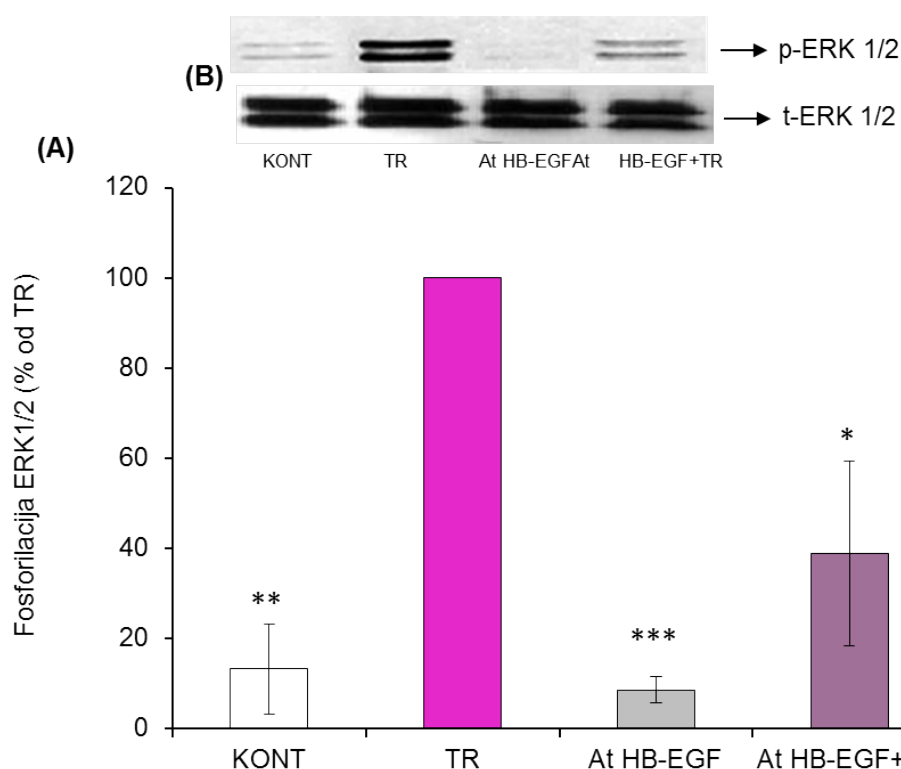
5.5.1. Efekat inhibicije HB-EGF na trombinom stimulisanu fosforilaciju EGFR, ERK1/2 i proliferaciju VSMC

Na **Slici 5.5.1.1** prikazani rezultati ispitivanja efekta anti HB-EGF monoklonskog antitela na trombinom stimulisanu fosforilaciju EGFR receptora u VSMC. Polusatni pretretman VSMC sa antitelom uperenim protiv HB-EGF (At HB-EGF), doveo je do statistički značajnog smanjenja fosforilacije EGFR u iznosu od 72% (At HB-EGF+TR=28 \pm 10%; TR=100% ; p<0.01), odnosno do potpune inhibicije fosforilacije EGFR stimulisanе trombinom, obzirom da ne postoji statistički značajna razlika između At HB-EGF+TR i KONT grupe (**Slika 5.5.1.1**).



Slika 5.5.1.1 Efekat 20 μM anti-HB-EGF monoklonskog antitela na trombinom stimulisano fosforilaciju EGFR u VSMC. (A) Vrednosti su izražene kao procenat od vrednosti dobijene za trombin i predstavljene su kao aritmetička srednja vrednost \pm SEM (n=4). Svaki eksperiment rađen je na posebnoj kulturi ćelija VSMC u triplicatu. (B) Reprezentativni western blot. Legenda: KONT – kontrolna grupa VSMC; TR – VSMC tretirane trombinom; At HB-EGF - VSMC tretirane samo sa 20 μM At HB-EGF; At HB-EGF+TR - VSMC prethodno tretirane sa 20 μM At-HB-EGF a potom sa trombinom; p-EGFR – fosforilisana forma EGFR; t-EGFR – ukupni EGFR; ***Statistički značajna razlika u odnosu na TR ($p < 0.001$). **Statistički značajna razlika u odnosu na TR ($p < 0.01$).

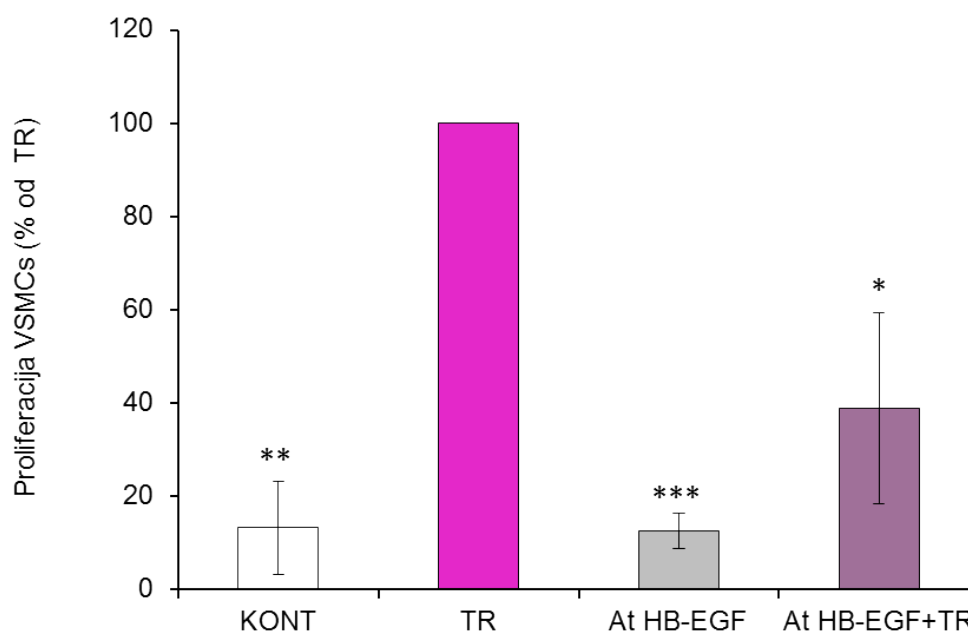
Na **Slici 5.5.1.2** je prikazan rezultat ispitivanja efekta inhibicije HB-EGF sa anti HB-EGF monoklonskim antitelom na nivo fosforilacije ERK1/2 kinaze u VSMC stimulisanim trombinom. Pretretman VSMC sa 20 μM monoklonskim antitelom uperenim protiv HB-EGF, doveo je do statistički značajnog smanjenja trombinom stimulisane fosforilacije ERK1/2 u iznosu od 61 % (**Slika 5.5.1.2**, At HB-EGF=39 \pm 20%; TR=100%).



Slika 5.5.1.2 Efekat 20 μM anti-HB-EGF monoklonskog antitela (At-HB-EGF) na trombinom stimulanu fosforilaciju ERK1/2 kinaze u VSMC. (A) Vrednosti su izražene kao procenat od vrednosti dobijene za trombin i predstavljene su kao aritmetička srednja vrednost \pm SEM ($n=4$). Svaki eksperiment rađen je na posebnoj kulturi ćelija VSMC u triplikatu. (B) Reprerentativni western blot. Legenda: KONT – kontrolna grupa VSMC; TR – VSMC tretirane trombinom; At HB-EGF - VSMC tretirane samo sa 20 μM At-HB-EGF; At HB-EGF+TR - VSMC prvobitno tretirane sa 20 μM At-HB-EGF, potom sa trombinom; p-ERK1/2 – fosforilisana forma ERK1/2; t-ERK1/2 – ukupna ERK1/2; ***Statistički značajna razlika u odnosu na TR ($p<0.001$). **Statistički značajna razlika u odnosu na TR ($p<0.01$). *Statistički značajna razlika u odnosu na TR ($p<0.05$).

Pretretman VSMC 20 μM anti-HB-EGF monoklonskim antitelom je za 45% smanjio trombinom stimulanu proliferaciju VSMC (Slika 5.5.1.3, At HB-EGF+TR=55 \pm 11%; TR=100%). Karakter ove inhibicije je parcijalan i u trendu sa rezultatima prikazanim na Slikama 5.4.1.3 i 5.4.2.3. Dobijeni rezultati govore u prilog pozitivne uloge HB-EGF u aktivaciji EGFR i proliferaciji VSMC stimulisanih trombinom, kao i to da se ovi efekti u proliferaciji VSMC ostvaruju u značajnoj meri

fosforilacijom ERK1/2 kinaze što je u skladu sa prethodno prikazanim rezultatima (Slike 5.4.1.2 i 5.4.2.2).



Slika 5.5.1.3 Efekat 20 μ M anti-HB-EGF monoklonskog antitela (At-HB-EGF) na trombinom stimulisanoj proliferaciji VSMC. Vrednosti DNK sinteze na osnovu BrdU testa su izražene kao procenat od vrednosti dobijene za trombin i predstavljene su kao aritmetička srednja vrednost \pm SEM (n=4). Svaki eksperiment rađen je na posebnoj kulturi ćelija VSMC u triplikatu. Legenda: KONT – kontrolna grupa VSMC; TR – VSMC tretirane trombinom; At HB-EGF - VSMC tretirane samo 20 μ M At-HB-EGF; At HB-EGF+TR - VSMC prvobitno tretirane sa 20 μ M At-HB-EGF, potom sa trombinom; ***Statistički značajna razlika u odnosu na TR (p<0.001). **Statistički značajna razlika u odnosu na TR (p<0.01). *Statistički značajna razlika u odnosu na TR (p<0.05).

5.6. Uloga metaloproteinaza (MP) u regulaciji proliferacije VSMC stimulisane trombinom

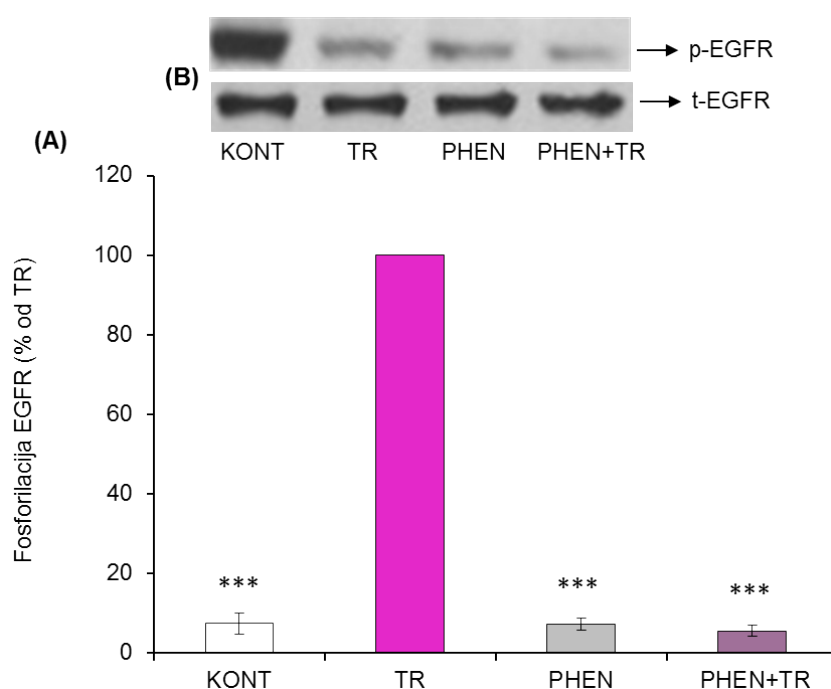
Obzirom da su prethodni rezultati ukazali na učešće HB-EGF liganda u trombinom stimulisanoj aktivaciji EGFR receptora i ERK 1/2 kinaze, kao i proliferacije VSMC, postavilo se pitanje ko je odgovoran za HB-EGF oslobađanje proteolitičkim cepanjem sa membrane VSMC. Iz literature je poznato da ADAM i MMP potklase cink MP (Prenzel i sar., 1999), učestvuju u ovom koraku, ali su nepoznati su identiteti

metaloproteinaza u trombinom stimulisanomj transaktivaciji EGFR receptora i proliferaciji VSMC.

Ispitivanje uloge MP u proliferaciji VSMC započeli smo sa dva inhibitora: *o*-fenantrolinom (PHEN), koji se zbog svog spektra dejstva van MMP potklase smatra i inhibitorom ukupnih MP (Stix i sar., 2001) i GM6001 (GM), mnogo korišćenim inhibitorom matriksnih metaloproteinaza (MMP) (Nishino i sar., 1978). Njihove maksimalne bezbedne koncentracije za dalji rad sa VSMC u dozno-zavisnom režimu, ispitane su u uvodnim eksperimentima i iznose 5 mM i 50 μ M za PHEN i GM, respektivno. Grafički prikazi rezultata koji slede odnose se na ove maksimalne koncentracije pomenutih inhibitora a deo ostalih rezultata dat je u tekstu.

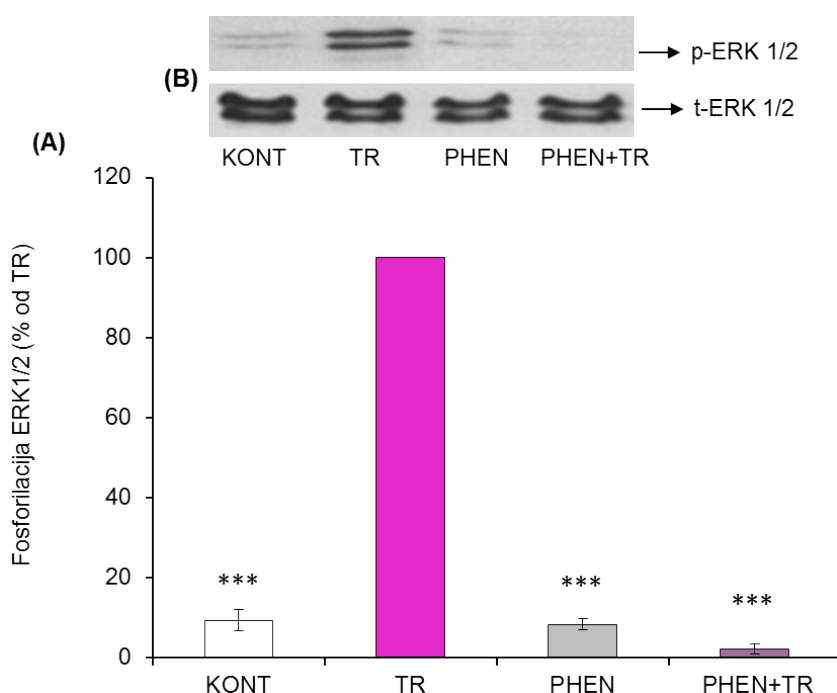
5.6.1. Uticaj PHEN inhibitora ukupnih MP na trombinom stimulisanu fosforilaciju EGFR i ERK1/2 i proliferaciju VSMC

U nastavku istraživanja na **Slici 5.6.1.1** prikazan je uticaj inhibicije aktivnosti ukupnih MP na trombinom stimulisanu fosforilaciju EGFR receptora u VSMC. Tretman VSMC sa 5 mM *o*-fenantrolinom, (PHEN) inhibitorom, značajno je smanjio fosforilaciju EGFR u iznosu od 94 % (PHEN+TR=6 \pm 1%; TR=100%). Ovaj rezultat potpune inhibicije govori u prilog značajnom učešću ukupnih cink MP u regulaciji trombinom stimulisane fosforilacije EGFR receptora u VSMC.



Slika 5.6.1.1 Efekat 5 mM PHEN inhibitora na trombinom stimulisano fosforilaciju EGFR u VSMC. (A) Vrednosti su izražene kao procenat od vrednosti dobijene za trombin i predstavljene su kao aritmetička srednja vrednost \pm SEM (n=6). Svaki eksperiment rađen je na posebnoj kulturi ćelija VSMC u triplicatu. (B) Reprerentativni western blot. Legenda: KONT – kontrolna grupa VSMC; TR – VSMC tretirane trombinom; PHEN - VSMC tretirane samo 5 mM PHEN inhibitorom; PHEN+TR - VSMC prvobitno tretirane sa 5 mM PHEN inhibitorom, potom sa trombinom; p-EGFR – fosforilisana forma EGFR; t-EGFR – ukupni EGFR; ***Statistički značajna razlika u odnosu na TR (p<0.001).

Rezultat daljeg istraživanja uticaja inhibicije aktivnosti ukupnih cink metaloproteinaza na trombinom stimulisano fosforilaciju ERK1/2 kinaze u VSMC prikazan je na **Slici 5.6.1.2**. Tretman glatkih mišićnih ćelija aorte PHEN-om pola sata pre trombina za 97% je smanjio fosforilaciju ERK1/2 kinaze u poređenju sa ćelijama tretiranih samo trombinom (PHEN+TR=3 \pm 1%; TR=100%). Potpuna inhibicija ukazuje na značajnu ulogu ovih enzima u regulaciji trombinom stimulisane fosforilacije ERK1/2 kinaze u VSMC.

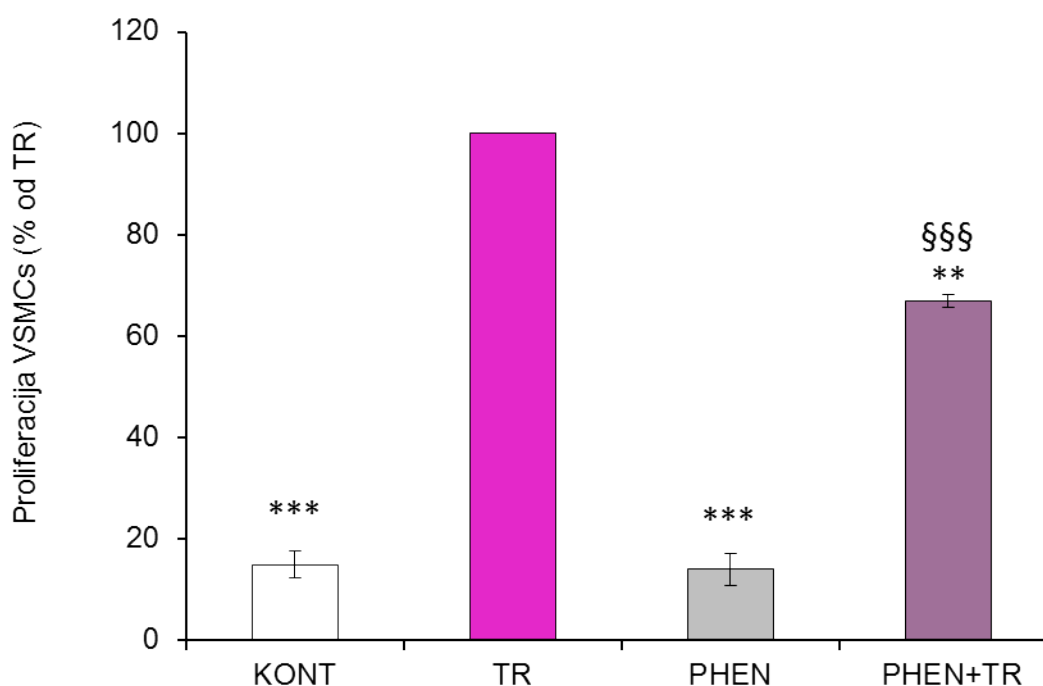


Slika 5.6.1.2 Efekat 5 mM PHEN inhibitora na trombinom stimulisanu fosforilaciju ERK1/2 u VSMC. (A) Vrednosti su izražene kao procenat od vrednosti dobijene za trombin i predstavljeni su kao aritmetička srednja vrednost \pm SEM (n=5). Svaki eksperiment rađen je na posebnoj kulturi ćelija VSMC u triplicatu. (B) Reprzentativni western blot. Legenda: KONT – kontrolna grupa VSMC; TR – VSMC tretirane trombinom; PHEN - VSMC tretirane samo 5 mM PHEN inhibitorom; PHEN+TR - VSMC prvobitno tretirane sa 5 mM PHEN inhibitorom, potom sa trombinom; p-ERK1/2 – fosforilisana forma ERK1/2; t-ERK1/2 – ukupna ERK1/2; ***Statistički značajna razlika u odnosu na TR ($p < 0.001$).

U sledećem eksperimentu ispitivan je uticaj PHEN inhibitora na proliferaciju VSMC stimulisanu trombinom i pokazano je da je ovaj inhibitor doveo je do statistički značajnog 33% smanjenja trombinom stimulisanu proliferaciju VSMC (Slika 5.6.1.3, PHEN+TR=67 \pm 1%; TR=100%). Takođe dobijeni rezultat ukazuje na parcijalnu prirodu inhibicije trombinom stimulisanu proliferaciju VSMC obzirom na statistički značajno veću vrednost proliferacije PD+TR grupe u odnosu na KONT grupu (Slika 5.6.1.3, KONT=16 \pm 2%; PD+TR=67 \pm 1%; $p < 0.001$).

Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodnim rezultatima prikazanim na Slikama 5.6.1.1 i 5.6.1.2 i pokazuju da inhibicija aktivnosti ukupnih cink MP uzrokuje

signifikantnu i potpunu inhibiciju fosforilacije EGFR i ERK1/2, a takođe dovodi i do delimične ali značajne redukcije trombinom stimulisane proliferacije VSMC.

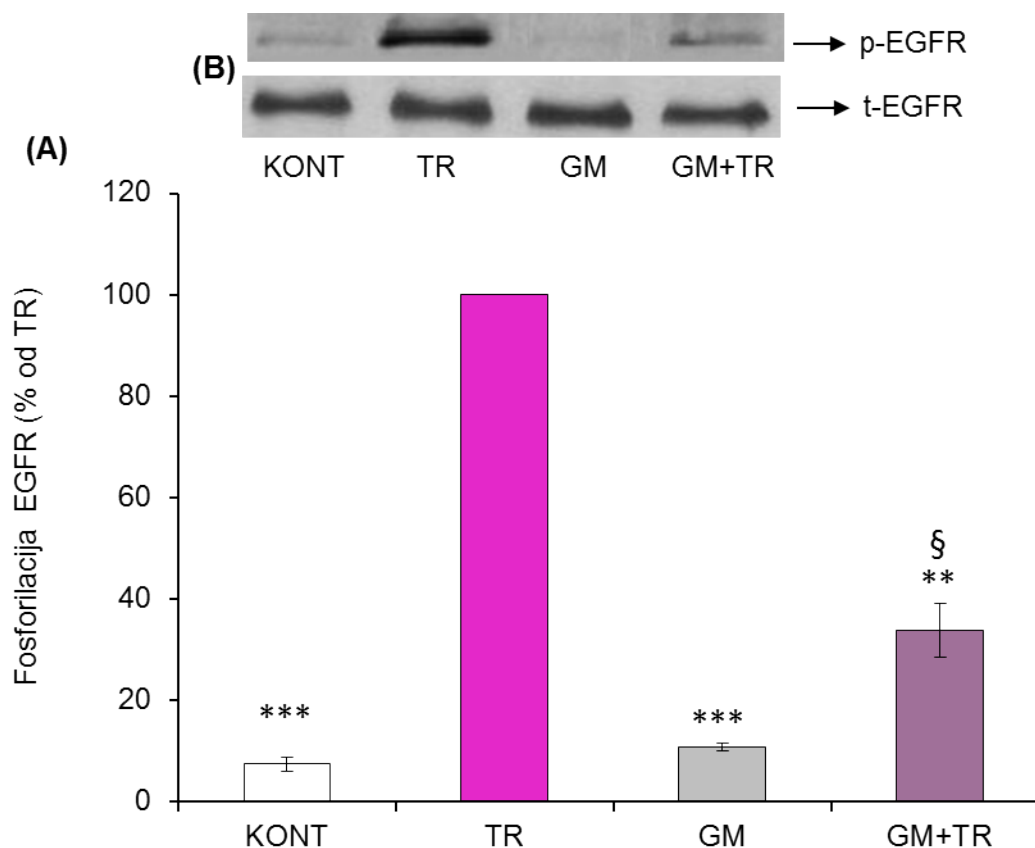


Slika 5.6.1.3 Efekat 5 mM PHEN inhibitora na proliferaciju VSMC. Vrednosti DNK sinteze na osnovu BrdU testa su izražene kao procenat od vrednosti dobijene za trombin i predstavljene su kao aritmetička srednja vrednost \pm SEM ($n=6$). Svaki eksperiment rađen je na posebnoj kulturi ćelija VSMC u triplikatu. Legenda: KONT – kontrolna grupa VSMC; TR – VSMC tretirane trombinom; PHEN - VSMC tretirane samo sa 5 mM PHEN inhibitorom; PHEN+TR - VSMC prvobitno tretirane sa 5 mM PHEN inhibitorom, potom sa trombinom. ***Statistički značajna razlika u odnosu na TR ($p<0.001$). **Statistički značajna razlika u odnosu na TR ($p<0.01$). §§§ Statistički značajna razlika između KONT i PHEN+TR ($p<0.001$).

5.6.2. Uticaj GM inhibitora ukupnih MMP na trombinom stimulisanu fosforilaciju EGFR i ERK1/2 i proliferaciju VSMC

Kako se na **Slici 5.6.2.1** može videti 50 μ M inhibitor GM značajno je umanjio za 66% trombinom stimulisanu fosforilaciju EGFR (**Slika 5.6.2.1**, GM+TR=34 \pm 5%; TR=100%). Takođe, na **Slici 5.6.2.1** se uočava da primena inhibitora dovodi do delimične inhibicije fosforilacije EGFR stimulisane trombinom, obzirom da postoji statistički značajna razlika između GM+TR grupe i KONT grupe (KONT=8 \pm 1%;

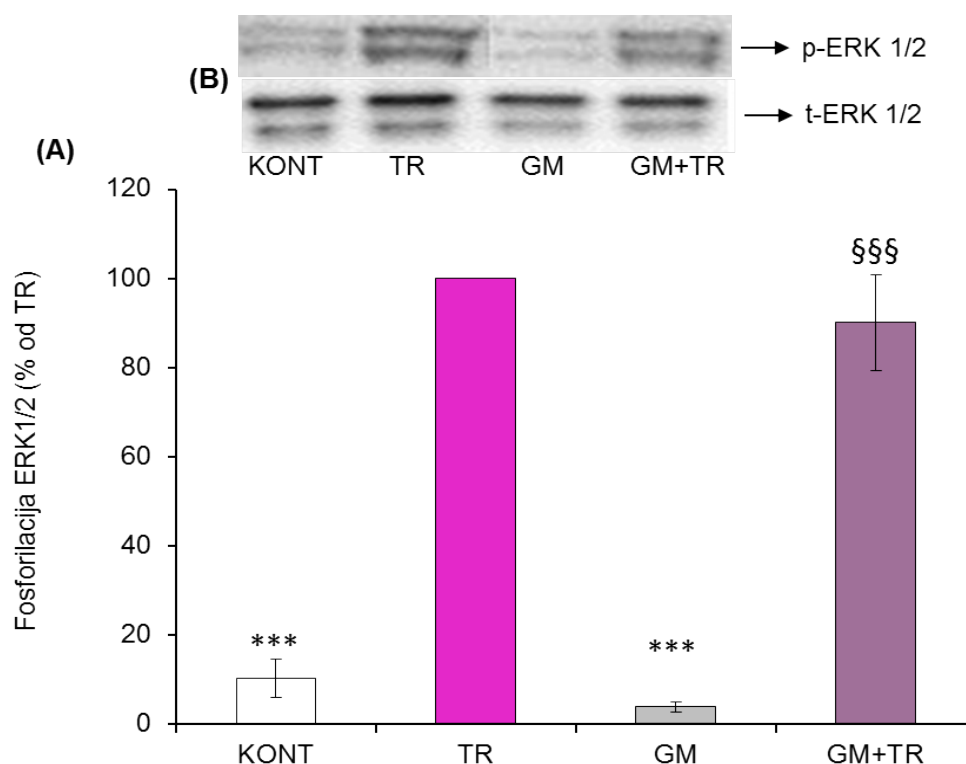
GM+TR=34±5%; $p<0.05$). Primena nižih koncentracija GM inhibitora dovela je takođe, do statistički značajnog smanjenja fosforilacije EGFR u odnosu na TR grupu (10 μ M GM, GM+TR=57±5%; TR=100%; $p<0.05$). Dobijeni rezultati ukazuju na učešće MMP u regulaciji trombinom stimulisane fosforilacije EGFR u VSMC.



Slika 5.6.2.1 Efekat 50 μ M GM inhibitora na trombinom stimulisanu fosforilaciju EGFR u VSMC. (A) Vrednosti su izražene kao procenat od vrednosti dobijene za trombin i predstavljene su kao aritmetička srednja vrednost \pm SEM ($n=4$). Svaki eksperiment rađen je na posebnoj kulturi ćelija VSMC u triplikatu. (B) Reprezentativni western blot. Legenda: KONT – kontrolna grupa VSMC; TR – VSMC tretirane trombinom; GM - VSMC tretirane samo 50 μ M GM inhibitorom; GM+TR - VSMC prethodno tretirane 50 μ M GM inhibitorom, potom sa trombinom; p-EGFR – fosforilisana forma EGFR; t-EGFR – ukupni EGFR; ***Statistički značajna razlika u odnosu na TR ($p<0.001$). **Statistički značajna razlika u odnosu na TR ($p<0.01$). § Statistički značajna razlika između KONT i GM+TR ($p<0.05$).

Za razliku od svih prethodno prikazanih rezultata potpune ili delimične inhibicije fosforilacije ERK1/2, GM inhibitor nije značajno uticao na trombinom

stimulisanu fosforilaciju ERK1/2 (**Slika 5.6.2.2**, GM+TR=90±11%; TR=100%). Dobijeni rezultati ukazuju da ERK1/2 ne igraju značajnu ulogu u MMP posredovanoj fosforilaciji EGFR stimulisanom trombinom u VSMC i u suprotnosti su kako sa prethodno prikazanim rezultatima vezanim za ERK1/2 tako i sa literaturnim (Hsieh i sar., 2008; Ichiki i sar., 2004).

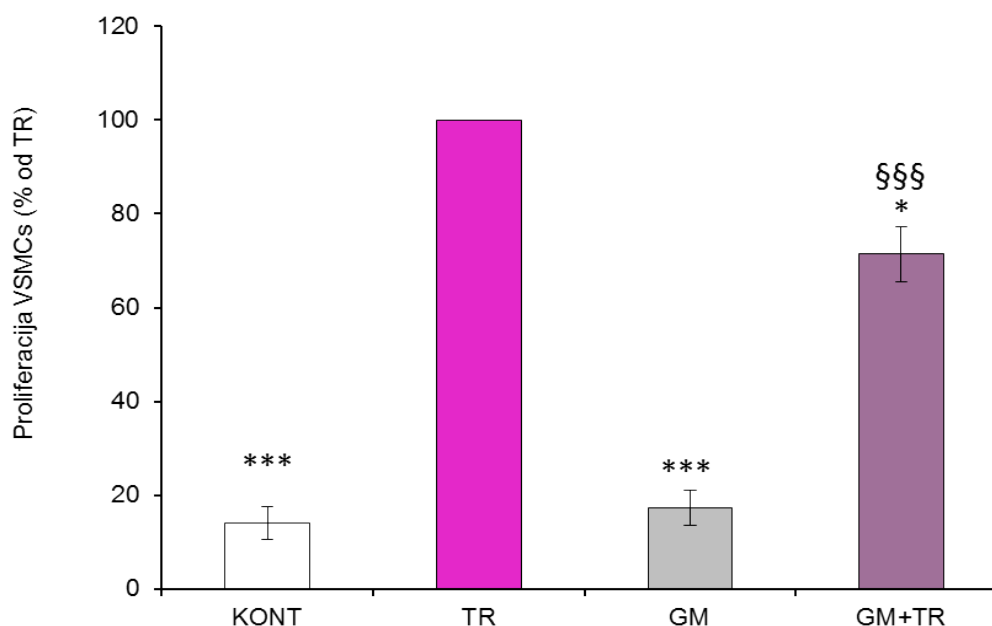


Slika 5.6.2.2 Efekat 50 μ M GM inhibitora na trombinom stimulisanu fosforilaciju ERK1/2 u VSMC. **(A)** Vrednosti su izražene kao procenat od vrednosti dobijene za trombin i predstavljene su kao aritmetička srednja vrednost \pm SEM (n=4). Svaki eksperiment je rađen na posebnoj kulturi ćelija VSMC u triplikatu. **(B)** Reprezentativni western blot. Legenda: KONT – kontrolna grupa VSMC; TR – VSMC tretirane trombinom; GM6001 - VSMC tretirane samo 50 μ M GM inhibitorom; GM+TR - VSMC prethodno tretirane 50 μ M GM inhibitorom, potom sa trombinom; p-ERK1/2 – fosforilisana forma ERK1/2; t-ERK1/2 – ukupna ERK1/2; ***Statistički značajna razlika u odnosu na TR (p<0.001). §§§ Statistički značajna razlika između KONT i GM+TR (p<0.001).

Ispitivan je i efekat GM inhibitora MMP na proliferaciju VSMC stimulisanu trombinom. Kako se na na **Slici 5.6.2.3** može videti primena 50 μ M inhibitora GM pola sata pre trombina za 30% je smanjila proliferaciju VSMC (GM+TR=70±6%;

TR=100%). Priroda ove inhibicije je takođe delimična (Slika 5.6.2.3, KONT=15±3%; GM+TR=70±6%; $p<0.001$).

Dobijeni rezultati ukazuju da MMP utiču na proliferaciju VSMC pod delovanjem trombina, a postavlja se pitanje koje MMP učestvuju u transdukciji proliferativnog signala VSMC stimulisanih trombinom.



Slika 5.6.2.3 Efekat 50 μ M GM inhibitora na proliferaciju VSMC. Vrednosti DNK sinteze na osnovu BrdU testa su izražene kao procenat od vrednosti dobijene za trombin i predstavljene su kao aritmetička srednja vrednost \pm SEM ($n=5$). Svaki eksperiment rađen je na posebnoj kulturi ćelija VSMC u triplikatu. Legenda: KONT – kontrolna grupa VSMC; TR – VSMC tretirane trombinom; GM - VSMC tretirane samo 50 μ M GM inhibitorom; GM+TR - VSMC prethodno tretirane 50 μ M GM inhibitorom, potom sa trombinom. ***Statistički značajna razlika u odnosu na TR ($p<0.001$). *Statistički značajna razlika u odnosu na TR ($p<0.05$). §§§ Statistički značajna razlika između KONT i GM+TR ($p<0.001$).

5.7. Uloga MMP-2 u regulaciji proliferacije VSMC pod delovanjem trombina

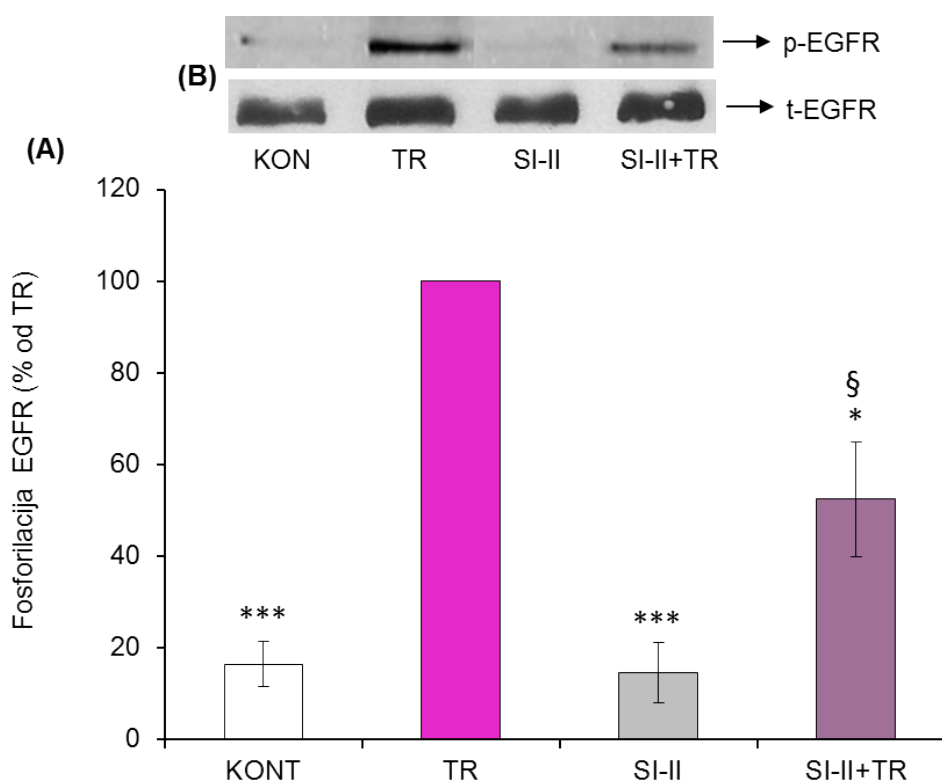
Prethodno dobijeni rezultati ukazuju na učešće opštih MMP kako na fosforilaciju EGFR, tako i na proliferaciju VSMC stimulisanu trombinom (Slike 5.6.2.1 i 5.6.2.3). Literaturni podaci (Newby, 2006(Huang i sar., 2009)) i naša ranije objavljena

istraživanja (Smiljanici sar., 2011) suzila su izbor ispitivanja MMP članova koji učestvuju u trombinom stimulisanjoj proliferaciji VSMC, na želatinaze, MMP-2 i MMP-9. Naša istraživanja usmerili smo prema MMP-2, i za početak odredili maksimalnu bezbednu dozu specifičnog inhibitora II MMP-2 (SI-II) za rad sa VSMC od 10 μ M. U daljim ekperimentima dozne zavisnosti inhibitora na stepen inhibicije fosforilacije EGFR, ERK1/2 i proliferacije VSMC stimulisane trombinom korišćen je koncentracioni opseg od 0,1 μ M do 10 μ M SI-II, a grafički su prikazani samo rezultati sa najvišom 10 μ M koncentracijom.

5.7.1. Efekat SI-II specifičnog inhibitora MMP-2 na trombinom stimulisanu fosforilaciju EGFR, ERK1/2 i proliferaciju VSMC

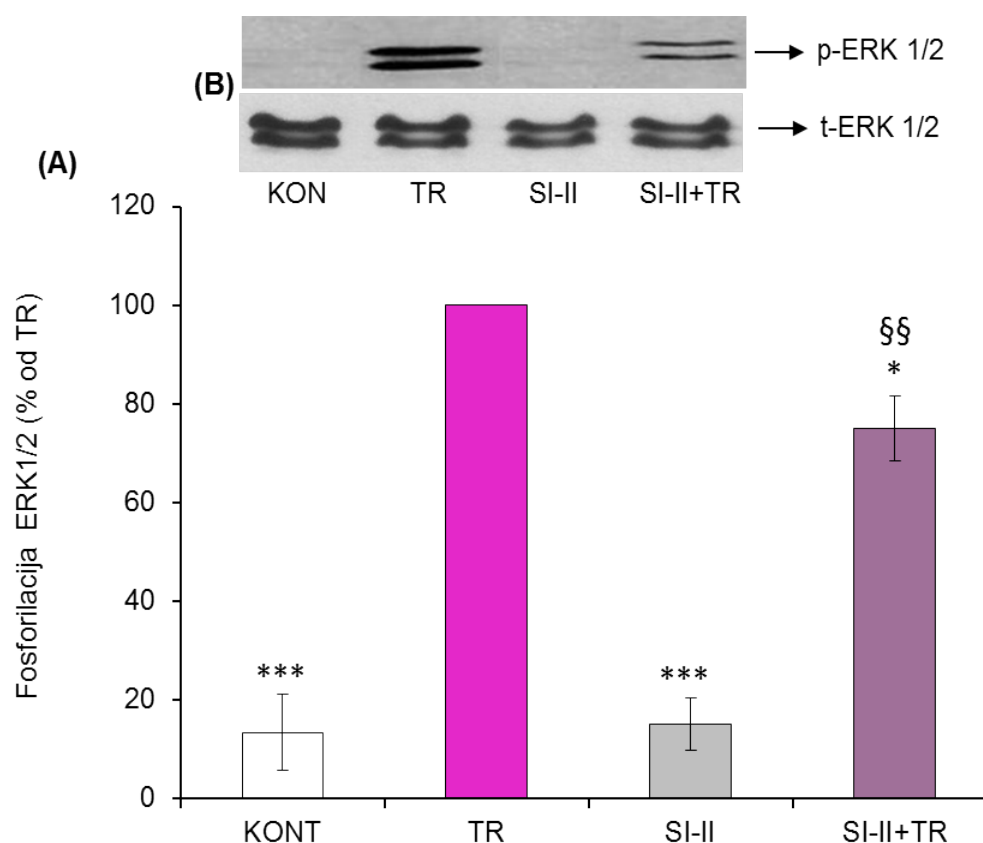
SI-II inhibitor predstavlja visoko selektivan i potentan inhibitor MMP-2 nove generacije, bez objavljenih rezultata o njegovoj primeni u VSMC. Pretretman VSMC sa 10 μ M SI-II u trajanju od 30 minuta, potom sa trombinom (1 IU/ml) u trajanju od 5 minuta, doveo je do značajnog statističkog smanjanjenja trombinom stimulisane fosforilacije EGFR u iznosu od 47% (**Slika 5.7.1**, SI-II+TR=53 \pm 13%; TR=100%).

Sa **Slike 5.7.1** se takođe, uočava da su dobijeni rezultati inhibicije fosforilacije EGFR stimulisane trombinom kod SI-II+TR grupe u iznosu od 47%, statistički značajno veći od KONT grupe (KONT=17 \pm 4; SI-II+TR=53 \pm 13% ; $p < 0.05$), što govori o parcijalnom karakteru inhibicije, a što može da znači da MMP-2 nije jedina metaloproteinaza koja cepa HB-EGF i time aktivira EGFR receptor.



Slika 5.7.1 Uticaj 10 μ M SI-II inhibitora MMP-2 na trombinom stimulisanu fosforilaciju EGFR u VSMC. (A) Vrednosti su izražene kao procenat od vrednosti dobijene za trombin i predstavljene su kao aritmetička srednja vrednost \pm SEM (n=4). Svaki eksperiment je rađen na posebnoj kulturi ćelija VSMC u triplikatu. (B) Reprezentativni western blot. Legenda: KONT – kontrolna grupa VSMC; TR – VSMC tretirane trombinom; SI-II - VSMC tretirane samo 10 μ M SI-II inhibitorom; SI-II+TR - VSMC prethodno tretirane 10 μ M SI-II inhibitorom, potom sa trombinom; p-EGFR – fosforilisana forma EGFR; t-EGFR – ukupni EGFR; ***Statistički značajna razlika u odnosu na TR ($p < 0.001$). *Statistički značajna razlika u odnosu na TR ($p < 0.05$). § Statistički značajna razlika između KONT i SI-II+TR ($p < 0.05$).

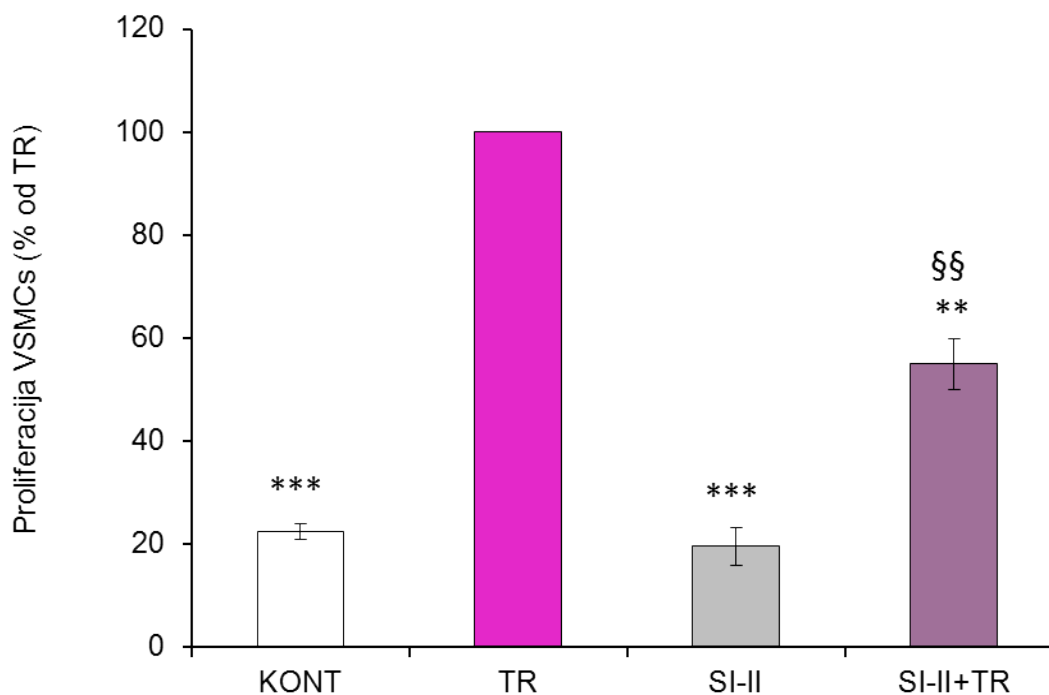
Ispitivan je i uticaj istog inhibitora na fosforilaciju ERK1/2 i na **Slici 5.7.2** pokazano je da je on statistički značajno smanjio trombinom stimulisanu fosforilaciju ERK1/2 u iznosu od 25 % (SI-II+TR=75 \pm 6%; TR=100%). Sa **Slike 5.7.2** se takođe uočava da se radi o delimičnoj inhibiciji (KONT=14 \pm 7; SI-II+TR=75 \pm 6% ; $p < 0.01$). Dobijeni rezultati ukazuju da MMP-2, pored učešća u regulaciji fosforilacije EGFR, takođe ima ulogu u regulaciji trombinom stimulisane fosforilacije ERK1/2 kinaze u VSMC.



Slika 5.7.2 Uticaj 10 μM SI-II inhibitora MMP-2 na trombinom stimulisanu fosforilaciju ERK1/2 u VSMC. (A) Vrednosti su izražene kao procenat od vrednosti dobijene za trombin i predstavljene su kao aritmetička srednja vrednost \pm SEM (n=4). Svaki eksperiment je rađen na posebnoj kulturi ćelija VSMC u triplicatu. (B) Reprerentativni western blot. Legenda: KONT – kontrolna grupa VSMC; TR – VSMC tretirane trombinom; SI-II - VSMC tretirane samo 10 μM SI-II inhibitorom; SI-II+TR - VSMC prethodno tretirane 10 μM SI-II inhibitorom, potom sa trombinom; p-ERK1/2 – fosforilisana forma ERK1/2; t-ERK1/2 – ukupna ERK1/2; ***Statistički značajna razlika u odnosu na TR ($p < 0.001$). *Statistički značajna razlika u odnosu na TR ($p < 0.05$). §§ Statistički značajna razlika između KONT i SI-II+TR ($p < 0.01$).

SI-II inhibitor (10 μM) smanjio je značajno, ali delimično proliferaciju glatkih mišićnih ćelija aorte za 45 % (Slika 5.7.3, SI-II+TR=55 \pm 5%; KONT=22 \pm 1%;TR=100%). Rezultati ispitivanja efekata inhibicije aktivnosti MMP-2 na trombinom stimulisanu proliferaciju VSMC su u trendu sa rezultatima inhibicije fosforilacije EGFR (Slika 5.7.1.).

Niže koncentracije inhibitora dovele su, takođe, do statistički značajnog delimičnog smanjenja proliferacije VSMC (0,5 μ M SI-II, 15%; 1 μ M SI-II, 30%; 5 μ M SI-II, 37%). Rezultati prikazani na **Slikama 5.7.1, 5.7.2 i 5.7.3** idu u prilog bitnoj ulozi koju MMP-2 ima kako u regulaciji proliferacije VSMC tako i u regulaciji fosforilacije EGFR i ERK1/2, glavnih aktera proliferativnog puta VSMC pod delovanjem trombina.



Slika 5.7.3 Uticaj 10 μ M SI-II inhibitora MMP-2 na proliferaciju VSMC stimulisanu trombinom. Vrednosti DNK sinteze na osnovu BrdU testa su izražene kao procenat od vrednosti dobijene za trombin i predstavljene su kao aritmetička srednja vrednost \pm SEM (n=5). Svaki eksperiment je rađen na posebnoj kulturi ćelija VSMC u triplikatu. Legenda: KONT – kontrolna grupa VSMC; TR – VSMC tretirane trombinom; SI-II - VSMC tretirane samo 10 μ M SI-II inhibitorom; SI-II+TR - VSMC prethodno tretirane sa 10 μ M SI-II inhibitorom, potom sa trombinom; ***Statistički značajna razlika u odnosu na TR (p<0.001). **Statistički značajna razlika u odnosu na TR (p<0.01). §§ Statistički značajna razlika između KONT i SI-II+TR (p<0.01).

5.8. Uloga ADAM 12 u regulaciji proliferacije VSMC pod delovanjem trombina

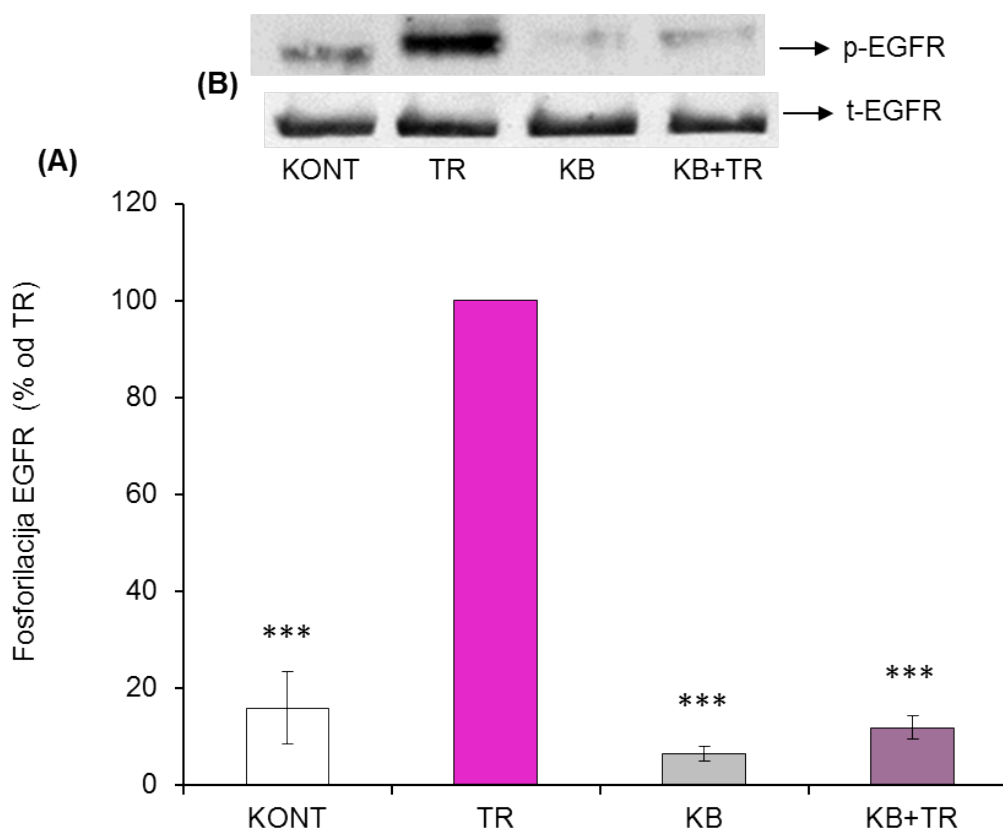
Iz prethodnih rezultata o ulozi MMP i MMP-2 u transaktivaciji EGFR i proliferaciji VSMC jasno je da u ovim procesima stimulisanim trombinom, učestvuje

još neka grupa metaloproteinaza, obzirom da su farmakološki inhibitori MMP i MMP-2 samo delimično inhibirali fosforilaciju EGFR receptora. Takođe, iz literature je poznato da ADAM nose epitet ključnih proteolitičkih makazica prekursora HB-EGF (Ohtsu i sar., 2006b), a da li neki član ADAM familije učestvuje u trombinom stimulisanom proliferaciji bez obzira na vrstu ćelija, pa i VSMC, za sada je nepoznato. Obzirom da je ADAM 12 označen kao « vinovnik » hipertrofije miokarda, izabrali smo KB –R7785, specifični inhibitor ADAM 12, koji u opsegu od 0,1 – 10 μ M pokazuje selektivnost samo ka ADAM 12, a pri višim koncentracijama i ka ADAM 17 (Asakura i sar., 2002; Ichikawa i sar., 2004; Okada i sar., 2008).. Najviša bezbedna koncentracija KB za rad sa primarnim kulturama VSMC određena je u preliminarnim ekperimentima i iznosi 50 μ M. I u ovom slučaju, iz dozno zavisnih eksperimenata grafički će biti prikazani rezultati sa ovom najvišom netoksičnom koncentracijom, a u tekstu će biti izneti i drugi važni rezultati inhibicije sa nižim koncentracijama KB inhibitora od 5 i 10 μ M koje odgovaraju opsegu stroge selektivnosti ka ADAM 12.

5.8.1. Efekti KB inhibitora ADAM 12 na trombinom stimulisanu fosforilaciju EGFR, ERK1/2 i proliferaciju VSMC

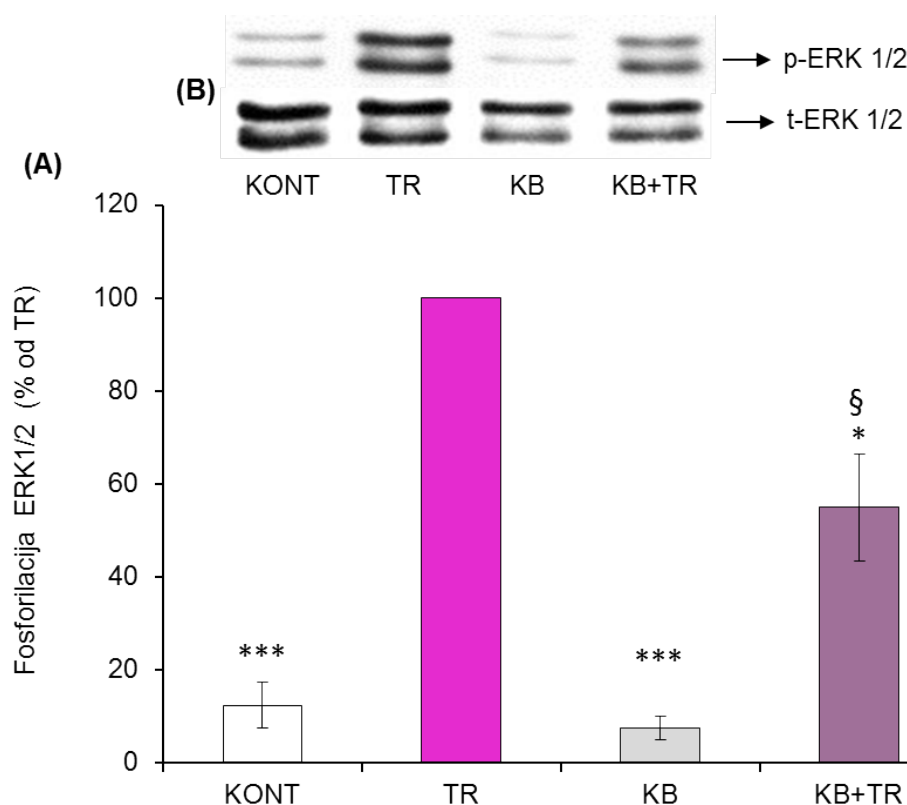
Rezultati ispitivanja efekata 5 i 10 μ M KB inhibitora na trombinom stimulisanu fosforilaciju EGFR u VSMC pokazuju statistički značajno, delimično smanjenje u iznosu od 35% i 47% (KB5+TR=65 \pm 4%; KB10+TR=53 \pm 5%; TR=100% ; p<0.01). Isti inhibitor ali 50 μ M, za 88% je smanjio fosforilaciju EGFR stimulisanu trombinom (Slika 5.8.1, KB+TR=12 \pm 2%; TR=100%), svodeći je na nivo kontrole.

Dobijeni rezultati inhibicije fosforilacije EGFR od strane KB inhibitora, nedvosmisleno ukazuju na važnu ulogu koju ADAM 12 ima u transaktivaciji EGFR u VSMC stimulisanim trombinom.



Slika 5.8.1 Uticaj 50 μM KB inhibitora na trombinom stimulisanu fosforilaciju EGFR u VSMC. (A) Vrednosti su izražene kao procenat od vrednosti dobijene za trombin i predstavljene su kao aritmetička srednja vrednost \pm SEM ($n=5$). Svaki eksperiment je rađen na posebnoj kulturi ćelija VSMC u triplikatu. (B) Reprerentativni western blot. Legenda: KONT – kontrolna grupa VSMC; TR – VSMC tretirane trombinom; KB - VSMC tretirane samo 50 μM KB inhibitorom; KB+TR - VSMC prethodno tretirane sa 50 μM KB inhibitorom, potom sa trombinom; p-EGFR – fosforilisana forma EGFR; t-EGFR – ukupni EGFR; ***Statistički značajna razlika u odnosu na TR ($p<0.001$).

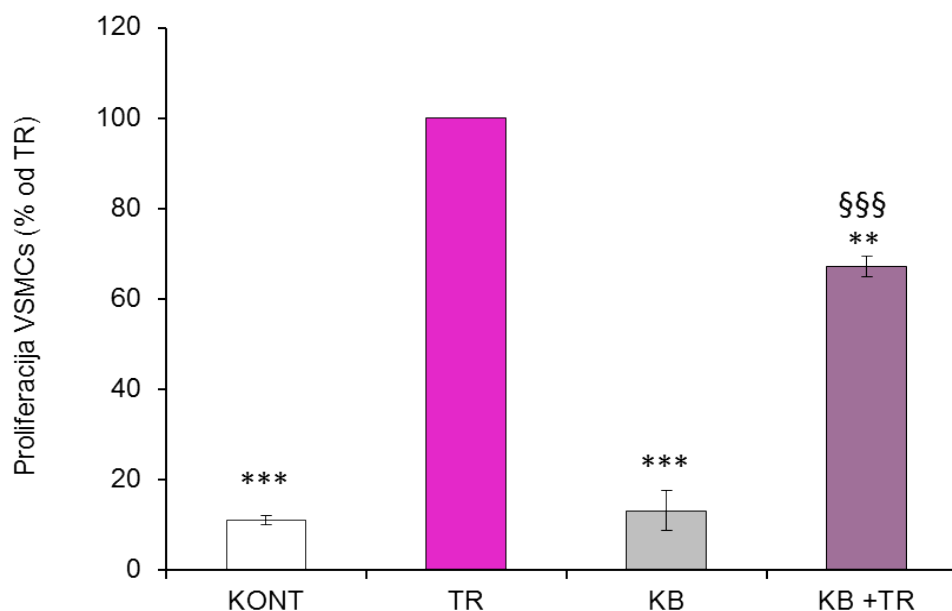
Statistički značajno sniženje od 19% i 25% trombinom stimulisane fosforilacije ERK1/2, dobijeno je pri koncentracijama KB inhibitora od 5 i 10 μM KB, respektivno ($p<0.05$). Pretretman VSMC sa 50 μM smanjio je fosforilaciju ERK1/2 za 45% (Slika 5.8.2, KB+TR=55 \pm 11%; TR=100%). Dobijeni rezultati ukazuju na parcijalnu inhibiciju ERK1/2 fosforilacije, obzirom da je ona značajno povećanja u odnosu na KONT grupu (Slika 5.8.2, KONT=13 \pm 4% ; KB+TR=55 \pm 11%; $p<0.05$), što ukazuje da ADAM 12 utiče na regulaciju trombinom stimulisane fosforilacije ERK1/2 kinaza u VSMC.



Slika 5.8.2 Uticaj 50 μM KB inhibitora na trombinom stimulisanu fosforilaciju ERK1/2 kinaze u VSMC. **(A)** Vrednosti su izražene kao procenat od vrednosti dobijene za trombin i predstavljene su kao aritmetička srednja vrednost \pm SEM ($n=5$). Svaki eksperiment rađen je na posebnoj kulturi ćelija VSMC u triplicatu. **(B)** Reprerzentativni western blot. Legenda: KONT – kontrolna grupa VSMC; TR – VSMC tretirane trombinom; KB - VSMC tretirane samo 50 μM KB inhibitorom; KB+TR - VSMC prethodno tretirane 50 μM KB inhibitorom, potom sa trombinom; p-ERK1/2 – fosforilisana forma ERK1/2; t-ERK1/2 – ukupna ERK1/2; ***Statistički značajna razlika u odnosu na TR ($p<0.001$). *Statistički značajna razlika u odnosu na TR ($p<0.05$). § Statistički značajna razlika između KONT i KB+TR ($p<0.05$).

Rezultati efekata inhibicije aktivnosti ADAM 12 na trombinom stimulisanu proliferaciju VSMC prikazani su na **Slici 5.8.3.**, kao i u tekstu ovog paragrafa. Dobijena su statistički značajna smanjenja proliferacije VSMC primenom KB inhibitora: 1 μM KB od 15%; 5 μM KB od 22%; 10 μM KB od 27% ($p<0,05$). Takođe, primena 50 μM KB inhibitora značajno i delimično redukuje proliferaciju VSMC u iznosu od 37% (**Slika 5.8.3**, KB+TR=63 \pm 4%; TR=100%). Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodno prikazanim rezultatima (poglavlja 5.8.1 i 5.8.2) i ukazuju na bitnu ulogu ADAM 12 u

regulaciji proliferacije VSMC pod delovanjem trombina, kao i fosforilacije EGFR receptora i ERK1/2 kinaze.



Slika 5.8.3 Uticaj 50 μ M KB inhibitora na trombinom stimulisanu proliferaciju VSMC. Vrednosti DNK sinteze na osnovu BrdU testa su izražene kao procenat od vrednosti dobijene za trombin i predstavljene su kao aritmetička srednja vrednost \pm SEM (n=5). Svaki eksperiment je rađen na posebnoj kulturi ćelija VSMC u triplicatu. Legenda: KONT – kontrolna grupa VSMC; TR – VSMC tretirane trombinom; KB - VSMC tretirane samo 50 μ M KB inhibitorom; KB+TR - VSMC prethodno tretirane 50 μ M KB inhibitorom, potom sa trombinom. ***Statistički značajna razlika u odnosu na TR ($p < 0.001$). **Statistički značajna razlika u odnosu na TR ($p < 0.01$). §§§ Statistički značajna razlika između KONT i KB+TR ($p < 0.001$).

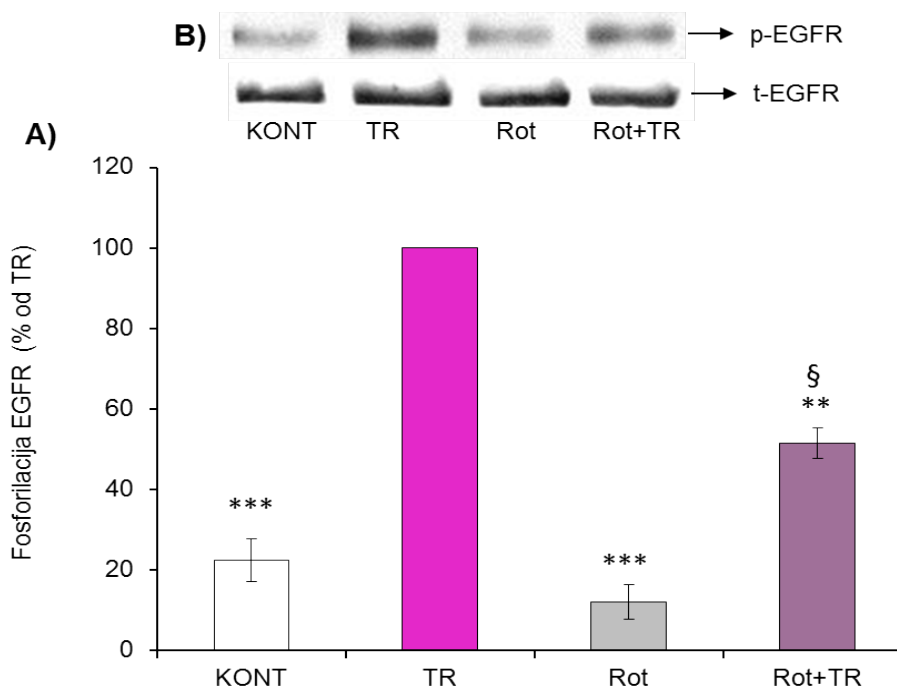
5.9. Uloga PKC δ u regulaciji proliferacije VSMC pod delovanjem trombina

U literaturi postoje radovi koji govore u prilog (Hsieh i sar., 2009) ali i protiv (Frank i sar., 2003) učešća PKC δ u transaktivaciji EGFR receptora pod delovanjem trombina. Hsieh i sar. (2009), a potom i naša grupa (2011) je ukazala na pozitivno učešće PKC δ u proliferaciji VSMC pacova stimulisanih trombinom, ali je ostao nerazjašnjen precizan mehanizam učešća ove kinaze u proliferaciji VSMC pod delovanjem trombina. Da bi ispitali mehanizam učešća PKC δ , u našim eksperimentima,

koristili smo njen inhibitor Rot. U preliminarnim eksperimentima odredili smo najvišu bezbednu koncentraciju Rot inhibitora koja ne dovodi do toksičnog efekta na VSMC od 5 μ M. Za naša dalja, dozno-zavisna ispitivanja efekata Rot inhibitora na EGFR, ERK1/2 fosforilaciju i VSMC proliferaciju stimulisanu trombinom, koristili smo opseg koncentracija od 0,5 do 5 μ M. Grafički će biti prikazani rezultati sa maksimalnom koncentracijom od 5 μ M Rot, a ostali rezultati biće spomenuti u tekstu.

5.9.1. Efekat Rot inhibitora PKC δ na trombinom stimulisanu fosforilaciju EGFR, ERK1/2 i proliferaciju VSMC

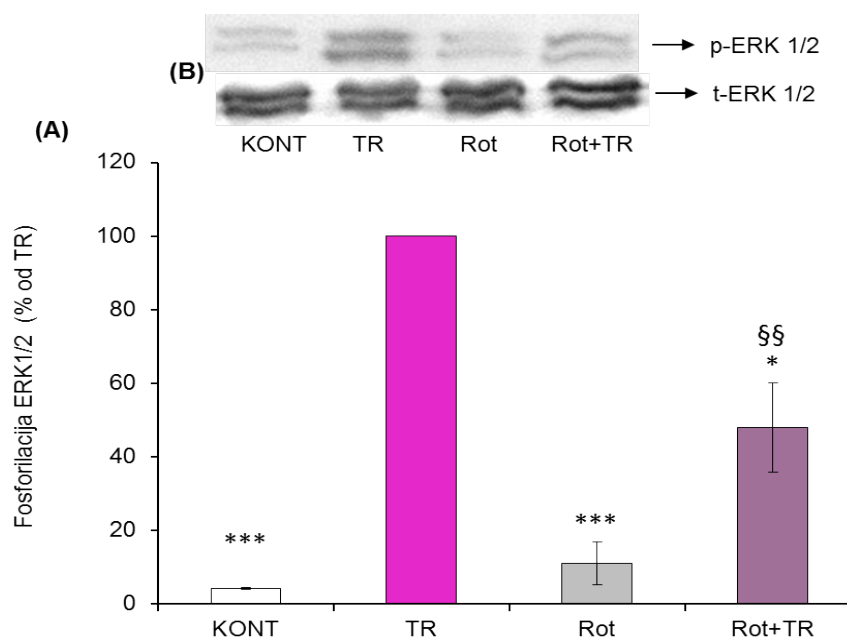
Polusatni pretretman VSMC sa 5 μ M Rot inhibitorom, pre njihove stimulacije, doveo je do statistički značajnog smanjenja fosforilacije EGFR u iznosu od 48 % (**Slika 5.9.1**, Rot+TR=52 \pm 4%; TR=100%). Dobijeni rezultat ukazuje na parcijalni karakter inhibicije fosforilacije EGFR sa 5 μ M Rot inhibitorom, obzirom da je fosforilacija EGFR bila značajno povećana u poređenju sa KONT (**Slika 5.9.1**, KONT= 21 \pm 8%; Rot+TR=52 \pm 4%; p<0.05).



Slika 5.9.1 Uticaj 5 μ M Rot inhibitora PKC δ na trombinom stimulisanu fosforilaciju EGFR u VSMC. (A) Vrednosti su izražene kao procenat od vrednosti

dobijene za trombin i predstavljene su kao aritmetička srednja vrednost \pm SEM (n=4). Svaki eksperiment je rađen na posebnoj kulturi ćelija VSMC u triplicatu. **(B)** Reprezentativni western blot. Legenda: KONT – kontrolna grupa VSMC; TR – VSMC tretirane trombinom; Rot - VSMC tretirane samo 5 μ M Rot inhibitorom; Rot+TR - VSMC prethodno tretirane 5 μ M Rot inhibitorom, potom sa trombinom; p-EGFR – fosforilisana forma EGFR; t-EGFR – ukupni EGFR; ***Statistički značajna razlika u odnosu na TR (p<0.001). **Statistički značajna razlika u odnosu na TR (p<0.01). § Statistički značajna razlika između KONT i Rot+TR (p<0.05).

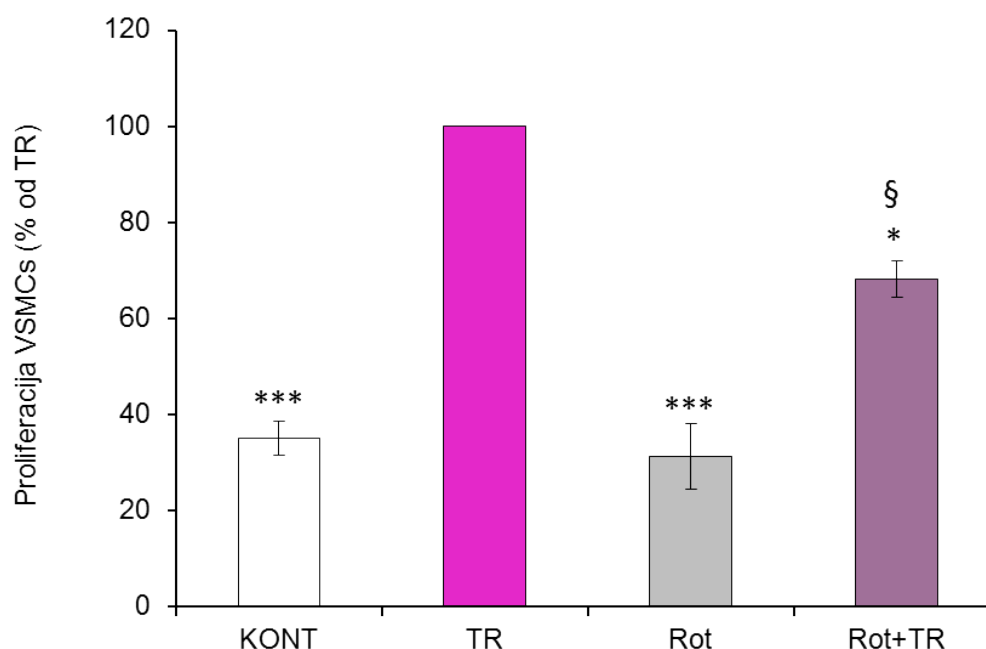
Na **Slici 5.9.2** prikazani su rezultati ispitivanja efekata inhibicije aktivnosti PKC δ kinaze, na trombinom stimulisanu fosforilaciju ERK1/2 u VSMC. Kako se na slici uočava inhibitor je statistički značajno smanjio fosforilaciju ERK1/2 za 52 % (Rot+TR=48 \pm 12%, TR=100%). Kao što je to bio slučaj sa uticajem Rot inhibitora na fosforilaciju EGFR receptora i inhibicija fosforilacije ERK1/2 bila je parcijalna (**Slika 5.9.2**, KONT= 7 \pm 1%; Rot+TR=48 \pm 12%; p<0.01). Dobijeni rezultati govore u prilog učešću PKC δ u regulaciji aktivacije ERK1/2 u VSMC stimulisane trombinom.



Slika 5.9.2 Uticaj 5 μ M Rot inhibitora PKC δ na trombinom stimulisanu fosforilaciju ERK1/2 u VSMC. (A) Vrednosti su izražene kao procenat od vrednosti dobijene za trombin i predstavljene kao aritmetička srednja vrednost \pm SEM (n=4). Svaki eksperiment je rađen na posebnoj kulturi ćelija VSMC u triplicatu. **(B)** Reprezentativni western blot. Legenda: KONT – kontrolna grupa VSMC; TR – VSMC tretirane trombinom; Rot - VSMC tretirane samo sa 5 μ M Rot inhibitorom; Rot+TR -

VSMC prethodno tretirane 5 μ M Rot inhibitorom, potom sa trombinom; p-ERK1/2 – fosforilisana forma ERK1/2; t-ERK1/2 – ukupna ERK1/2; ***Statistički značajna razlika u odnosu na TR ($p < 0.001$). *Statistički značajna razlika u odnosu na TR ($p < 0.05$). §§ Statistički značajna razlika između KONT i Rot+TR ($p < 0.01$).

Takođe, Rot inhibitor je parcijalno inhibirao proliferaciju VSMC stimulisanu trombinom za 32% (Slika 5.9.3, Rot+TR=68 \pm 4%; KONT= 37 \pm 2%; TR=100%). Statistički značajna smanjenja proliferacije VSMC usled inhibicije aktivnosti PKC kinaze, dobijena su već pri sledećim koncentracijama Rot inhibitora: 0,5 μ M Rott od 15%; 1 μ M Rott od 20%; 2 μ M Rott od 29% ($p < 0,05$). Dobijeni rezultati ukazuju na pozitivnu ulogu PKC δ u proliferaciji VSMC stimulisanoj trombinom i u skladu su sa prethodno prikazanim rezultatima (poglavlja 5.9.1 i 5.9.2).



Slika 5.9.3 Uticaj 5 μ M Rot inhibitora PKC δ na trombinom stimulisanu proliferaciju VSMC. Vrednosti DNK sinteze na osnovu BrdU testa su izražene kao procenat od vrednosti dobijene za trombin i predstavljene su kao aritmetička srednja vrednost \pm SEM ($n=5$). Svaki eksperiment je rađen na posebnoj kulturi ćelija VSMC u triplikatu. Legenda: KONT – kontrolna grupa VSMC; TR – VSMC tretirane trombinom; Rot - VSMC tretirane samo 5 μ M Rot inhibitorom; Rot+TR - VSMC prethodno tretirane 5 μ M Rot inhibitorom, potom sa trombinom. ***Statistički značajna razlika u odnosu na TR ($p < 0.001$). *Statistički značajna razlika u odnosu na TR ($p < 0.05$). § Statistički značajna razlika između KONT i Rot+TR ($p < 0.05$).

6. DISKUSIJA

Radna hipoteza ove doktorske disertacije zasnovana je na pretpostavci da je trombin uključen u regulaciju proliferacije VSMC pacova, molekularnim mehanizmom koji uključuje transaktivaciju EGFR receptora i subsekventnu aktivaciju MAPK kaskade preko enzima: ADAM 12, MMP-2 kao i PKC δ .

U postavci osnovne hipoteze pošlo se od činjenice da su, pod uticajem GPCR agonista, ADAM ključne u procesu cepanja i stvaranja aktivnih EGFR liganada (iako i neki članovi MMP klase poput MMP-2 mogu imati istu funkciju) (Roelle i sar., 2003), koji se vezuju za EGFR i transaktiviraju ga (Ohtsu i sar., 2006a; Prenzel i sar., 1999). Dobro je poznato da su transaktivacija EGFR i posledična aktivacija ERK1/2 signalnog puta, uključeni u proliferaciju ćelijskih linija, pa i VSMC pod delovanjem trombina (Bobe i sar., 2003; Fager, 1995; Kalmes i sar., 2000; Kanda i sar., 2001; McNamara i sar., 1996; Prenzel i sar., 1999; Zhang i sar., 2000).

Međutim, ostalo je nerazjašnjeno i nepoznato nekoliko ključnih aspekata (pitanja) u proliferativnom mehanizmu VSMC stimulisanim trombinom koji je dobar *in vitro* model abnormalne proliferacije VSMC *in vivo*. Jedno od tih pitanja je da li je aktivacija EGFR u okviru transaktivacije EGFR trombinom neophodna za aktivaciju ERK 1/2 i proliferaciju VSMC. Potom da li je uloga PKC δ u proliferaciji VSMC samo kao uzvodne komponente signalnog puta transaktivacije EGFR (Hsieh i sar., 2009)? Takođe, ostalo je nejasno da li MMP-2 učestvuje samo u migraciji VSMC (Newby, 2006) ili i u proliferaciji VSMC pod delovanjem trombina i kojim mehanizmom (Huang i sar., 2009; Smiljanic i sar., 2011)? Do sada ne postoje podaci koji povezuju aktivnost nekog ADAM molekula sa proliferacijom ćelija pod dejstvom trombina, stoga je jedan od ciljeva ove doktorske disertacije, između ostalog, izučavanje uloge ADAM molekula u trombinom stimulisanom proliferaciji VSMC.

Ateroskleroza uključuje orkestrirane procese endotelne disfunkcije, inflamacije, proliferacije VSMC i reorganizaciju ekstracelularnog matriksa (Dzau i sar., 2002). Dediferencijacija i abnormalna proliferacija VSMC predstavlja ključni događaj u nastanku aterosklerotskih lezija, postangioplastične restenoze i odbacivanja kalema pri

bajpasa krvnih sudova (Doran i sar., 2008; Dzau i sar., 2002; Mnjoyan i sar., 2008; Ross, 1993).

Trombin je moćni modulator mnogih aterosklerotskih procesa kao što su: regulisanje tonusa i propustljivosti krvnih sudova, migracija i abnormalne proliferacija VSMC, privlačenje monocita u aterosklerotske lezije, pojava raznih proinflamatornih markera, a svi ovi procesi vode progresiji kardiovaskularnih oboljenja (Borissoff i sar., 2009). Trombin je uključen u proces diferencijacije i abnormalne deobe VSMC povezan sa hipertenzijom, restenozom i aterosklerozom (Isenovic i sar., 2010a; Isenovic i sar., 2010b; Marche i sar., 1995; McNamara i sar., 1996). On dovodi i do proliferacije mezenhimalnih ćelija (McNamara i sar., 1993) i humanih fibroblasta preko svojih PAR receptora (Carney i sar., 1992; Giacco i sar., 2006). Trombin je agonist za GPCR, čijom aktivacijom u VSMC dolazi do stimulacije fosfolipaze C, povećanja intracelularnog Ca^{2+} i aktivacije PKC, što sve zajedno aktivira MAPK i PI3K/Akt signalne puteve (Hsieh i sar., 2009).

Obzirom da je abnormalna proliferacija VSMC činilac i/ili posledica mnogih kardiovaskularnih poremećaja poput ateroskleroze, angiogeneze, angioplastične restenoze, odbacivanja venskog kalema pri ugradnji bajpasa, hipertenzije, ne iznenađuje veliki interes za otkrivanjem mehanizama uključenih u prekomernu proliferaciju VSMC (Campbell i sar., 1989; Pauletto i sar., 1994). Ćelijska kultura VSMC pokazala se kao atraktivan i zahvalan model za proučavanje mehanizama ćelijske proliferacije u *in vitro* uslovima (Campbell i sar., 1989). Stoga je za proučavanje uloga EGFR, ERK1/2, MMP, ADAM, PKC δ i njihovih međusobnih odnosa u proliferaciji VSMC pod delovanjem trombina, u okviru ove doktorske disertacije, uspostavljena visoko čista i vijabilna primarna ćelijska kultura VSMC izolovanih iz torakalnog dela aorte Wistar pacova.

6.1. Dejstvo trombina na proliferaciju VSMC

Prvi eksperimenti urađeni u okviru ove doktorske disertacije bili su usmereni na izučavanje efekata trombina na proliferaciju VSMC sa ciljem da se utvrdi da li u našim kulturama VSMC trombin pokazuje proliferativne efekte i u kojoj meri. Dobijeni rezultati prikazani na Slici 5.1. jasno pokazuju da trombin svojim delovanjem dovodi do proliferacije VSMC što je u skladu sa objavljenim pozitivnim trendovima trombinom

stimulisane proliferacije VSMC u kulturi (Hsieh i sar., 2009; McNamara i sar., 1993; Prenzel i sar., 1999; Stepien i sar., 1998). Proliferacija kod trombinom tretiranih VSMC se povećala od 3,6 puta u odnosu na netretirane ćelije, što je u sredini opsega rezultata sličnih studija. To može da zavisi od uslova inkubacije VSMC kultura izolovanih iz aorte pacova, koncentracije trombina, vremena inkubacije, medijuma, kao i od detekcionog testa proliferacije. Period između 24 i 48h pokazao se kao najoptimalnije trajanje inkubacije VSMC u kulturi sa trombinom radi proučavanja njegovih proliferativnih dejstava, jer u tom periodu trombin postiže svoj maksimalni efekat (Bachhuber i sar., 1995; Hsieh i sar., 2009). Njegovi efekti na proliferaciju posredovani proteolitičkom aktivacijom trombinskih PAR receptora, imaju kinetiku koja izrazito kasni u odnosu na kinetiku proliferacije VSMC izazvanu klasičnim polipeptidnim faktorima rasta (npr. EGF). Uprkos brznoj aktivaciji trombinskog PAR receptora i sličnog vremena neophodnog da ciljne ćelije uvede u S fazu ćelijskog ciklusa u poređenju sa klasičnim polipeptidnim faktorima rasta, potrebno je duže vreme izlaganja trombinu da bi se postigao njegov maksimalni efekat na proliferaciju VSMC. To može da ukaže da ovo „zakašnjenje” u kinetici nastaje usled, trombin-zavisne sinteze i ekspresije njegovih novih receptora, kao i trombin-zavisnog napretka ćelija u prelazak frakcije rasta ćelija (Bachhuber i sar., 1995). Vezivanje trombina za receptore u VSMC dovodi do stimulacije fosfolipaze C, što rezultuje u povećanju intracelularnog nivoa Ca^{2+} i aktivaciji PKC (Bobe i sar., 2003; Lin i sar., 2001; McNamara i sar., 1996). Veliki broj studija je pokazao da je neophodan signalni korak transaktivacija EGFR od strane PAR-1 aktiviranog trombinom u proliferaciji VSMC u *in vitro* uslovima (Daub i sar., 1996; Kalmes i sar., 2001; Kalmes i sar., 2000; Kanda i sar., 2001; Prenzel i sar., 1999).

Takođe, brojni su radovi o učešću MAPK signalnog puta u proliferaciji VSMC pod delovanjem trombina, odnosno ERK1/2, p38 kinaza i PI3K/Akt kaskada (Hsieh i sar., 2009; Isenovic i sar., 2008; Kanda i sar., 2001; Lin i sar., 2002). Međutim u literaturi je nedovoljno podataka o neophodnosti EGFR aktivacije kako bi se uključio MAPK signalni put pod delovanjem trombina. S jedne strane, radovi govore u prilog neophodnosti EGFR aktivacije potrebne za aktiviranje ERK1/2 kinaze (Hsieh i sar., 2008; Hsieh i sar., 2009; Kalmes i sar., 2000), a drugi radovi ukazuju da postoje i putevi aktivacije ERK1/2 stimulisanim trombinom, nezavisnih od aktivacije EGFR (Bobe i

sar., 2003; Yin i sar., 2005). Rezultati Hsieh i saradnika (2009) su pokazali da je pored aktivacije ERK1/2 kinaze, takođe uključena i aktivacija PI3K/Akt kaskade u sprovođenju proliferativnog signala od aktiviranog PAR-1 i transaktiviranog EGFR, kao i ulogu NF- κ B i AP-1 u ekspresiji EGFR u VSMC ćelijama pacova.

U skladu sa ovim, ispitivali smo efekte trombina na aktivaciju EGFR receptora kao uzvodnog markera i ERK1/2 kinaze, kao nizvodnog markera u prenosu proliferativnog signala izazvanog trombinom u primarnim kulturama VSMC. Dobijeni rezultati ukazuju da trombin stimuliše fosforilaciju oba markera i to fosforilaciju EGFR 8,5 puta i ERK1/2 8,7 puta u odnosu na KONT što je u skladu sa literaturnim podacima (Bobe i sar., 2003; Hsieh i sar., 2009). Trombin stimuliše fosforilaciju EGFR na pozicijama 992, 1068, 1086 i 1145 i 1173 tirozinskih ostataka (Downward i sar., 1984; Walton i sar., 1990). U našim eksperimentima korišćeno je fosfo-EGFR (Tyr¹⁰⁶⁸) antitelo radi detekcije fosforilisanog EGFR. Za sva proučavanja ovo mesto fosforilacije Tyr¹⁰⁶⁸ je važno jer se adaptorni protein Grb-2 (Grb-2, engl. "Growth factor receptor bound protein-2") vezuje za njega (Rojas i sar., 1996). Ras aktivacija stimulisana EGFR ligandima uključuje specifične interakcije EGFR sa adaptornim proteinima Grb-2 i Shc (engl. "Src Homology and Collagen Protein"), kao i faktora izmene nukleotida Sos-1 (engl. "Son of Sevenless") (Rojas i sar., 1996). Aktivirana Ras vodi aktivaciji MAPK kaskade, što je u našim uvodnim eksperimentima registrovano kao fosforilacija ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) stimulisana trombinom.

6.2. Uloga EGFR u proliferaciji VSMC pod delovanjem trombina

U skladu sa pozitivnim uticajem trombina na proliferaciju VSMC i fosforilaciju EGFR i ERK1/2, naši sledeći eksperimenti su se odnosili na sistematičnu i sekvencijalnu farmakološku inhibiciju određenih molekula i njihovih klasa, kako bi se odredilo učešće specifičnih signalnih puteva u proliferaciji VSMC pod delovanjem trombina.

Prvi u nizu primenjenih farmakoloških inhibitora bio je inhibitor EGFR receptora i ispitivana je uloga njegove aktivacije u proliferaciji VSMC stimulisanih trombinom. Za inhibiciju EGFR korišćeni su dobro poznati reverzibilni inhibitor AG

1478 (AG), tj., tirfostin i potentni, ireverzibilni inhibitor PD 169540 (PD), novije generacije.

Primena izuzetno potentnog ireverzibilnog inhibitora EGFR PD ($IC_{50}=2-4$ nM) dovodi do ireverzibilne alkilacije Cys⁷⁷³ u okviru ATP-vezujućeg džepa tirozin-kinaznog domena EGFR receptora (Smaill i sar., 2000b). U našim eksperimentima koristili smo opseg koncentracija od 100 nM-10 μ M kako bi obezbedili potpunu okupiranost vezujućih mesta, dozvolivši njegovu maksimalnu inhibiciju bez toksičnog efekta po ćelije VSMC. Kao što se moglo pretpostaviti, 10 μ M PD je snažno inhibirao (za 81%) trombinom stimulisanu fosforilaciju EGFR do nivoa fosforilacije EGFR nestimuliranih ćelija. Ista koncentracija PD inhibitora za 44% je redukovala trombinom stimulisanu proliferaciju VSMC. Međutim proliferacija trombinom tretiranih VSMC i dalje je bila 25% veća u poređenju sa kontrolom. Dobijeni rezultati se ne mogu direktno uporediti sa literaturnim, jer još uvek nema objavljenih rezultata vezanih za primenu PD169540 u VSMC. Objavljeni su rezultati istraživanja PD169540 u keratinocitima (Xu i sar., 2009b) i ćelijama mijeloma (Mahtouk i sar., 2005). Dobijeni rezultati delimične inhibicije proliferacije VSMC pri potpunoj inhibiciji fosforilacije trombinom transaktiviranog EGFR sa PD inhibitorom su iznenađujući i bitni, jer ukazuju da sama aktivacija EGFR receptora u okviru transaktivacione kaskade inicirane trombinom, ne predstavlja neophodan događaj za prenos proliferativnog signala.

Primena 20 μ M tirfostina (AG inhibitor) dovela je do sličnih rezultata kao u slučaju inhibicije sa PD, smanjivši za 70% trombinom stimulisanu fosforilaciju EGFR ali na nivo i dalje značajno povišen u odnosu na nestimulirane VSMC. Smanjenje EGFR fosforilacije usled inhibicije sa AG je očekivano, ali iznenađuje mera inhibicije, obzirom da je on takođe potentni inhibitor sa IC_{50} vrednostima 3 nM u *in vitro* uslovima, u mnogim ćelijskim linijama (Levitzki i sar., 1995; Osherov i sar., 1994). U radu Bobe i sar., (2003), i niže koncentracije AG od 10 μ M dovode do potpune inhibicije trombinom stimulirane aktivacije EGFR. Sličan rezultat našem, pokazali su i Hsieh i saradnici (2009) primenom 10 μ M AG. Razlike u nivou inhibicije trombinom stimulirane fosforilacije EGFR sa AG, kao i manjeg proliferativnog potencijala trombina između naših rezultata i Bobe i saradnika (2003), mogu se objasniti razlikama u nivou ekspresije EGFR receptora pod delovanjem trombina (Hsieh i sar., 2009). Naime, Hsieh i saradnici (2009) pokazali su da transfekcijom EGFR shRNA u VSMC

dolazi do znatnog pada u ekspresiji EGFR, pa tako i do smanjenja trombinom stimulisane proliferacije VSMC. Dakle, povećana ekspresija EGFR usled dejstva trombina pozitivno doprinosi proliferaciji VSMC (Hsieh i sar., 2009). Moguće je i to što su u našim eksperimentima korišćene VSMC ćelije iz presada 4.-6. a u studiji (Bobe i sar., 2003) VSMC iz presada 6.-12., što može uzrokovati blage fenotipske razlike, uključujući i različit stepen ekspresije EGFR pod delovanjem trombina.

Parcijalno smanjenje proliferacije VSMC nakon primene AG inhibitora, je u skladu sa rezultatima (Bobe i sar., 2003; Kalmes i sar., 2000; Kanda i sar., 2001)). Kanda i saradnici (2001) objavili su, smanjenje DNK sinteze za 81% u VSMC tretiranim trombinom (1 IU/ml) tokom 24 h sa 2,5 μ M AG, koje je još uvek statistički značajno veće od kontrole. Razliku u nivou proliferacije između naših rezultata i Kanda i saradnika (2001), moguće je objasniti u različitom primenjenom protokolu inkubacije i detekcionom testu (u našem slučaju pretretman sa AG u trajanju od 30 min, a u slučaju Kanda i saradnika simultana 24h inkubacija trombinom i AG). U našim eksperimentima, AG inhibitor je kratkotrajno delovao u pravcu aktivacije molekula, dok je u slučaju simultane 24 h primene AG inhibitora sa trombinom u radu Kanda i saradnika (2001), on mogao inhibirati transkripciju i translaciju. Obzirom na različite ciljeve u našim istraživanjima, koristili smo 8 puta veću koncentraciju AG u poređenju sa studijom Kanda i saradnika (2001) (2,5 μ M AG).

Na kraju ovog poglavlja, na osnovu dobijenih rezultata izučavanjem efekata PD i AG inhibitora na EGFR fosforilaciju i VSMC proliferaciju, može se zaključiti da su efekti PD i AG inhibitora na trombinom stimulisanu proliferaciju VSMC delimični, što je u skladu sa rezultatima (Hsieh i sar., 2009; Kalmes i sar., 2000; Kanda i sar., 2001). Rezultati inhibicije proliferacije VSMC koji nose značajnu različitost u odnosu na kontrolu sa AG (veći za 37% u odnosu na kontrolu) i PD inhibitorom (veći za 25% u odnosu na kontrolu) izuzetno su bitni jer ukazuju da osim aktivacije EGFR, i neki drugi signali iz transaktivacione kaskade potaknute trombinom u VSMC imaju ulogu u njihovoj proliferaciji. Naši rezultati potvrđuju ulogu trombina u transaktivaciji EGFR, zatim, važnu ali ne i neophodnu ulogu same EGFR aktivacije za postizanje trombinom stimulisane proliferacije VSMC. Potrebno je razlikovati termine „EGFR transaktivacija pod delovanjem trombina” i „aktivacija EGFR” u okviru transaktivacione kaskade, kao i njihove uticaje na proliferaciju VSMC pod delovanjem trombina. Prvi termin označava

sve trombinom pokrenute signale trostruke kaskade transaktivacije EGFR, a drugi, „izolovan” događaj EGFR aktivacije u okviru transaktivacione kaskade. Mnoge studije su pokazale kao neophodan signalni korak, transaktivaciju EGFR od strane PAR-1 receptora aktiviranog trombinom u proliferaciji VSMC u *in vitro* uslovima (Daub i sar., 1996; Hsieh i sar., 2009; Kalmes i sar., 2000; Prenzel i sar., 1999) ne ulazeći u distinkciju ova dva pojma, tj., ne razgraničavajući doprinose same aktivacije EGFR i signale transaktivacione kaskade EGFR.

EGFR zauzima važno mesto u proliferaciji ćelija i u procesu ateroskleroze (Tamura i sar., 2001; Woodworth i sar., 2005). U kulturi VSMC poreklom iz aorte pacova pokazana je uključenost EGFR u ćelijsku proliferaciju i DNK sintezu (Berk, 2001; Nanney i sar., 1988; Tomita i sar., 1986). Hsieh i saradnici (2009) su pokazali smanjenje proliferacije VSMC stimulisanim trombinom nakon transfekcije shRNK^{EGFR} koji je u nivou netretiranih ćelija što svakako govori o neophodnosti EGFR aktivacije za uspešnu VSMC proliferaciju a što je u kontradiktornosti sa našim rezultatima, koji sugerišu važnu ali ne i neophodnu ulogu same EGFR aktivacije za postizanje trombinom stimulisane proliferacije VSMC. Na osnovu naših rezultata, sugerišemo važnu ali ne i neophodnu ulogu aktivacije EGFR za postizanje trombinom stimulisane proliferacije VSMC, i da pored, EGFR-zavisnih proliferativnih puteva u VSMC, postoje i EGFR- nezavisni putevi proliferacije VSMC.

6.3. Uloga ERK1/2 u EGFR- posredovanoj proliferaciji VSMC stimulisanom trombinom – da li je aktivacija EGFR zaista „neophodna”?

Sledeća grupa eksperimenata odnosila se na proučavanje uloge ERK1/2 u EGFR- posredovanoj proliferaciji VSMC stimulisanom trombinom. Rezultati ovih istraživanja pokazuju da je aktivacija ERK1/2 kinaze bitna u za proliferaciju VSMC pod delovanjem trombina, koji vodi preko transaktivacije EGFR. Primena njegovih potentnog ireverzibilnog (PD) i reverzibilnog (AG) inhibitora EGFR, statistički značajno je smanjila aktivaciju ERK1/2 kinaze što je u skladu sa objavljenim rezultatima za AG inhibitor (Reynolds i sar., 2002). Analizirajući dobijene rezultate u okviru ovog poglavlja sa prethodno diskutovanim (poglavlje 6.2.), uočava se trend

između procenata inhibicije aktivacije ERK1/2 i inhibicije proliferacije VSMC u odnosu na inhibicije EGFR. Naime, ireverzibilni PD je za **44%** smanjio VSMC proliferaciju, za **48%** smanjio ERK1/2 aktivaciju a za 81% smanjio EGFR aktivaciju, dok je reverzibilni AG za **48%** smanjio VSMC proliferaciju, za **55%** smanjio ERK1/2 aktivaciju i za 70% smanjio EGFR aktivaciju. Očevidno je da je znatno izraženiji stepen inhibicije EGFR nego ERK1/2 kinaze, što je i logično, obzirom da su pomenuti PD i AG molekuli, inhibitori EGFR receptora. Ovi rezultati takođe ukazuju i na ERK1/2 kao ključne kinaze u prenosu proliferativnog signala (Isenovic i sar., 2010a; Isenovic i sar., 2010b; Meloche i sar., 2007) obzirom da je nivo njihove inhibicije u trendu sa nivoom inhibicije proliferacije VSMC pri potpuno inhibiranom EGFR receptoru. Takođe, ovi rezultati ukazuju da, i pored isključenja signala od EGFR receptora, ERK1/2 kinaze bivaju aktivirane i nekim drugim signalom kaskade transaktivacije EGFR inicirane trombinom. Jedan od kandidata je PKC δ , koja zauzima važno mesto u proliferaciji VSMC pod delovanjem trombina, i za koju je pokazano da učestvuje kao uzvodni signal EGFR transaktivacije (Hsieh i sar., 2009; Smiljanic i sar., 2011). Pokazano je da PKC δ može direktno da aktivira Raf-MEK-ERK1/2 kaskadu, i da kompletna inhibicija EGFR sa AG inhibitorom vodi parcijalnoj inhibiciji aktivacije ERK1/2 u stimulaciji VSMC sa forboleskim estrima i ATP (Ginnan i sar., 2004).

Poznato je da je potrebna produžena (*engl.* "sustained") aktivacija ERK1/2 kinaznog puta da bi došlo do ćelijske proliferacije, budući da kratkotrajna aktivacija ovog puta, kao u slučaju kratkotrajne stimulacije fibroblasta trombinom ERK1/2 rezultira u potpunom odsustvu DNK sinteze (Meloche i sar., 1992). Noviji podaci ukazuju da aktivacija ERK1/2 mora trajati do kasne G1 faze za uspešan ulazak ćelije u S fazu (Yamamoto i sar., 2006).

Brojne protein-protein interakcije modulišu karakter i dužinu trajanja signala potaknutog aktivacijom GPCR, uključujući i trombinske PAR receptore. Tohgo i saradnici su 2003 godine otkrili da β arestini koji imaju ulogu u desenzitaciji i sekvestraciji GPCR, učestvuju u povezivanju aktiviranih GPCRs ka brojnim signalnim sistemima ćelije. Takođe, sugerisana je njihova nezavisna uloga u prenosu signala (Tohgo i sar., 2003). Brojni enzimi poput Src familije tirozinskih kinaza, komponenti ERK1/2 i c-Jun N-terminalne kinaze 3 MAPK kaskade vezuju se za β -arestine i translociraju se u vidu kompleksa do agonistom okupiranih GPCR (Jafri i sar., 2006).

Jedna od najproučavanijih interakcija β -arestin-zavisnih signala je aktivacija ERK1/2 kaskade (Jafri i sar., 2006). GPCR različitim mehanizmima aktiviraju ERK1/2, uključujući aktivaciju protein kinaze A (PKA) i PKC, transaktivaciju EGFR zavisnu od proteolitičkog cepanja membranskih liganada i signalizaciju preko β -arestina (Gutkind, 1998b; Luttrell, 2003; Zwick i sar., 1999). β -arestinima posredovana aktivacija ERK1/2 ima usporen početak i duže traje nego G proteinima posredovana signalizacija (Ahn i sar., 2004a; Ahn i sar., 2004b) a u slučaju receptora koji formiraju stabilne GPCR- β -arestinske komplekse, kao što su PAR-1, receptor za angiotenzin AT1a i vazopresinski V2 receptori, aktivnost ERK1/2 je znatno veća i duža u odnosu na kratkotrajne komplekse i vezana za citosol (DeFea i sar., 2000; Luttrell i sar., 2001; Tohgo i sar., 2002). U svom radu, Jafri i saradnici (2006) ukazali su da β -arestin-vezan za GPCR povećava ćelijsku aktivnost ERK1/2 primarno kao proteinska skela za Raf-MEK-ERK kinaznu kaskadu, koja povećava efikasnost ERK1/2 fosforilacije istovremeno usporavajući brzinu ERK1/2 defosforilacije.

Postavlja se pitanje, da li je zaista EGFR aktivacija **neophodna** za ERK 1/2 aktivaciju, kao i za VSMC proliferaciju pod delovanjem trombina? Brojne studije ukazuju da je aktivacija EGFR neophodna komponenta ERK1/2 aktivacije i VSMC proliferacije (Hsieh i sar., 2009; Kalmes i sar., 2001; Prenzel i sar., 1999; Reynolds i sar., 2002). I pored toga, Bobe i saradnici su 2003. godine, u uslovima smanjenog intracelularnog Ca^{2+} identifikovali EGFR nezavisni put aktivacije ERK1/2, ne utvrdivši, da li u takvim uslovima može doći i do proliferacije VSMC. Ovi nalazi bi bili relevantni i važni kod pacijenata sa hipertenzijom koji uzimaju blokatore Ca^{2+} kanala. Zbog nedostatka naučne potvrđenosti, olako se prelazilo preko ovih za sada usamljenih studija (Bobe i sar., 2003) koje u VSMC ukazuje na 2 puta aktivacije ERK1/2: zavisnog i nezavisnog od aktivacije EGFR. Druge istraživačke grupe, koje su svojim objavljenim rezultatima ukazivali na neophodnost EGFR aktivacije u VSMC proliferaciji, u svojim objavljenim studijama su rezultate Bobe i saradnika iz 2003. godine elaborirali površnim objašnjenjima poput „razlika u eksperimentalnim uslovima” (Hsieh i sar., 2009), ne ostavljajući mogućnost postojanja „baj-pas” signala za aktivaciju ERK1/2 u VSMC (Bobe i sar., 2003; Ginnan i sar., 2004; Smiljanic i sar., 2011). Moguće je da je signal koji premošćuje EGFR i univerzalnije prirode, tj., nije ograničen samo na VSMC. Takođe, „baj-pas” signala funkcioniše kako u fiziološkim uslovima tako i u uslovima

smanjenog intracelularnog Ca^{2+} , koji su omogućili da EGFR nezavistan put ERK1/2 aktivacije bude odmaskiran. To ne znači da on ne postoji u uslovima homeostaze kalcijuma, samo je mimikriran, obzirom na vodeću ulogu EGFR u aktivaciji ERK1/2. Na osnovu rezultata prikazanih u ovoj doktorskoj disertaciji, odnosno parcijalnih inhibicija proliferacije VSMC, kao i aktivacije ERK1/2 stimulisane trombinom po isključenju EGFR receptora, može se ukazati na postojanje „baj-pas” signala aktivacije ERK1/2 kaskade, kao i proliferacije VSMC pod delovanjem trombina, čiji je izvor uzvodno od EGFR. Kao doprinos odgovoru na pitanje ko je ili (ko su) učesnici koji obezbeđuju „baj-pas” signala, doprineli su naši rezultati koji se odnose na proučavanje uloge PKC δ , kao i HB-EGF i MP u proliferaciji VSMC, čija diskusija sledi u narednim poglavljima.

6.4. Uloga HB-EGF u transaktivaciji EGFR, aktivaciji ERK1/2 i proliferaciji VSMC stimulisanih trombinom

Značajni efekti inhibicije aktivacije samog EGF receptora na proliferaciju VSMC, naveli su nas da dalje, sekvencijalno istražimo uticaj inhibicije drugih članova trostruke kaskade transaktivacije EGFR.

Prvobitno se smatralo da je transaktivacija EGFR nezavisna od EGFR liganda, na osnovu brze pojave fosforilacije tirozina kod EGFR i nemogućnosti da se fizički detektuje EGFR ligand, posebno EGF u medijumu stimulisanih ćelija (Kalmes i sar., 2000). Prvi i dominantni EGFR ligand koji je detektovan u kulturi VSMC kao ligand transaktivacije EGFR preko GPCR, je HB-EGF (Prenzel i sar., 1999). Faktor rasta sličan heparin-vezujućem epidermalnom faktoru rasta (HB-EGF) dobio je ime po sposobnosti vezivanja heparina koji ga time i blokira (Clowes i sar., 1987; Kalmes i sar., 2000). Heparan-sulfat proteoglikani na površini ćelija imaju ulogu ko-receptora sa EGFR i potrebni su pri njegovom vezivanju i aktivaciji EGFR receptora (Kalmes i sar., 2000). HB-EGF indukuje maksimalnu fosforilaciju EGFR u VSMC nakon 0.5 do 1 minuta (Reynolds i sar., 2002). Ekspresija HB-EGF je povećana u humanim aterosklerotskim plakovima (Miyagawa i sar., 1995; Nakata i sar., 1996; Reape i sar., 1997) i u neointimalnim VSMC karotidnih arterija pacova u odgovoru na povredu izazvanu ugradnjom balona (Igura i sar., 1996).

Obzirom da su ranije publikovani radovi ukazali na ligand-nezavisnu (Daub i sar., 1996; Eguchi i sar., 1998) ali i ligand-zavisnu transaktivaciju EGFR (Prenzel i sar., 1999), u našim eksperimentima izučavali smo mehanizam trombinom stimulisane transaktivacije EGFR i učešće HB-EGF u njoj, korišćenjem neutrališućeg anti HB-EGF antitela.

Rezultati dobijeni primenom anti-HB-EGF monoklonskog antitela su očekivani i u skladu sa objavljenim podacima (Kalmes i sar., 2000), obzirom da je trombinom stimulisana fosforilacija EGFR u našim eksperimentima smanjena na nivo kontrole u iznosu od 72%. Dobijeni rezultati ukazuju na dominantno učešće HB-EGF liganda u transaktivaciji EGFR pod delovanjem trombina. Međutim, uticaj neutrališućeg antitela na proliferaciju VSMC i fosforilaciju ERK1/2 kinaze je parcijalnog karaktera i iznosi 45% i 61%, respektivno. Naši rezultati su u saglasnosti i sa studijama gde je u VSMC proučavan efekat egzogeno primenjenog HB-EGF na fosforilaciju EGFR i ERK1/2 i proliferaciju VSMC (Reynolds i sar., 2002). Ovako dobijeni rezultati ukazuju da u aktivaciji EGFR i proliferaciji VSMC stimulisanih trombinom, pored vezivanja HB-EGF za EGFR i njegove aktivacije i neki drugi signali transaktivacione kaskade doprinose pomenutim procesima. Svakako naši rezultati govore u prilog učešća HB-EGF kao dominantnog liganda koji se vezuje i transaktivira EGFR i dovodi do proliferacije VSMC. Na tom putu, HB-EGF aktivira i ERK1/2 o čemu svedoče i podaci iz ove disertacije, koji su u skladu sa rezultatima iz literature (Dreux i sar., 2006; Kalmes i sar., 2000).

Postavljaju se pitanja ko su učesnici proteolitičkog cepanja HB-EGF liganda u trombinom stimulisanjoj proliferaciji VSMC i kako je ono regulisano?

6.5. Uloga ADAM 12 i MMP-2 u proliferaciji VSMC pod delovanjem trombina

Već punu deceniju transaktivaciona kaskada EGFR indukovana GPCR privlači pažnju istraživača kako bi se odredili njeni učesnici i njihovo međusobno dejstvo u aktivaciji EGFR i daljem širenju transaktivacionog signala (Seals i sar., 2003; Smiljanic i sar., 2011). Mnoge studije su se, nakon inicijalnog otkrića učešća metaloproteinaza u kaskadi transaktivacije EGFR (Prenzel i sar., 1999), bavile otkrivanjem identiteta i

mehanizma kojima su MP uključee u transaktivaciju EGFR pod delovanjem raznih GPCR agonista. Istraživanja su vršena u nekoliko ćelijskih linija, uključujući VSMC. Capanje EGFR liganada od strane raznih ADAM i MMP i sledstvena transaktivacija EGFR kao posledica dejstva nekih GPCR agonista bila je i još uvek je veoma aktuelna tema u istraživanju ćelijskih signalnih puteva (Ohtsu i sar., 2006a). Mnoge studije se bave izučavanjem efekata ANG II, TGF- α , LPA, fenilefrina, ET-1 kao ćelijskih aktivatora koji potiču na aktivnost odsecanja liganada od strane raznih ADAM molekula. Međutim, iznenađuje da do danas, prema našim saznanjima, ne postoje podaci koji ukazuju da su ADAM metaloproteinaze uključene u transaktivaciju EGFR i proliferaciju bilo koje ćelijske linije uključujući i VSMC, pod delovanjem trombina.

S druge strane, iako HB-EGF i MMP-2 čine sastavni deo transaktivacione EGFR kaskade koja vodi migraciji VSMC pod uticajem trombina (Kalmes i sar., 2000), ostalo je da se utvrdi da li i kako MMP-2 utiče na proliferaciju VSMC pod delovanjem trombina, obzirom na kontroverzne literaturne podatke o uticaju MMP na proliferaciju VSMC (Huang i sar., 2009; Koo i sar., 2010; Newby, 2006; Ohtsu i sar., 2006a; Smiljanic i sar., 2011).

Naša istraživanja na ovom polju započeli smo izučavanjem uticaja ukupnih MP/MMP kako bi primenom njihovih različitih inhibitora utvrdili njihovo učešće u aktivaciji EGFR i ERK1/2 i proliferaciji VSMC. MMP su familija cink proteinaza sa više od 25 identifikovanih članova, čiji se spektri supstrata delimično preklapaju u mnoštvu ECM komponenti (Newby, 2006).

Rezultati dobijeni inhibicijom aktivnosti ukupnih MP sa PHEN inhibitorom pokazuju smanjenje trombinom stimulisane aktivnosti EGFR i ERK1/2 na nivo nestimuliranih VSMC, kao i parcijalnu redukciju (33%) trombinom stimulisane proliferacije VSMC. Najbliži literaturni podatak sa kojim bi mogli da uporedimo naše rezultate odnosi se na inhibicioni efekat PHEN na aktivnost MMP i na proliferaciju VSMC stimulisanih sa PDGF (Uzui i sar., 2000), gde je takođe pokazana parcijalna inhibicija proliferacije VSMC. Međutim, još uvek ne postoje podaci o inhibicionom efektu na EGFR i ERK1/2 fosforilaciju. Primenom PHEN inhibitora gubi se trend sličnih nivoa inhibicije fosforilacije EGFR i ERK1/2 sa inhibicijom proliferacije VSMC stimulisanih trombinom. Snažna inhibicija fosforilacije EGFR i ERK1/2 sa parcijalnom inhibicijom proliferacije od strane PHEN može se objasniti time da je aktivacija MMP i

sledstvena kaskada aktivacije EGFR i ERK1/2 samo deo signalne putanje koja vodi do proliferacije. Konkretnije, za PHEN inhibitor u primenjenom opsegu se ne bi očekuje da inhibira ADAM aktivnost. Poznato je da neki ADAM molekuli poput ADAM 12 interreaguju sa regulatornom subjedinicom p85 PI3K i aktiviraju je (Kang i sar., 2001), što može voditi EGFR-nezavisnoj aktivaciji PI3K/Akt kaskade i proliferaciji VSMC preko tog signalnog puta (Hsieh i sar., 2009; Reynolds i sar., 2002). S druge strane moguće je da PHEN usled svog širokog inhibitornog dejstva (McCarty, 1992; Stix i sar., 2001) indirektno doprinosi snažnoj inhibiciji EGFR i ERK1/2 aktivacije, istovremeno doprinoseći indirektno svojim helirajućim sposobnostima procesu proliferacije VSMC, tako što podržava antiapoptotske procese u ovim ćelijama (Moon i sar., 2004). Dobijeni rezultati ukazuju na potrebu daljeg izolovanja i profilisanja pojedinih, vodećih enzima ali i sugerišu na jasnu i pozitivnu ulogu učešća MMP u signalno-molekulskom putu proliferacije VSMC.

Učešće MMP klase u proliferaciji VSMC pod delovanjem trombina, potkrepili smo primenom često korišćenog inhibitora MMP klase molekula, GM6001 (GM) poznat i kao Ilomastat ili Galardin koji za razliku od prethodnog inhibitora PHEN ima specifičnost samo ka Zn^{2+} jonu. Njegova inhibicija je potentnog ali reverzibilnog karaktera; anjonsko stanje ove kiseline formira bidentatni kompleks sa cinkom u aktivnom centru MMP (Nishino i sar., 1978). Prvi u nizu ove serije rezultata odnosi se na značajnu inhibiciju fosforilacije EGFR stimulisane trombinom pod delovanjem ovog inhibitora, do nivoa statistički značajno većeg od onog zabeleženog u nestimulisanim ćelijama. Ovi rezultati potvrđuju MMP učestvuju u transaktivaciji EGFR stimulisanoj trombinom, što je u skladu sa publikovanim rezultatima o uticaju GM na fosforilaciju EGFR u VSMC kako pod delovanjem trombina tako i drugih GPCR agonista (Hsieh i sar., 2008; Ichiki i sar., 2004; Shah i sar., 2004; Zhang i sar., 2004). Sledeća grupa naših istraživanja odnosila se na ulogu i učešće MMP u proliferaciji VSMC stimulisanim trombinom. Statistički značajno smanjenje proliferacije VSMC od 30% usled inhibicije aktivnosti MMP GM inhibitorom u saglasnosti je sa rezultatima dobijenim upotrebom PHEN inhibitora (33 % redukcije proliferacije VSMC) i nedvosmisleno ukazuje na učešće MMP u proliferaciji VSMC. Dobijeni rezultati su u skladu sa publikovanim podacima o uticaju GM na inhibiciju proliferacije VSMC (Lovdahl i sar., 2000; Uglow i sar., 2003; Yang i sar., 2005), mada neke studije starijeg datuma ukazuju na izostanak

efekta inhibicije DNK sinteze u VSMC stimulisanim PDGF i modelima povrede krvnog suda nakon ugradnje balona (Bendeck i sar., 1996; Zempo i sar., 1996).

Kako bi potvrdili dosadašnje pozitivne rezultate o učešću ERK1/2 u proliferaciji VSMC stimulisanom trombinom, izučavali smo uticaj GM inhibitora na njihovu aktivaciju. Međutim, dobili smo neznačajno smanjenje aktivacije ERK1/2 primenom GM, što je bilo iznenađenje u odnosu na prethodno pokazane rezultate a koji ukazuju na pozitivno učešće ERK1/2 u EGFR posredovanoj proliferaciji VSMC. Dobijeni rezultati su u suprotnosti sa rezultatima objavljenim u literaturi, a koji ukazuju da i manje koncentracije ovog inhibitora statistički značajno inhibiraju aktivaciju ERK1/2 stimulisanu trombinom (Hsieh i sar., 2008; Ichiki i sar., 2004). U nastavku, Grantcharova i sar., (2006) pokazali su da u kasnoj fazi ERK1/2 aktivacije posreduju Gi subjedinica i MMP-zavisna aktivacija EGFR u VSMC. S druge strane, Shah i saradnici (2004) su prethodno tretirali HEK293 ćelije sa GM inhibitorom (opseg koncentracija od 0,2 – 20 μ M) i pokazali odsustvo statistički značajnog smanjenja fosforilacije ERK1/2 stimulisane sa EGF ili ANG II, što može biti objašnjeno diferencijalnim učešćem MMP u transaktivaciji EGFR putem proteolitičkog cepanja HB-EGF u različitim ćelijskim linijama (Shah i sar., 2004). Poznato je da su ćelijske linije obično imortalizovane, pa objašnjenje može biti i to da smo u našim eksperimentima koristili primarnu ćelijsku kulturu VSMC a ne liniju.

Ekspresija MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MT1-MMP i MMP-16 povišena je u humanim aterosklerotskim plakovima, a mnogi od njih eksprimirani su u *in vitro* kulturama pacovskih VSMC, kao i TIMP-1, -2, -3 i -4 (Dollery i sar., 1999; Galis i sar., 1994; Hasenstab i sar., 1997; Newby, 2005; Newby, 2006). Bez obzira na njihovo ćelijsko poreklo, izlučeni MMP i TIMP utiču na fenotip VSMC u aterosklerotskim plakovima. VSMC u kulturi često oponašaju sintetički fenotip, tipično eksprimirajući MMP-2 (Hultgardh-Nilsson i sar., 1997; Thyberg, 1998). Proliferišuće VSMC imaju povišeni nivo iRNK za MMP-2 (Pauly i sar., 1994). U *in vivo* uslovima, ekspresija MMP-2 u VSMC povezana je sa nekoliko patoloških stanja, posebno u aterosklerotskim plakovima, gde je ona značajno povećana, zajedno sa povećanom aktivacijom MMP-2 (Newby i sar., 1999; Shah i sar., 2001). U glatkim mišićnim ćelijama traheja čoveka, trombin u koncentraciji od 1 IU/ml

uzrokuje povećanje nivoa ukupnih MMP koje koreliše sa povećanom MMP-2 aktivnošću (Elshaw i sar., 2004).

U skladu sa ulogom MMP-2 u vaskularnom remodelovanju, inhibiranje MMP aktivnosti može poboljšati ili sprečiti nastanak vaskularnih patoloških stanja. Inhibicija MMP blokirala je proliferaciju VSMC traheje u odgovoru na serum, trombin i PDGF (Johnson i sar., 1999), proliferaciju VSMC iz komadića tkiva aorte (tzv. eksplanti aorte) (Bendeck i sar., 1994), proliferaciju VSMC u *in vivo* uslovima (Kenagy i sar., 1997; Zempo i sar., 1996), MMP-2-posredovanu VSMC migraciju nakon kateterizacije balonom (Bendeck i sar., 1994; Cheng i sar., 1998; Jenkins i sar., 1998), i nastanak neointimalnog zadebljanja (Cheng i sar., 1998). Nekoliko studija koje su u svojim istraživanjima primenile inhibitore ukupnih MMP, strukturno potpuno različite klase, pokazale su inhibiciju proliferacije VSMC u *in vitro* uslovima (Lovdahl i sar., 2000; Southgate i sar., 1992; Uglow i sar., 2003) dok druge studije nisu (Zempo i sar., 1996). Naime, samo dve od četiri studija pokazale su inhibiciju proliferacije VSMC iz *tunica media* drugog dana nakon modela povrede kateterizacijom balona u karotidnim arterijama pacova (Islam i sar., 2003; Zempo i sar., 1996).

Imajući u vidu neusaglašenosti gore iznetih rezultata, izučavali smo efekte MMP-2 koji ima ulogu u remodelovanju, migraciji i proliferaciji VSMC. Prvi u nizu eksperimenata odnosio se na ispitivanje učešća MMP-2 u proliferaciji VSMC stimulisanih trombinom. Visoko-selektivni ireverzibilni MMP-2 Inhibitor II (SI-II) značajno je smanjio proliferaciju VSMC stimulanu trombinom ali je proliferacija i dalje bila povećana u odnosu na kontrolu. Dobijeni rezultati se ne mogu direktno uporediti sa onima koje su dobili drugi autori, jer još uvek ne postoje podaci o uticaju SI-II inhibitora na proliferaciju VSMC, kao i drugih ćelijskih linija. Do sada je ispitivan efekat ovog inhibitora na vijabilnost i migraciju kancerskih ćelijskih linija fibrosarkoma, HT1080 (Ikejiri i sar., 2005; Mukhin i sar., 2006). Dakle, po prvi put smo pokazali inhibiciju aktivnosti MMP-2 sa SI-II u VSMC, što govori u prilog pozitivnom učešću MMP-2 u proliferaciji VSMC pod delovanjem trombina.

Sledeća grupa eksperimenata je bila dizajnirana sa ciljem da istraži mehanizam delovanja MMP-2 na proliferaciju VSMC i da li uključuje transaktivaciju EGFR i aktivaciju ERK1 /2. Koncentracija od 10 μ M SI-II se pokazala kao najefikasnija u inhibiciji aktivnosti MMP-2 bez uticaja na druge MMP, posebno MMP-9 osetljive na

koncentracije iznad 26 μM (Ikejiri i sar., 2005). Naši rezultati pokazuju da izabrana koncentracija ovog inhibitora značajno i delimično smanjuje fosforilaciju EGFR i ERK1/2 stimulisane trombinom. Fosforilacije su značajno veće od kontrole. Dobijeni rezultati ukazuju na značajno učešće MMP-2 u transaktivaciji EGFR, aktivaciji ERK1/2, kao i na njeno posredovanje u proliferaciji VSMC stimulisanih trombinom. Naši rezultati po prvi put ukazuju na inhibiciju aktivacija EGFR receptora i ERK1/2 kinaze putem SI-II inhibitora u VSMC.

Svakako treba razmotriti odnos procenata inhibicije fosforilacije EGFR i ERK1/2 i proliferacije VSMC. Poređenje rezultata inhibicije EGFR receptora primenom AG i PD inhibitora, a potom njegovog liganda HB-EGF, ukazuje da je udeo inhibicije ERK1/2 u trendu sa udelom inhibicije proliferacije VSMC, dok je udeo inhibicije EGFR uvek bio znatno. U eksperimentima u kojima smo inhibirali aktivnost MMP-2, trend se promenio: procenat inhibicije EGFR (47%) bio je u nivou procenta inhibicije proliferacije VSMC (45%), dok je procenat inhibicije ERK1/2 (25%) bio manji. Pored Raf-MEK1/2-ERK1/2 signalnog puta, ovo može da ukaže na učešće PI3K/Akt kaskade (Hsieh i sar., 2009; Reynolds i sar., 2002), ali takođe i na učešće p38 kinaze (Kanda i sar., 2001). Postojanje poprečne komunikacije PI3K/Akt sa MAPK kaskadom, pokazano je u slučaju insulinom stimulisane proliferacije VSMC (Isenovic i sar., 2009a; Isenovic i sar., 2009b), dok je PI3K/Akt učesnik uzvodno u signalizaciji u odnosu na MEK-ERK1/2 u trombinom stimulisanim VSMC (Hsieh i sar., 2009; Yang i sar., 2005). S druge strane, ranije smo ukazali na postojanje dvostrukog mehanizma kojim MMP-2 može da doprinese kako u transaktivaciji EGFR, tako i u proliferaciji VSMC stimulisanih trombinom (Smiljanic i sar., 2011). Naime, mehanizam kojim trombin inicira učešće MMP u proliferaciji VSMC je dvojak: preko aktivacije PAR-1 a drugi putem direktnog proteolitičkog dejstva trombina na pro-MMP-2 (zimogena, neaktivna forma MMP-2) (Koo i sar., 2010). U prvom pomenutom mehanizmu dejstva trombina, aktivacija MMP-2 i sledstveno odsecanje HB-EGF predstavljaju ključne elemente povezivanja PAR-1 aktivnosti sa transaktivacijom EGFR receptora (Prenzel i sar., 1999; Smiljanic i sar., 2011). U drugom mehanizmu, studije sugerišu da na mestu lokalne vaskularne povrede trombin aktivira lokalno izlučeni MMP-2 i tim mehanizmom ollašava ćelijsku migraciju i proliferaciju VSMC (Galis i sar., 1997). Trombin aktivira već izlučeni pro-MMP-2 ne utičući na ekspresiju ili sekreciju pro-MMP-2 u VSMC

aorte svinje i dovodi do njihove mitogeneze aktivacijom MMP-2 (Wang i sar., 2009b). Druga studija je pokazala da su heparan sulfat proteoglikani neophodni u trombinom posredovanoj aktivaciji pro-MMP-2 i da se aktivacija MMP-2 dešava putem specifičnog proteolitičkog cepanja pro-peptida MMP-2 od strane trombina, nakon koje sledi intramolekulsko autoproteolitičko cepanje do pune enzimatske aktivnosti MMP-2 (Koo i sar., 2010). MMP-2 je konstitutivno eksprimirana i sekretovana kao latentna zimogena forma, pro MMP-2, a njena aktivacija dešava se na površini ćelije, i u njoj posreduju i matriksne metaloproteinaze membranskog tipa, poput MT1-MMP (Egeblad i sar., 2002; Visse i sar., 2003).

Za MMP-2 i -9 pokazano je da učestvuju u transaktivaciji EGFR u humanim gonadotropnim ćelijama i ćelijama mezenteričnih arterija miša pod delovanjem ANG II, ali nije ustanovljeno da li učestvuju u odsecanju HB-EGF ili nekim drugim mehanizmima doprinose transaktivaciji EGFR (Lucchesi i sar., 2004; Roelle i sar., 2003). Jedna od pretpostavki je da degradacija kolagena tipa IV i proteinskih tela nekolicine heparan sulfat proteoglikana od strane MMP-2 i -9 može narušiti inhibitorne interakcije sa komponentama bazalne membrane (BM) (Bingley i sar., 1998; Kinsella i sar., 2003). Ipak, 60–70% proliferišućih VSMC u kulturi, poreklom iz safenoznih vena čoveka izgube svoju BM (Aguilera i sar., 2003) a ostatak od 30–40% nastavlja da se deli uprkos prisustvu BM. MMP mogu učestvovati u permisivnim interakcijama između VSMC i komponenata remodelujućeg ECM. U skladu sa ovim, signalni putevi u kojima dominiraju faktori rasta i integrini kristališu se kao važni mehanizmi kojima MMP posreduju u VSMC proliferaciji (Assoian i sar., 1996; Morla i sar., 2000; Risinger i sar., 2006; Walker i sar., 2003).

Kao što je već bilo pomenuto u uvodnom poglavlju, glavnim akterima membranskog proteolitičkog cepanja („membranske makazice“) EGFR liganada poput HB-EGF i sledstvene transaktivacije EGFR pod dejstvom faktora rasta smatraju se ADAM, transmembranske MP (Ohtsu i sar., 2006a). HB-EGF predstavlja najčešći supstrat za MP, odnosno najčešći EGFR ligand u EGFR transaktivaciji stimulisanom trombinom ili ANG II u VSMC (Hsieh i sar., 2009; Huang i sar., 2009; Isenovic i sar., 2010a; Kalmes i sar., 2000; Ohtsu i sar., 2006b; Prenzel i sar., 1999; Smiljanic i sar., 2011)).

Fokusirajući se na ADAM članove uključene u procese ćelijske proliferacije i hipertrofije postoji nekoliko radova o ANG II-indukovanoj ADAM 17 aktivnosti u VSMC i u bubrežnim ćelijama adenokarcinoma čoveka (Ohtsu i sar., 2006b; Schafer i sar., 2004). Takođe, pokazano je da ADAM 12, posreduje u hipertrofiji miokarda indukovanoj fenilefrinom, ANG II i ET-1 u miocitima srca miša (Asakura i sar., 2002). Ovi autori pokazali su blokadu proteolitičkog cepanja HB-EGF od strane KB-R7785, inhibiciju transaktivacije EGFR tokom aktivacije kardiomiocita, ali i povoljne efekte u lečenju hronične kardijačne hipertrofije kod miša. Takođe, Asakura je sa saradnicima 2002. godine sugerisao da je za proteolitičko cepanje HB-EGF u ovom sistemu odgovoran upravo ADAM 12, obzirom da ekspresija mutantne forme ADAM 12 inhibira fenilefrinom indukovanu proteolitičku aktivnost kao i transaktivaciju EGFR u kardiomiocitima miša. Postoji debata vezana za identitet ADAM molekula uključenog u transaktivaciju EGFR i hipertrofiju izazvanu ANG II, obzirom da su Ohtsu i saradnici (2006b) pokazali da ADAM 17, a ne ADAM 12, predstavlja glavnu „membransku makazicu”. Istovremeno oni tvrde da Asakura i saradnici (2002) nisu pružili direktan naučni dokaz o učešću ADAM 12 u hipertrofiji kardiomiocita pod delovanjem ANG II. Novija studija govori u prilog ulozi ADAM 12 člana u kardijačnoj hipertrofiji (Wang i sar., 2009a). Mišiji model „MMP-7 knockdown” otkriva da MMP-7 kontroliše transkripciju ADAM 12, koji je uključen u kardijačnu hipertrofiju. Takođe, u ANG II-indukovanoj hipertenziji i kardijačnoj hipertrofiji, nizvodni geni i gen za ADAM 12 su visoko ekspimirani (Wang i sar., 2009a). Isključenje gena za MMP-7 smanjilo je hipertenziju i inhibiralo visoku ekspresiju ADAM 12, sprečavajući tako kardijačnu hipertrofiju (Wang i sar., 2009a). Takođe, pokazano je da ADAM 12 učestvuje u proliferaciji hondrocita preko proteolitičkog cepanja vezujućeg proteina faktora rasta sličnog insulinu tipa 5 (IGFBP5) u osteoartritičnoj hrskavici (Okada i sar., 2008). Zatim, pojačana selektivna ekspresija ADAM 12 u ćelijama glioblastoma povezuje se sa ćelijskom proliferacijom i proteolitičkim cepanjem HB-EGF (Kodama i sar., 2004). ADAM 12 je uključen i u regulaciju aktivnosti endometrijuma u mesečnom ciklusu, budući da odcepljuje endocitotski receptor LRP-1 (engl. ”Low density lipoprotein receptor related protein-1”), čime se smanjuje endocitotsko uklanjanje aktivnih MMP-2 i 9 (Selvais i sar., 2009).

Međutim podaci vezani za ADAM aktivnost u trombinom stimulisanom ćelijskoj proliferaciji su vrlo oskudni, bez obzira na tip, odnosno poreklo ćelijske linije. Jedina veza između proteolitičke aktivnosti ADAM (membranske makazice) i trombina ukazana je u studiji koja je proučavala familiju transmembranskih heparin sulfat proteoglikana tzv. sindekana gde trombin ima ulogu ćelijskog stimulatora koji potiče na protelitičko cepanje membranskih proteina (Subramanian i sar., 1997). Nedavno objavljena studija pokazala je da je ADAM 17 najrelevantija membranska makazica za cepanje sindekana-1 i -4 u epitelnim ćelijama pod uticajem inflamatornih citokina, trombina i PMA (Pruessmeyer i sar., 2010).

Bazirano na dostupnim literaturnim podacima ispitali smo učešće ADAM 12 u trombinom stimulisanom proliferaciji, EGFR transaktivaciji i aktivaciji kaskade ERK1/2, koristeći visoko specifični ADAM 12 inhibitor, KB-R7785 (KB). KB je bio izabran među 2000 metaloproteinaznih inhibitora kao jedan od najpotentnijih inhibitora pro-HB-EGF cepanja od strane ADAM 12 (Asakura i sar., 2002; Ebi i sar., 2010; Tokumaru i sar., 2000). Postoji i podatak da je KB, pored ADAM 12, inhibitor i ADAM 28 (Mochizuki i sar., 2007), koji je eksprimiran samo na pojedinim kategorijama limfocita. Time je obezbeđena specifičnost inhibitora ADAM 12 u slučaju VSMC. U našim eksperimentima koristili smo koncentracije specifične samo za ADAM 12 (opseg od 1-10 μM) ali i one više koje inhibiraju i ADAM 17 (Asakura i sar., 2002; Ichikawa i sar., 2004; Lozonschi i sar., 1999; Mochizuki i sar., 2007; Smiljanic i sar., 2011).

Prvi u nizu eksperimenata odnosio se na ispitivanje uloge ADAM 12 u proteolitičkom cepanju HB-EGF i sledstvenoj transaktivaciji EGFR. Dobijeno je statistički značajno smanjenje trombinom stimulisane transaktivacije EGFR u VSMC u iznosu od 47% pri tretmanu sa 10 μM , odnosno 35% sa 5 μM KB inhibitorom, što ukazuje da su smanjenja fosforilacije EGFR najverovatnije posledica inhibicije ADAM 12 aktivnosti jer je u datom sistemu samo ona osetljiva na primenjeni koncentracioni opseg. Smanjenja fosforilacije EGFR u iznosu od 88% pri koncentraciji KB inhibitora od 50 μM , može biti i posledica inhibicije aktivnosti ADAM 17, obzirom da postoje podaci o njenoj prisutnosti u VSMC i učešću u HB-EGF proteolitičkom cepanju pod delovanjem ANG II (Ohtsu i sar., 2006b; Takaguri i sar., 2011a).

Druga grupa eksperimenata odnosila se na proučavanje efekata inhibicije aktivnosti ADAM 12 na proliferaciju VSMC. Dobijeni rezultati pokazuju statistički

značajna smanjenja proliferacije VSMC usled inhibicije aktivnosti ADAM 12, pri sledećim koncentracijama KB inhibitora: 1 μM KB od 15%; 5 μM KB od 22%; 10 μM KB od 27% i 50 μM KB od 37%, što ukazuje na pozitivnu ulogu ADAM 12 u proliferaciji VSMC stimulisanom trombinom.

U nastavku daljih istraživanja je ispitana i uloga ERK1/2 kinaze u ADAM 12 posredovanoj proliferaciji VSMC stimulisanom trombinom. Dobijena su statistički značajna sniženja fosforilacije ERK1/2 kinaze stimulisane trombinom usled inhibicije aktivnosti ADAM 12 sa KB inhibitorom: 50 μM - 37%, 10 μM - 25% i 5 μM - 19%. Dobijeni rezultati ukazuju na značajni uticaj ADAM 12 u regulaciju trombinom stimulisane aktivnosti ERK1/2 kinaze u VSMC. Odnos procenata inhibicije aktivacije EGFR (88%) i ERK1/2 (37%), kao i proliferacije VSMC (37%) isti je kao u slučaju primene AG, PD inhibitora i neutrališućeg antitela za HB-EGF, (procenat inhibicije ERK1/2 je sličan sa procentom inhibicije proliferacije VSMC nasuprot potpunoj inhibiciji EGFR), što govori u prilog centralnoj ulozi koju ERK1/2 imaju u prenosu proliferativnih signala od strane aktiviranih receptora faktora rasta (Isenovic i sar., 2010a).

Rezultati koji se odnose na istraživanje učešća i identiteta ADAM molekula u proliferaciji VSMC prvi su eksperimentalni podaci koji ukazuju na učešće nekog ADAM molekula u trombinom stimulisanom proliferaciji ćelija. Takođe, ovime su pruženi i prvi podatak o ulozi ADAM 12 u proliferaciji VSMC bez obzira na stimulus proliferacije.

ADAM 12 indukuje miogenezu u *in vivo* uslovima, a transkript ADAM 12 detektovan je u adultnim, skeletnim, srčanim i glatkim mišićinim ćelijama čoveka (Gilpin i sar., 1998). Takođe, ADAM 12 ima 10 mogućih SH3-vezujućih domena i dva potencijalna mesta za fosforilaciju tirozina na citoplazmatskom kraju. Postoje podaci o interakciji ADAM 12 sa c-Src, bliskom kinazom Yes i Grb-2, gde je C terminalni kraj supstrat za fosforilaciju od strane c-Src (Kang i sar., 2000; Suzuki i sar., 2000). Nekoliko studija je sugerisalo da citoplazmatski rep aktivno reguliše količinu ADAM 12 na površini ćelije (Cao i sar., 2002; Sundberg i sar., 2004) i da PKC ϵ učestvuje u translokaciji ADAM 12 na površinu ćelije u humanim RD ćelijama („rhabdomyosarcoma”) (Sundberg i sar., 2004). Ovi autori su pokazali i postojanje interakcije PKC δ sa ADAM 12, ali je priroda i funkcija ovih interakcija ostala nejasna

(Sundberg i sar., 2004). Na postojanje interakcije između ADAM 12 i PKC δ ukazali su i Asakura i saradnici (2002). Nejasno je da li PKC δ interaguje sa ADAM 12 preko katalitičkog domena, kao što je pokazala studija Izumi i saradnika (1998) u slučaju interakcije ADAM 9 sa PKC δ , ili u toj interakciji posreduje i neki treći protein. Učešće PKC δ u trombinom stimulisanom proliferaciji VSMC potvrđeno je od strane Hsieh i saradnika (2009), sa našim ranije publikovanim radom (Smiljanic i sar., 2011) i rezultatima prikazanim u okviru ove doktorske disertacije.

6.6. Uloga PKC δ u trostrukoj kaskadi transaktivacije EGFR, aktivaciji ERK1/2 i proliferaciji VSMC pod delovanjem trombina

U literaturi postoje radovi koji govore u prilog (Hsieh i sar., 2009) ali i protiv (Frank i sar., 2003) učešća PKC δ u transaktivaciji EGFR receptora pod delovanjem trombina. Da bi ispitali učešće PKC δ u našim eksperimentima, koristili smo njen inhibitor Rot u koncentraciji od 5 μ M što je blisko vrednosti K_i za PKC δ . Ostale forme PKC osetljive su na koncentracijama višim od 20 μ M (Gschwendt i sar., 1994). Tretman VSMC sa Rot inhibitorom doveo je do statistički značajnog smanjenja fosforilacije EGFR stimulisane trombinom u iznosu od 48 %, nivo fosforilacije značajno veći od onog kod nestimuliranih ćelija. Dobijeni podatak govori u prilog aktivnom i značajnom učešću PKC δ u transaktivaciji EGFR receptora u VSMC stimuliranih trombinom i u saglasnosti je sa publikovanim rezultatima drugih autora (Hsieh i sar., 2009; Smiljanic i sar., 2011; Tan i sar., 2003).

Sledećim eksperimentima izučavan je efekat inhibicije PKC δ sa Rot inhibitorom na proliferaciju VSMC. Dobijeno je statistički značajno smanjenje trombinom stimulirane proliferacije VSMC u iznosu od 32 %, veće od nivoa proliferacije nestimuliranih VSMC. Ovi rezultati ukazuju na pozitivnu ulogu PKC δ u proliferaciji VSMC i u skladu su sa objavljenim rezultatima u literaturi (Hsieh i sar., 2008; Hsieh i sar., 2009; Smiljanic i sar., 2011). Naši rezultati po prvi put pokazuju da je inhibicija proliferacije VSMC nastala usled blokiranja PKC δ primenom Rot inhibitora.

Naši dalji ekperimenti su obuhvatili izučavanje učešća i povezanosti ERK1/2 aktivacije sa PKC δ posredovanom EGFR transaktivacijom i proliferacijom VSMC

stimulisanih trombinom. Dobijena je statistički značajna redukcija ERK1/2 aktivnosti u iznosu od 52% i, takođe značajno viša od kontrole. Ovi rezultati nedvosmisleno ukazuju na ulogu PKC δ u ERK1/2 aktivaciji stimulisanoj trombinom u VSMC.

Ovde je važno istaći da je trend inhibicije EGFR, ERK1/2 i proliferacije VSMC kao i u slučaju inhibitora MMP-2, drugačiji od ostalih primenjivanih inhibitora. Izjednačeni su procenti inhibicije EGFR (48%) i ERK1/2 (52%) naspram udela inhibicije proliferacije VSMC (32%). Verovatno, osim što aktivira ERK1/2 posredno preko EGFR transaktivacije (Hsieh i sar., 2009), PKC δ i direktno aktivira MAP kinazni put (Ginnan i sar., 2004) (**Slika 6.8**). Imajući ovo u vidu, očekivalo bi se da i procenat inhibicije proliferacije VSMC bude u skladu sa njima. Odstupanje se može objasniti time da pored MAPK i PI3K/Akt kaskada učestvuje u procesu prenosa proliferativnih signala u VSMC stimulisanim trombinom (Hsieh i sar., 2009). Rot inhibitor iskazuje i antiproliferativna svojstva nezavisna od PKC δ , što je dokumentovano u literaturi (Kojima i sar., 2008; Lim i sar., 2009; Song i sar., 2008). U zaključku, naši rezultati svakako govore u prilog učešću PKC δ u proliferaciji VSMC, a koji uključuje i EGFR transaktivaciju i ERK1/2 aktivaciju i u skladu su sa objavljenom studijom Hsieh i saradnika (2009).

6.7. Trostruka kaskada EGFR transaktivacije trombinom i nizvodni signali proliferacije VSMC

Raspoloživi literaturni podaci kao i naši dobijeni eksperimentalni rezultati, omogućili su nam da sumiramo razumljivu, ažuriranu mapu molekularnih događaja u signalnoj mreži proliferacije VSMC pod delovanjem trombina sa posebnim akcentom na molekularni splet događaja u okviru trostruke membranske kaskade transaktivacije EGFR.

Trombin, ključni igrač u „koagulaciono-aterogenskom” lavirintu iskazuje svoje proliferativne efekte preko PAR-1-zavisnih (intracelularnih) (Borissoff i sar., 2009; Hsieh i sar., 2009; Huang i sar., 2009) i PAR-1-nezavisnih mehanizama (vanćelijskih) u VSMC putem svojih proteolitičkih aktivnosti na drugim supstratima, kao što je pro-MMP-2 koja u nastavku podržava proliferaciju VSMC (Galis i sar., 1997; Koo i sar., 2010; Wang i sar., 2009b). Ovde je interesantno istaći da interakcija trombina sa

heparan-sulfat proteoglikanima vodi takvim alosternim promenama katalitičkog mesta, koje menjaju njegovu specifičnost ka supstratu čineći ga potentnim enzimom degradacije vanćelijskih komponenata. Posebno se s naglašava sposobnost aktivacije pro-MMP-2, nezavisne od aktivacije preko MT1-MMP (Koo i sar., 2010). S druge strane, u VSMC MMP-2 može biti aktivirana i od strane MT1-MMP (Newby, 2006), koju aktiviranju c-Src u endotelnim i tumorskim ćelijama (Nyalendo i sar., 2007). Povezujući ove podatke sa radovima o učešću MMP-2 u proteolitičkom cepanju pro-HB-EGF u trombinom stimulisanjoj proliferaciji VSMC omogućilo nam je da na osnovu svih dostupnih literaturnih podataka, kao i na osnovu naših dobijenih rezultata, elaboriramo signalizacionu šemu ekstra- i intracelularnih događaja kaskade transaktivacije EGFR, kao i nizvodnih signala u proliferaciji VSMC stimulisanjoj trombinom (**Slika 6.8.**).

Stoga, predložimo model postojanja spoljno-membranskog delovanja trombina koji vodi aktivaciji pro-MMP-2, nezavisnoj od MT1-MMP (Koo i sar., 2010) (**Slika 6.8.**), i intracelularnog delovanja preko PAR-1 receptora, sa c-Src posredovanom fosforilacijom i aktivacijom MT1-MMP koja takođe doprinosi daljoj aktivaciji pro-MMP-2. Ovakav model zapravo predstavlja doprinos objašnjenju izostanka očekivanog trenda inhibicije EGFR, ERK1/2 i proliferacije VSMC u našim eksperimentima primenom inhibitora MMP-2, imajući u vidu da naši rezultati ukazuju da postoje i mehanizmi aktivacije MMP-2 koji vode proliferaciji VSMC ali nezavisno od ERK1/2 aktivacije. Stoga je i logično što u konkretnom slučaju udeo inhibicije ERK1/2, inhibicijom aktivnosti MMP-2, je znatno manji u odnosu na EGFR i VSMC proliferaciju. Jednom aktivirani MMP-2 cepa pro-HB-EGF; oslobođeni HB-EGF vezuje se za EGFR receptor i aktivira ga (**Slika 6.8.**).

c-Src tirozin kinaza ima važno mesto u prenosu signala od PAR-1 receptora aktiviranog trombinom do transaktivacije EGFR u nekoliko vrsta ćelija, uključujući i VSMC (Bobe i sar., 2003; Wu i sar., 2002). Kao što je pokazano, c-Src fosforiliše citoplazmatski deo MT1-MMP, koji potom biva aktiviran i proteolitički cepa pro MMP-2 (Egeblad i sar., 2002; Visse i sar., 2003). Obzirom da c-Src nije membranski solubilna i deluje unutar ćelije, ona ne može direktno da fosforiliše MMP-2 i aktivira ga, kao što su to u svom modelu predložili Huang i saradnici (2009), već to radi fosforilisani MT1-MMP (**Slika 6.8.**). MT1-MMP je fiziološki aktivator pro MMP-2 (El Bedoui i sar.,

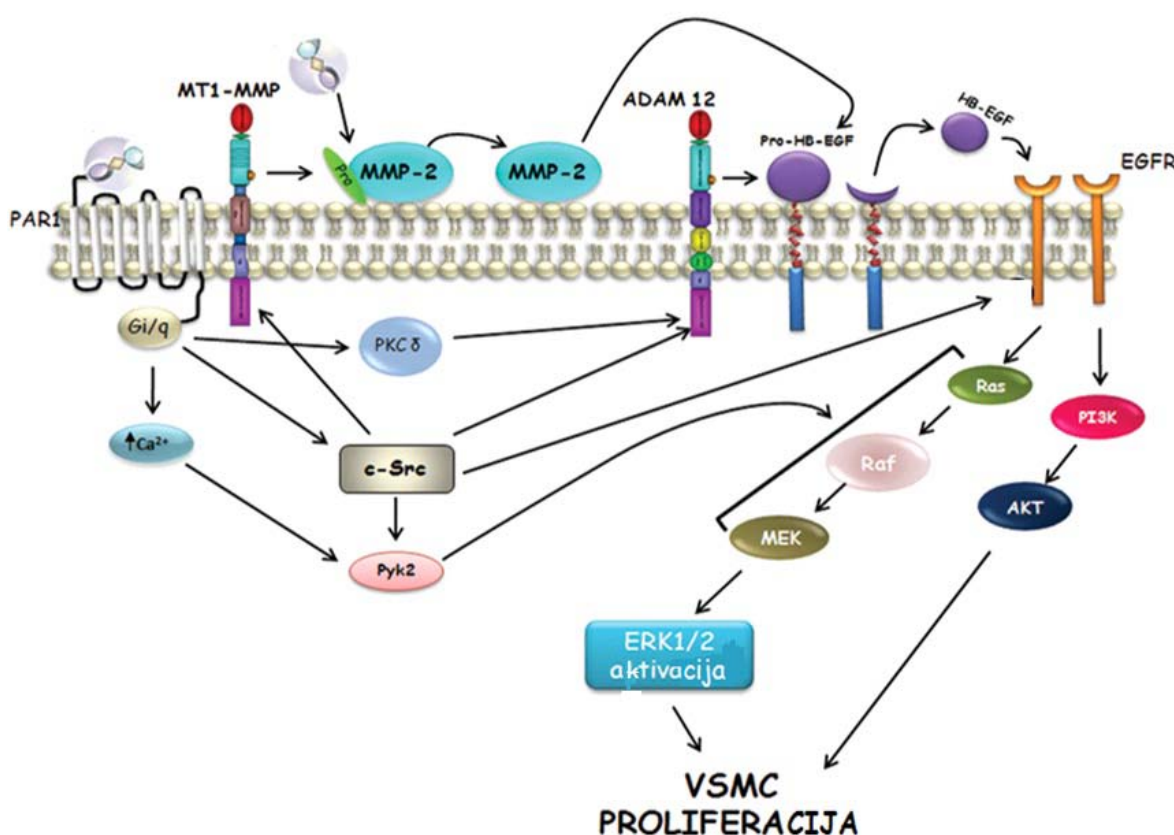
2005). Osim toga, c-Src i direktno transaktivira EGFR receptor na Tyr⁸⁴⁵ (Martorell i sar., 2008; Wu i sar., 2002). Luttrell i saradnici (1997) pokazali su da Gβγ subjedinica receptora spregnutog sa Gi proteinom aktivira c-Src koja potom dovodi do fosforilacije EGFR receptora (Luttrell i sar., 1997).

Hsieh i saradnici (2009) su pokazali da su Gq i Gi subjedinice GPCR angažovane u prenosu signala iniciranog trombinom aktiviranog PAR-1 u VSMC. Bobe i saradnici (2003) su u uslovima deprivacije Ca²⁺ i isključenja signalizacije EGFR receptora, pokazali učešće c-Src uzvodno od Pyk2 kinaze u trombinom stimulisanomj EGFR transaktivaciji i ERK1/2 aktivaciji. Dikić i saradnici (1996) su pokazali da Pyk2 i Src imaju kompleksnu, izjednačenu ulogu, ali ima i radova koji pokazuju da je Ca²⁺-zavisna Pyk2 locirana uzvodno od c-Src kinaze i aktivira je (Blaukat i sar., 1999; Block i sar., 2010). Suprotni nalazi mogu se objasniti različitim eksperimentalnim uslovima, a takođe je moguće da u slučajevima Ca²⁺ deprivacije, prvenstvo ima c-Src, koja potom aktivira Pyk2 (Bobe i sar., 2003).

Mi pretpostavljamo da ADAM 12 proteolitički cepa HB-EGF, što sledstveno aktivira EGFR receptor (Smiljanic i sar., 2011). Za aktivaciju ADAM 12, odgovorna je PKCδ, koja interaguje sa citoplazmatskim delom ADAM 12 direktno, kao što su pokazali Izumi i saradnici (1998) za ADAM 9 i PKCδ i/ili direktnom interakcijom sa c-Src (Suzuki i sar., 2000) (**Slika 6.8.**). Ova interakcija uključuje region bogat prolinom u citoplazmatskom delu ADAM 12 i SH3 domen Src kinaze (Kang i sar., 2000). Ovakav model koji predlažemo zahteva dalja istraživanja kako bi se priroda ove interakcije u VSMC i ekperimentalno potvrdila.

Na osnovu svojih rezultata, Ding i saradnici (2011), sugerišu da specifičnost (selektivnost) oslobađanja EGFR liganada preko PKC-zavisnih i -nezavisnih signalnih puteva uključuje regulaciju proteolitičkog cepanja liganada ne samo na nivou metaloproteinaza (ADAM), već i na nivou nekog drugog adaptornog proteina ili samog prekursora liganda. Isti autori tvrde da PKC izoforma uključena u regulaciju proteolitičkog cepanja HB-EGF ne zavisi ustvari od identiteta ADAM molekula već od stimulusa. To ide u prilog objašnjenju kako je moguće da ADAM 12 bude glavna proteolitička „makazica” HB-EGF u VSMC pod delovanjem trombina naspram velike grupe radova koja govori u prilog ADAM 17 kao glavnom proteolitičkom enzimu koji odcepljuje HB-EGF u ANG II-stimulisanim VSMC. Ovo takođe može objasniti i

različite rezultate vezane za učešće PKC δ i PKC ϵ formi u aktivaciji ADAM 12. Naime, naši rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji, naša preliminarna istraživanja (Smiljanic i sar., 2011), kao i rad Hsieh i saradnika (2009), pokazuju učešće PKC δ u trombinom stimulisanom proliferaciji VSMC. S druge strane, Sundberg i saradnici (2004) sugerišu da PKC ϵ učestvuje u translokaciji ADAM 12 na površinu ćelije u RD ćelijama čoveka (engl “**R**habdomyosarcoma”). Ove razlike o učešću različitih PKC izoformi mogu se objasniti korišćenjem različitih ćelijskih linija, kao i različitih stimulusa, kako je već pretpostavljeno od strane Ding i saradnika (2011).



Slika 6.8. Prikaz signalnih puteva uključenih u efekte trombina na proliferaciju VSMC. Legenda: PAR 1: proteolitički aktiviran receptor 1; Gi/q: subjedinicu *i* i *q* receptora spregnutog sa proteinom G; EGFR: receptor za epidermalni faktor rasta; pro-HB-EGF: transmembranski prekursor faktora rasta sličnog epidermalnom faktoru rasta koji vezuje heparin; HB-EGF: faktora rasta sličnog epidermalnom faktoru rasta koji vezuje heparin; MMP-2: matriksna metaloproteinaza-2; MT1-MMP: transmembranska matriksna metaloproteinaza 1; ADAM 12: adamalizinska metaloproteinaza 12; Ca²⁺: kalcijum; PKC δ : protein kinaza C delta; Pyk2: ne-receptorska tirozin kinaza, bogata prolinom i zavisna od kalcijuma; c-Src: konstitutivna-Src tirozinska kinaza; PI3-K: fosfatidilinozitol-3 –kinaza; AKT: protein kinaza B; Ras: mali GTP-vezujući protein

(mala GTP-aza); Raf - Raf specifična serin/treonin protein kinaza; MEK: mitogenom aktivirana kinaza koja reguliše ERK1/2 kinazu; ERK1/2: ekstracelularnim signalima regulisane kinaze 1 i 2.

Nizvodni signali u trombinom stimulisanom proliferaciji preko ERK1/2 i PI3K/Akt puteva zavisni su od signala transaktivacione kaskade EGFR, s tim da sama aktivacija EGFR nije neophodna za dalje provođenje signala (ERK1/2 aktivaciju i proliferaciju VSMC) što je i jedan od bitnih zaključaka u okviru ove doktorske teze. Za „baj pas” signala od transaktivacione kaskade EGFR pa do aktivacije ERK1/2, u našem modelu predlažemo PKC δ , koja direktno aktivira MAPK kaskadu (Ginnan i sar., 2004), ili preko mehanizma koji uključuje β -arestine. Inhibicija svih izoformi PKC vodi znatnom smanjenju aktivnosti ERK1/2 posredovanim β 1-arestin-protein G receptorskim kompleksima (Jafri i sar., 2006) (**Slika 6.8.**).

Sve je više dokaza u prilog uloge ADAM 12, MMP-2 i PKC δ u proliferaciji VSMC koji ih svrstavaju kao „glasnike“ proliferacije VSMC (engl. “messenger molecules”). Ovi enzimi igraju vitalnu ulogu u mnogim patofiziološkim i biohemijским reakcijama. Praktično, ADAM 12 i MMP-2 kao posrednici proliferacije VSMC pod delovanjem trombina, su dobar putokaz u smeru sinteze novih antiproliferativnih molekula; nova saznanja o njihovoj ulozi stimulisace farmakološka istraživanja u smeru targetiranja ova dva molekula istovremeno.

U zaključku, ADAM 12, MMP-2 i PKC δ uključeni su u trombinom stimulisanom proliferaciji VSMC. Saznanje o učešću nekog od ADAM molekula u proliferaciji glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova pod delovanjem trombina od izuzetne je važnosti za bolje razumevanje uloge trombina u kardiovaskularnoj biologiji i medicini. Pošto je ADAM 12 potvrđen kao medijator hipertrofije VSMC, on, zajedno sa MMP-2 može biti prepoznat kao ključna „meta” u novim terapijskim intervencijama kojima bi se smanjilo ireverzibilno oštećenje tkiva povezano sa aterosklerozom i hipertenzijom. Jedna od poželjnih opcija, kao *in vivo* regulisane sinteze MMP-2 i ADAM 12, zasigurno bi u terapijskoj intervenciji doprinela redukciji patološke proliferacije VSMC.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih i prikazanih u okviru ove doktorske disertacije mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Trombin dovodi do proliferacije primarnih kultura glatkih mišićnih ćelija aorte pacova dvojakim mehanizmom: aktivacijom svojih PAR receptora i direktnim proteolitičkim cepanjem molekula pro-MMP-2 izlučenog na površinu ćelijske membrane.

2. Trombin aktivira trombinske PAR receptore i dovodi do transaktivacije EGFR receptora i aktivacije ERK1/2 kinaze, neophodne za proliferaciju primarne kulture glatkih mišićnih ćelija aorte (VSMC) pacova. Primena PD i AG inhibitora pokazala je potpunu inhibiciju EGFR receptora, kao i delimična smanjenja aktivacije ERK1/2 i proliferacije VSMC stimulisane trombinom.

3. Glavni ligand EGFR je HB-EGF koji pod delovanjem trombina, biva oslobođen proteolitičkim cepanjem od strane metaloproteinaza, i aktivira EGFR receptor u primarnoj kulturi VSMC pacova. Njegova blokada sa anti-HB-EGF neutrališućim antitelom, dovodi do potpune inhibicije aktivacije EGFR i delimičnih inhibicija aktivacije ERK1/2 i proliferacije VSMC stimulisanih trombinom.

4. HB-EGF se oslobađa proteolizom pro-HB-EGF koju vrše metaloproteinaze ADAM 12 i MMP-2. Inhibicija aktivnosti ADAM 12 i MMP-2 dovodi do delimične inhibicije ERK1/2 kinaze i proliferacije VSMC stimulisane trombinom. ADAM inhibitor je potpuno inaktivirao EGFR. Ovim je po prvi put pokazano učešće nekog ADAM molekula u trombinom stimulisanoj proliferaciji ćelija.

5. PKC δ je važan molekul-spona između transaktivacije EGFR receptora i signalnog puta trombinskih PAR receptora u proliferaciji primarnih kultura VSMC stimulisanih trombinom. Inhibicija aktivnosti PKC δ dovodi do parcijalne

inhibicije EGFR i ERK1/2 aktivacije, i njihov stepen inhibicije je ujednačen u odnosu na manji stepen delimične inhibicije proliferacije primarnih kultura VSMC stimulisanih trombinom.

6. Aktivacija EGFR receptora u njegovoj transaktivacionoj kaskadi pod delovanjem trombina je važan ali ne i presudan događaj za ostvarenje proliferacije primarnih kultura VSMC pacova. Potpuno isključenje EGFR receptora sa AG i PD inhibitorima i posredno preko neutralizacije HB-EGF i inhibicije aktivnosti ADAM 12, samo delimično inhibira proliferaciju VSMC primarnih kultura pacova stimulisanih trombinom.

7. ERK1/2 je važan molekul u proliferaciji VSMC stimulisanom trombinom. Inhibicija molekula učesnika signalnog puta koji vodi proliferaciji VSMC: EGFR, HB-EGF, ADAM 12, MMP-2 i PKC δ inhibira aktivaciju ERK1/2 u istoj meri kao i proliferaciju VSMC stimulisanu trombinom.

8. Izolovana aktivacija EGFR nije neophodna za dalje provođenje signala aktivacije ERK1/2 i proliferacije VSMC pod delovanjem trombina. To govori u prilog postojanju EGFR-zavisnih puteva aktivacije ERK1/2 i proliferacije VSMC, kao i EGFR-nezavisnih puteva aktivacije ERK1/2 i proliferacije VSMC stimulisanih trombinom. PKC δ je jedan od mogućih signala učesnika u EGFR-nezavisnom putu proliferacije primarnih kultura stimulisanim trombinom.

Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji a koji se odnose na istraživanje učešća i identiteta ADAM molekula u proliferaciji VSMC su prvi eksperimentalni podaci koji ukazuju na učešće nekog ADAM molekula u trombinom stimulisanom proliferaciji ćelija. Takođe, po prvi put je pokazano da ADAM 12 učestvuje u proliferaciji VSMC bez obzira na agonist, tj stimulus proliferacije. Po prvi put smo pokazali da specifični MMP-2 inhibitor (SI-II), inhibira aktivnost MMP-2 i time smanjuje aktivaciju EGFR receptora i ERK1/2 kinaze, kao i proliferaciju VSMC stimulisanih trombinom. Ova inhibicija aktivnosti MMP-2 sa SI-II u VSMC govori u prilog pozitivnom učešću MMP-2 u proliferaciji VSMC stimulisanom trombinom. Zajedno, ovi rezultati ukazuju da su ADAM 12 i MMP-2 glavne molekulske makaze koji „isecaju” prekursor pro-HB-EGF, dajući slobodni HB-EGF ligand, koji potom transaktivira EGFR receptor. To ukazuje da se za stimulus (trombin), vezuje regulacija

selektivnosti pojedinačnog ADAM molekula (ADAM 12) a ne kao što se dosada smatralo, isključivo samo za supstrat (u ovom slučaju HB-EGF). PKC δ je jedna od spona trostruke membranske kaskade transaktivacionog EGFR signala i aktivacije ERK1/2 kinaze u proliferaciji VSMC stimulisanih trombinom. Naši rezultati po prvi put pokazuju da je inhibicija proliferacije VSMC nastala usled blokiranja PKC δ primenom Rot inhibitora. Takođe, primena EGFR inhibitora, PD169540, u VSMC, po prvi put pokazuje inhibiciju proliferacije VSMC kao i inhibiciju aktivacije EGFR i ERK1/2 kinaze u VSMC pod delovanjem trombina.

Potencijalni naučni doprinos ove doktorske disertacije je između ostalog u upoznavanju procesa rasta i funkcionisanja VSMC u patofiziološkim stanjima kao što je to npr. proces ateroskleroze u kome proliferacija VSMC ima ključnu ulogu. Izučavanja usmerena u tom pravcu su od izuzetne važnosti za razumevanje uloge trombina kako u vaskularnoj biologiji tako i u kardiovaskularnim oboljenjima.

8. REFERENCE

1. Adak S, Yang KS, Macdonald-Obermann J and Pike LJ. (2011.) The membrane-proximal intracellular domain of the epidermal growth factor receptor underlies negative cooperativity in ligand binding. *J Biol Chem.* 286: 45146-45155.
2. Aguilera CM, George SJ, Johnson JL and Newby AC. (2003.) Relationship between type IV collagen degradation, metalloproteinase activity and smooth muscle cell migration and proliferation in cultured human saphenous vein. *Cardiovasc Res.* 58: 679-688.
3. Ahn S, Shenoy SK, Wei H and Lefkowitz RJ. (2004a.) Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor. *J Biol Chem.* 279: 35518-35525.
4. Ahn S, Wei H, Garrison TR and Lefkowitz RJ. (2004b.) Reciprocal regulation of angiotensin receptor-activated extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestins 1 and 2. *J Biol Chem.* 279: 7807-7811.
5. Andreev J, Galisteo ML, Kranenburg O, Logan SK, et al. (2001.) Src and Pyk2 mediate G-protein-coupled receptor activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) but are not required for coupling to the mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling cascade. *J Biol Chem.* 276: 20130-20135.
6. Andres V and Castro C. (2003.) Antiproliferative strategies for the treatment of vascular proliferative disease. *Curr Vasc Pharmacol.* 1: 85-98.
7. Andrew M, Paes B, Milner R, Johnston M, et al. (1987.) Development of the human coagulation system in the full-term infant. *Blood.* 70: 165-172.
8. Asakura M, Kitakaze M, Takashima S, Liao Y, et al. (2002.) Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat Med.* 8: 35-40.
9. Assender JW, Kontny E and Fredholm BB. (1994.) Expression of protein kinase C isoforms in smooth muscle cells in various states of differentiation. *FEBS Lett.* 342: 76-80.
10. Assoian RK and Marcantonio EE. (1996.) The extracellular matrix as a cell cycle control element in atherosclerosis and restenosis. *J Clin Invest.* 98: 2436-2439.
11. Assoian RK and Schwartz MA. (2001.) Coordinate signaling by integrins and receptor tyrosine kinases in the regulation of G1 phase cell-cycle progression. *Curr Opin Genet Dev.* 11: 48-53.
12. Bachhuber BG, Sarembock IJ, Gimple LW, McNamara CA, et al. (1995.) Thrombin-induced mitogenesis in cultured aortic smooth muscle cells requires

- prolonged thrombin exposure. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 268: C1141-C1147.
13. Bahou WF. (2003.) Proteinase-activated receptors. *Current Topics in Developmental Biology*. 54: 343-369.
 14. Bar-Shavit R, Kahn A, Fenton JW, 2nd and Wilner GD. (1983.) Chemotactic response of monocytes to thrombin. *J Cell Biol*. 96: 282-285.
 15. Barlow-Coleman JZ
 16. Bea F, Kreuzer J, Preusch M, Schaab S, et al. (2006.) Melagatran reduces advanced atherosclerotic lesion size and may promote plaque stability in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 26: 2787-2792.
 17. Beckman JA, Creager MA and Libby P. (2002.) Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA*. 287: 2570-2581.
 18. Bendeck MP, Irvin C and Reidy MA. (1996.) Inhibition of matrix metalloproteinase activity inhibits smooth muscle cell migration but not neointimal thickening after arterial injury. *Circ Res*. 78: 38-43.
 19. Bendeck MP, Zempo N, Clowes AW, Galardy RE, et al. (1994.) Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. *Circ Res*. 75: 539-545.
 20. Berk BC. (2001.) Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. *Physiol Rev*. 81: 999-1030.
 21. Bingley JA, Hayward IP, Campbell JH and Campbell GR. (1998.) Arterial heparan sulfate proteoglycans inhibit vascular smooth muscle cell proliferation and phenotype change in vitro and neointimal formation in vivo. *J Vasc Surg*. 28: 308-318.
 22. Bizios R, Lai L, Fenton JW, 2nd and Malik AB. (1986.) Thrombin-induced chemotaxis and aggregation of neutrophils. *J Cell Physiol*. 128: 485-490.
 23. Blaukat A, Ivankovic-Dikic I, Gronroos E, Dolfi F, et al. (1999.) Adaptor proteins Grb2 and Crk couple Pyk2 with activation of specific mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem*. 274: 14893-14901.
 24. Block ER, Tolino MA and Klarlund JK. (2010.) Pyk2 activation triggers epidermal growth factor receptor signaling and cell motility after wounding sheets of epithelial cells. *J Biol Chem*. 285: 13372-13379.
 25. Bobe R, Yin X, Roussanne MC, Stepien O, et al. (2003.) Evidence for ERK1/2 activation by thrombin that is independent of EGFR transactivation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 285: H745-754.
 26. Borissoff JI, Spronk HM, Heeneman S and ten Cate H. (2009.) Is thrombin a key player in the 'coagulation-atherogenesis' maze? *Cardiovasc Res*. 82: 392-403.
 27. Brandes RP, Viedt C, Nguyen K, Beer S, et al. (2001.) Thrombin-induced MCP-1 expression involves activation of the p22phox-containing NADPH oxidase in human vascular smooth muscle cells. *Thromb Haemost*. 85: 1104-1110.

28. Brass LF. (2003.) Thrombin and Platelet Activation*. *Chest*. 124: 18S-25S.
29. Brass LF and Molino M. (1997.) Protease-activated G protein-coupled receptors on human platelets and endothelial cells. *Thromb Haemost*. 78: 234-241.
30. Braun-Dullaeus RC, Mann MJ, Seay U, Zhang L, et al. (2001.) Cell cycle protein expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo is regulated through phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 21: 1152-1158.
31. Bublil EM and Yarden Y. (2007.) The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Current Opinion in Cell Biology*. 19: 124-134.
32. Campbell GR and Campbell JH. (1985.) Smooth muscle phenotypic changes in arterial wall homeostasis: implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Exp Mol Pathol*. 42: 139-162.
33. Campbell JH, Black MJ and Campbell GR (1989). Replication of smooth muscle cells in atherosclerosis and hypertension. New York, Raven Press.
34. Cao Y, Kang Q, Zhao Z and Zolkiewska A. (2002.) Intracellular processing of metalloprotease disintegrin ADAM12. *J Biol Chem*. 277: 26403-26411.
35. Carney DH, Redin W and McCroskey L. (1992.) Role of high-affinity thrombin receptors in postclotting cellular effects of thrombin. *Semin Thromb Hemost*. 18: 91-103.
36. Chang C and Werb Z. (2001.) The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol*. 11: S37-43.
37. Cheng L, Mantile G, Pauly R, Nater C, et al. (1998.) Adenovirus-mediated gene transfer of the human tissue inhibitor of metalloproteinase-2 blocks vascular smooth muscle cell invasiveness in vitro and modulates neointimal development in vivo. *Circulation*. 98: 2195-2201.
38. Clowes AW and Clowes MM. (1987.) Regulation of smooth muscle proliferation by heparin in vitro and in vivo. *Int Angiol*. 6: 45-51.
39. Colotta F, Sciacca FL, Sironi M, Luini W, et al. (1994.) Expression of monocyte chemotactic protein-1 by monocytes and endothelial cells exposed to thrombin. *Am J Pathol*. 144: 975-985.
40. Coughlin SR. (2000.) Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*. 407: 258-264.
41. Coughlin SR. (2000.) Thrombin signaling and protease-activated receptors. *Nature*. 407: 258-264.
42. Daub H, Weiss FU, Wallasch C and Ullrich A. (1996.) Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature*. 379: 557-560.
43. Davies SP, Reddy H, Caivano M and Cohen P. (2000.) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J*. 351: 95-105.

44. DeFea KA, Zalevsky J, Thoma MS, Dery O, et al. (2000.) beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol.* 148: 1267-1281.
45. Delekta PC, Apel IJ, Gu S, Siu K, et al. (2010.) Thrombin-dependent NF- κ B activation and monocyte/endothelial adhesion are mediated by the CARMA3.Bcl10.MALT1 signalosome. *J Biol Chem.* 285: 41432-41442.
46. Ding RQ, Tsao J, Chai H, Mochly-Rosen D, et al. (2011.) Therapeutic Potential for Protein Kinase C Inhibitor in Vascular Restenosis. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics.* 16: 160-167.
47. Dluz SM, Higashiyama S, Damm D, Abraham JA, et al. (1993.) Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor expression in cultured fetal human vascular smooth muscle cells. Induction of mRNA levels and secretion of active mitogen. *J Biol Chem.* 268: 18330-18334.
48. Dollery CM, McEwan JR, Wang M, Sang QA, et al. (1999.) TIMP-4 is regulated by vascular injury in rats. *Circ Res.* 84: 498-504.
49. Doran AC, Meller N and McNamara CA. (2008.) Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28: 812-819.
50. Downward J, Parker P and Waterfield MD. (1984.) Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor. *Nature.* 311: 483-485.
51. Dreux AC, Lamb DJ, Modjtahedi H and Ferns GA. (2006.) The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: their putative role in atherogenesis. *Atherosclerosis.* 186: 38-53.
52. Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC and Sedding DG. (2002.) Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med.* 8: 1249-1256.
53. Ebi M, Kataoka H, Shimura T, Kubota E, et al. (2010.) TGFbeta induces proHB-EGF shedding and EGFR transactivation through ADAM activation in gastric cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 402: 449-454.
54. Egeblad M and Werb Z. (2002.) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2: 161-174.
55. Eguchi S, Dempsey PJ, Frank GD, Motley ED, et al. (2001.) Activation of MAPKs by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Metalloprotease-dependent EGF receptor activation is required for activation of ERK and p38 MAPK but not for JNK. *J Biol Chem.* 276: 7957-7962.
56. Eguchi S, Numaguchi K, Iwasaki H, Matsumoto T, et al. (1998.) Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 273: 8890-8896.
57. El Bedoui J, Oak MH, Anglard P and Schini-Kerth VB. (2005.) Catechins prevent vascular smooth muscle cell invasion by inhibiting MT1-MMP activity and MMP-2 expression. *Cardiovasc Res.* 67: 317-325.

58. Elledge SJ. (1996.) Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science*. 274: 1664-1672.
59. Elshaw SR, Henderson N, Knox AJ, Watson SA, et al. (2004.) Matrix metalloproteinase expression and activity in human airway smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*. 142: 1318-1324.
60. Esmon CT, Fukudome K, Mather T, Bode W, et al. (1999.) Inflammation, sepsis, and coagulation. *Haematologica*. 84: 254-259.
61. Fager G. (1995.) Thrombin and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 77: 645-650.
62. Feil S, Hofmann F and Feil R. (2004.) SM22alpha modulates vascular smooth muscle cell phenotype during atherogenesis. *Circ Res*. 94: 863-865.
63. Ferguson KM, Berger MB, Mendrola JM, Cho H-S, et al. (2003.) EGF Activates Its Receptor by Removing Interactions that Autoinhibit Ectodomain Dimerization. *Molecular Cell*. 11: 507-517.
64. Force T and Bonventre JV. (1998.) Growth factors and mitogen-activated protein kinases. *Hypertension*. 31: 152-161.
65. Frank GD, Mifune M, Inagami T, Ohba M, et al. (2003.) Distinct mechanisms of receptor and nonreceptor tyrosine kinase activation by reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells: role of metalloprotease and protein kinase C-delta. *Mol Cell Biol*. 23: 1581-1589.
66. Fukumoto S, Nishizawa Y, Hosoi M, Koyama H, et al. (1997.) Protein kinase C delta inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells by suppressing G1 cyclin expression. *J Biol Chem*. 272: 13816-13822.
67. Galis ZS, Kranzhofer R, Fenton JW, 2nd and Libby P. (1997.) Thrombin promotes activation of matrix metalloproteinase-2 produced by cultured vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 17: 483-489.
68. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW and Libby P. (1994.) Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 94: 2493-2503.
69. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, et al. (1998.) Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation*. 98: 1164-1171.
70. Gechtman Z, Alonso JL, Raab G, Ingber DE, et al. (1999.) The shedding of membrane-anchored heparin-binding epidermal-like growth factor is regulated by the Raf/mitogen-activated protein kinase cascade and by cell adhesion and spreading. *J Biol Chem*. 274: 28828-28835.
71. Giacco F, Perruolo G, D'Agostino E, Fratellanza G, et al. (2006.) Thrombin-activated platelets induce proliferation of human skin fibroblasts by stimulating autocrine production of insulin-like growth factor-1. *FASEB J*. 20: 2402-2404.

72. Gilpin BJ, Loechel F, Mattei MG, Engvall E, et al. (1998.) A novel, secreted form of human ADAM 12 (meltrin alpha) provokes myogenesis in vivo. *J Biol Chem.* 273: 157-166.
73. Ginnan R, Pflleiderer PJ, Pumiglia K and Singer HA. (2004.) PKC-delta and CaMKII-delta 2 mediate ATP-dependent activation of ERK1/2 in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 286: C1281-1289.
74. Grobelny D, Poncz L and Galardy RE. (1992.) Inhibition of human skin fibroblast collagenase, thermolysin, and *Pseudomonas aeruginosa* elastase by peptide hydroxamic acids. *Biochemistry.* 31: 7152-7154.
75. Grossoni VC, Falbo KB, Kazanietz MG, de Kier Joffe ED, et al. (2007.) Protein kinase C delta enhances proliferation and survival of murine mammary cells. *Mol Carcinog.* 46: 381-390.
76. Gschwendt M, Muller HJ, Kielbassa K, Zang R, et al. (1994.) Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun.* 199: 93-98.
77. Gutkind JS. (1998a.) Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. *Oncogene.* 17: 1331-1342.
78. Gutkind JS. (1998b.) The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem.* 273: 1839-1842.
79. Guyton AC and Hall JE (1999). *Medicinska fiziologija*. Beograd, Savremena administracija.
80. Hallam TJ, Pearson JD and Needham LA. (1988.) Thrombin-stimulated elevation of human endothelial-cell cytoplasmic free calcium concentration causes prostacyclin production. *Biochem J.* 251: 243-249.
81. Hamilton JR and Cocks TM. (2000.) Heterogeneous mechanisms of endothelium-dependent relaxation for thrombin and peptide activators of protease-activated receptor-1 in porcine isolated coronary artery. *Br J Pharmacol.* 130: 181-188.
82. Haralabopoulos GC, Grant DS, Kleinman HK and Maragoudakis ME. (1997.) Thrombin promotes endothelial cell alignment in Matrigel in vitro and angiogenesis in vivo. *Am J Physiol.* 273: C239-245.
83. Hasenstab D, Forough R and Clowes AW. (1997.) Plasminogen activator inhibitor type 1 and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 increase after arterial injury in rats. *Circ Res.* 80: 490-496.
84. Hayashi K and Naiki T. (2009.) Adaptation and remodeling of vascular wall; biomechanical response to hypertension. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2: 3-19.
85. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, et al. (1998.) CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature.* 391: 591-594.
86. Higashiyama S, Abraham JA, Miller J, Fiddes JC, et al. (1991.) A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science.* 251: 936-939.

87. Hirano K. (2007.) The roles of proteinase-activated receptors in the vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27: 27-36.
88. Hirayama R, Yamamoto M, Tsukida T, Matsuo K, et al. (1997.) Synthesis and biological evaluation of orally active matrix metalloproteinase inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 5: 765-778.
89. Hooper NM. (1994.) Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.* 354: 1-6.
90. Hozawa A, Folsom AR, Sharrett AR and Chambless LE. (2007.) Absolute and attributable risks of cardiovascular disease incidence in relation to optimal and borderline risk factors: comparison of African American with white subjects--Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Arch Intern Med.* 167: 573-579.
91. Hsieh HL, Sun CC, Wang TS and Yang CM. (2008.) PKC-delta/c-Src-mediated EGF receptor transactivation regulates thrombin-induced COX-2 expression and PGE(2) production in rat vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta.* 1783: 1563-1575.
92. Hsieh HL, Tung WH, Wu CY, Wang HH, et al. (2009.) 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.* 29: 1594-1601.
93. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Shedding_01.svg
94. http://en.wikipedia.org/wiki/File:EGF_Receptor.jpg
95. Hu WY, Fukuda N, Ikeda Y, Suzuki R, et al. (2003.) Human-derived vascular smooth muscle cells produce angiotensin II by changing to the synthetic phenotype. *J Cell Physiol.* 196: 284-292.
96. Huang YL, Shi GY, Lee H, Jiang MJ, et al. (2009.) Thrombin induces nestin expression via the transactivation of EGFR signalings in rat vascular smooth muscle cells. *Cell Signal.* 21: 954-968.
97. Hultgardh-Nilsson A, Lovdahl C, Blomgren K, Kallin B, et al. (1997.) Expression of phenotype- and proliferation-related genes in rat aortic smooth muscle cells in primary culture. *Cardiovasc Res.* 34: 418-430.
98. Huovila AP, Turner AJ, Pelto-Huikko M, Karkkainen I, et al. (2005.) Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends Biochem Sci.* 30: 413-422.
99. Husmann M and Barton M. (2007.) Therapeutical potential of direct thrombin inhibitors for atherosclerotic vascular disease. *Expert Opin Investig Drugs.* 16: 563-567.
100. Ichikawa Y, Miura T, Nakano A, Miki T, et al. (2004.) The role of ADAM protease in the tyrosine kinase-mediated trigger mechanism of ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res.* 62: 167-175.
101. Ichiki T, Tokunou T, Fukuyama K, Iino N, et al. (2004.) 15-Deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 and thiazolidinediones transactivate epidermal growth factor and platelet-derived growth factor receptors in vascular smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 323: 402-408.

102. Igura T, Kawata S, Miyagawa J, Inui Y, et al. (1996.) Expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in neointimal cells induced by balloon injury in rat carotid arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 16: 1524-1531.
103. Ikejiri M, Bernardo MM, Bonfil RD, Toth M, et al. (2005.) Potent mechanism-based inhibitors for matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 280: 33992-34002.
104. Isenovic ER, Fretaud M, Dobutovic B, Sudar E, et al. (2009a.) A novel hypothesis regarding the possible involvement of cytosolic phospholipase 2 in insulin-stimulated proliferation of vascular smooth muscle cells. *Cell Biol Int.* 33: 386-392.
105. Isenovic ER, Fretaud M, Koricanac G, Sudar E, et al. (2009b.) Insulin regulation of proliferation involves activation of AKT and ERK 1/2 signaling pathways in vascular smooth muscle cells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 117: 214-219.
106. Isenovic ER, Jacobs DB, Kedees MH, Sha Q, et al. (2004.) Angiotensin II regulation of the Na⁺ pump involves the phosphatidylinositol-3 kinase and p42/44 mitogen-activated protein kinase signaling pathways in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology.* 145: 1151-1160.
107. Isenovic ER, Kedees MH, Haidara MA, Trpkovic A, et al. (2010a.) Involvement of ERK1/2 kinase in insulin-and thrombin-stimulated vascular smooth muscle cell proliferation. *Angiology.* 61: 357-364.
108. Isenovic ER, Soskic S, Trpkovic A, Dobutovic B, et al. (2010b.) Insulin, Thrombine, ERK1/2 Kinase And Vascular Smooth Muscle Cells Proliferation. *Curr Pharm Des.* 16: 3895-3902.
109. Isenovic ER, Trpkovic A, Zakula Z, Koricanac G, et al. (2008.) Role of ERK1/2 Activation In Thrombin-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Hypertrophy. *Current Hypertension Reviews.* 4: 190-196.
110. Islam MM, Franco CD, Courtman DW and Bendeck MP. (2003.) A nonantibiotic chemically modified tetracycline (CMT-3) inhibits intimal thickening. *Am J Pathol.* 163: 1557-1566.
111. Ivanov A, Gerzanich V, Ivanova S, DenHaese R, et al. (2006.) Adenylate cyclase 5 and KCa1.1 channel are required for EGFR up-regulation of PCNA in native contractile rat basilar artery smooth muscle. *The Journal of Physiology.* 570: 73-84.
112. Izumi Y, Hirata M, Hasuwa H, Iwamoto R, et al. (1998.) A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *EMBO J.* 17: 7260-7272.
113. Jafri F, El-Shewy HM, Lee MH, Kelly M, et al. (2006.) Constitutive ERK1/2 activation by a chimeric neurokinin 1 receptor-beta-arrestin1 fusion protein. Probing the composition and function of the G protein-coupled receptor "signalsome". *J Biol Chem.* 281: 19346-19357.
114. Jenkins GM, Crow MT, Bilato C, Gluzband Y, et al. (1998.) Increased expression of membrane-type matrix metalloproteinase and preferential

- localization of matrix metalloproteinase-2 to the neointima of balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation*. 97: 82-90.
115. Jiang G and Hunter T. (1999.) Receptor signaling: when dimerization is not enough. *Curr Biol*. 9: R568-571.
 116. Johnson S and Knox A. (1999.) Autocrine production of matrix metalloproteinase-2 is required for human airway smooth muscle proliferation. *Am J Physiol*. 277: L1109-1117.
 117. Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, et al. (1998.) A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature*. 394: 690-694.
 118. Kalmes A, Daum G and Clowes AW. (2001.) EGFR transactivation in the regulation of SMC function. *Ann N Y Acad Sci*. 947: 42-54; discussion 54-45.
 119. Kalmes A, Vesti BR, Daum G, Abraham JA, et al. (2000.) 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*. 87: 92-98.
 120. Kanda Y, Mizuno K, Kuroki Y and Watanabe Y. (2001.) Thrombin-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation is mediated by epidermal growth factor receptor transactivation pathway. *Br J Pharmacol*. 132: 1657-1664.
 121. Kang Q, Cao Y and Zolkiewska A. (2000.) Metalloprotease-disintegrin ADAM 12 binds to the SH3 domain of Src and activates Src tyrosine kinase in C2C12 cells. *Biochem J*. 352 Pt 3: 883-892.
 122. Kang Q, Cao Y and Zolkiewska A. (2001.) Direct interaction between the cytoplasmic tail of ADAM 12 and the Src homology 3 domain of p85alpha activates phosphatidylinositol 3-kinase in C2C12 cells. *J Biol Chem*. 276: 24466-24472.
 123. Kenagy RD, Hart CE, Stetler-Stevenson WG and Clowes AW. (1997.) Primate smooth muscle cell migration from aortic explants is mediated by endogenous platelet-derived growth factor and basic fibroblast growth factor acting through matrix metalloproteinases 2 and 9. *Circulation*. 96: 3555-3560.
 124. Kinsella MG, Tran PK, Weiser-Evans MC, Reidy M, et al. (2003.) Changes in perlecan expression during vascular injury: role in the inhibition of smooth muscle cell proliferation in the late lesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 23: 608-614.
 125. Kocer SS, Walker SG, Zerler B, Golub LM, et al. (2005.) Metalloproteinase inhibitors, nonantimicrobial chemically modified tetracyclines, and ilomastat block *Bacillus anthracis* lethal factor activity in viable cells. *Infect Immun*. 73: 7548-7557.
 126. Kodama T, Ikeda E, Okada A, Ohtsuka T, et al. (2004.) ADAM12 is selectively overexpressed in human glioblastomas and is associated with glioblastoma cell proliferation and shedding of heparin-binding epidermal growth factor. *Am J Pathol*. 165: 1743-1753.
 127. Koepp DM, Harper JW and Elledge SJ. (1999.) How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell*. 97: 431-434.

128. Kohler M, Janz I, Wintzer HO, Wagner E, et al. (1989.) The expression of EGF receptors, EGF-like factors and c-myc in ovarian and cervical carcinomas and their potential clinical significance. *Anticancer Res.* 9: 1537-1547.
129. Kojima K, Motoshima H, Tsutsumi A, Igata M, et al. (2008.) Rottlerin activates AMPK possibly through LKB1 in vascular cells and tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 376: 434-438.
130. Koo BH, Han JH, Yeom YI and Kim DS. (2010.) Thrombin-dependent MMP-2 activity is regulated by heparan sulfate. *J Biol Chem.* 285: 41270-41279.
131. Kranzhofer R, Clinton SK, Ishii K, Coughlin SR, et al. (1996.) Thrombin potently stimulates cytokine production in human vascular smooth muscle cells but not in mononuclear phagocytes. *Circ Res.* 79: 286-294.
132. Laemmli UK. (1970.) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
133. Lane DA, Philippou H and Huntington JA. (2005.) Directing thrombin. *Blood.* 106: 2605-2612.
134. Levin EG, Marzec U, Anderson J and Harker LA. (1984.) Thrombin stimulates tissue plasminogen activator release from cultured human endothelial cells. *J Clin Invest.* 74: 1988-1995.
135. Levitzki A and Gazit A. (1995.) Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science.* 267: 1782-1788.
136. Lewis C, Zhu W, Pavkov ML, Kinney CM, et al. (2008.) Arginase blockade lessens endothelial dysfunction after thrombosis. *J Vasc Surg.* 48: 441-446.
137. Lewis TS, Shapiro PS and Ahn NG. (1998.) Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res.* 74: 49-139.
138. Li Z, Li L, Zielke HR, Cheng L, et al. (1996.) Increased expression of 72-kd type IV collagenase (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 148: 121-128.
139. Libby P, Ridker PM and Maseri A. (2002.) Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 105: 1135-1143.
140. Libermann TA, Nusbaum HR, Razon N, Kris R, et al. (1985.) Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. *Nature.* 313: 144-147.
141. Lim JH, Park JW, Choi KS, Park YB, et al. (2009.) Rottlerin induces apoptosis via death receptor 5 (DR5) upregulation through CHOP-dependent and PKC delta-independent mechanism in human malignant tumor cells. *Carcinogenesis.* 30: 729-736.
142. Lin CC, Shyr MH, Chien CS, Wang CC, et al. (2001.) Mechanisms of thrombin-induced MAPK activation associated with cell proliferation in human cultured tracheal smooth muscle cells. *Cell Signal.* 13: 257-267.
143. Lin CC, Shyr MH, Chien CS, Wang CC, et al. (2002.) Thrombin-stimulated cell proliferation mediated through activation of Ras/Raf/MEK/MAPK pathway in canine cultured tracheal smooth muscle cells. *Cell Signal.* 14: 265-275.

144. Lovdahl C, Thyberg J and Hultgardh-Nilsson A. (2000.) The synthetic metalloproteinase inhibitor batimastat suppresses injury-induced phosphorylation of MAP kinase ERK1/ERK2 and phenotypic modification of arterial smooth muscle cells in vitro. *J Vasc Res.* 37: 345-354.
145. Lozonschi L, Sunamura M, Kobari M, Egawa S, et al. (1999.) Controlling Tumor Angiogenesis and Metastasis of C26 Murine Colon Adenocarcinoma by a New Matrix Metalloproteinase Inhibitor, KB-R7785, in Two Tumor Models. *Cancer Research.* 59: 1252-1258.
146. Lucchesi PA, Sabri A, Belmadani S and Matrougui K. (2004.) Involvement of metalloproteinases 2/9 in epidermal growth factor receptor transactivation in pressure-induced myogenic tone in mouse mesenteric resistance arteries. *Circulation.* 110: 3587-3593.
147. Luo Y, Marx SO, Kiyokawa H, Koff A, et al. (1996.) Rapamycin resistance tied to defective regulation of p27Kip1. *Mol Cell Biol.* 16: 6744-6751.
148. Lutgens E, Lievens D, Beckers L, Donners M, et al. (2007.) CD40 and its ligand in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* 17: 118-123.
149. Luttrell LM. (2003.) 'Location, location, location': activation and targeting of MAP kinases by G protein-coupled receptors. *J Mol Endocrinol.* 30: 117-126.
150. Luttrell LM, Della Rocca GJ, van Biesen T, Luttrell DK, et al. (1997.) Gbetagamma subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation. *J Biol Chem.* 272: 4637-4644.
151. Luttrell LM, Roudabush FL, Choy EW, Miller WE, et al. (2001.) Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 2449-2454.
152. Mahtouk K, Hose D, Reme T, De Vos J, et al. (2005.) Expression of EGF-family receptors and amphiregulin in multiple myeloma. Amphiregulin is a growth factor for myeloma cells. *Oncogene.* 24: 3512-3524.
153. Maki J, Hirano M, Hoka S, Kanaide H, et al. (2010.) Involvement of reactive oxygen species in thrombin-induced pulmonary vasoconstriction. *Am J Respir Crit Care Med.* 182: 1435-1444.
154. Mangi AA and Dzau VJ. (2001.) Gene therapy for human bypass grafts. *Ann Med.* 33: 153-155.
155. Mann KG, Butenas S and Brummel K. (2003.) The dynamics of thrombin formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23: 17-25.
156. Mann MJ, Whittemore AD, Donaldson MC, Belkin M, et al. (1999.) Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the PREVENT single-centre, randomised, controlled trial. *Lancet.* 354: 1493-1498.
157. Marche P, Herembert T and Zhu DL. (1995.) Molecular mechanisms of vascular hypertrophy in the spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl.* 22: S114-116.

158. Marche P, Limon I, Zelenika D and Koutouzov S. (1990.) [Membrane abnormalities and cellular hyperreactivity in different models of hypertension]. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 83: 1175-1177.
159. Marin V, Farnarier C, Gres S, Kaplanski S, et al. (2001a.) The p38 mitogen-activated protein kinase pathway plays a critical role in thrombin-induced endothelial chemokine production and leukocyte recruitment. *Blood.* 98: 667-673.
160. Marin V, Montero-Julian FA, Gres S, Boulay V, et al. (2001b.) The IL-6-soluble IL-6Ralpha autocrine loop of endothelial activation as an intermediate between acute and chronic inflammation: an experimental model involving thrombin. *J Immunol.* 167: 3435-3442.
161. Martini HF and Hall P (1995). *Fundamentals of Anatomy & Physiology.* New Jersey, Pearson Range Extension.
162. Martorell L, Martinez-Gonzalez J, Rodriguez C, Gentile M, et al. (2008.) Thrombin and protease-activated receptors (PARs) in atherothrombosis. *Thromb Haemost.* 99: 305-315.
163. Marx SO, Jayaraman T, Go LO and Marks AR. (1995.) Rapamycin-FKBP inhibits cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 76: 412-417.
164. Matsumoto S, Kishida K, Shimomura I, Maeda N, et al. (2002.) Increased plasma HB-EGF associated with obesity and coronary artery disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 292: 781-786.
165. McCarty RE. (1992.) Iron contamination in adenosine triphosphate: a warning. *Anal Biochem.* 205: 371-372.
166. McNamara CA, Sarembock IJ, Bachhuber BG, Stouffer GA, et al. (1996.) Thrombin and vascular smooth muscle cell proliferation: implications for atherosclerosis and restenosis. *Semin Thromb Hemost.* 22: 139-144.
167. McNamara CA, Sarembock IJ, Gimple LW, Fenton JW, 2nd, et al. (1993.) Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor. *J Clin Invest.* 91: 94-98.
168. Mellor H and Parker PJ. (1998.) The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J.* 332 (Pt 2): 281-292.
169. Meloche S and Pouyssegur J. (2007.) The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene.* 26: 3227-3239.
170. Meloche S, Seuwen K, Pages G and Pouyssegur J. (1992.) Biphasic and synergistic activation of p44mapk (ERK1) by growth factors: correlation between late phase activation and mitogenicity. *Mol Endocrinol.* 6: 845-854.
171. Minden A, Lin A, McMahon M, Lange-Carter C, et al. (1994.) Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science.* 266: 1719-1723.

172. Ming XF, Viswambharan H, Barandier C, Ruffieux J, et al. (2002.) 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.* 22: 8467-8477.
173. Miyagawa J, Higashiyama S, Kawata S, Inui Y, et al. (1995.) Localization of heparin-binding EGF-like growth factor in the smooth muscle cells and macrophages of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 95: 404-411.
174. Mnjoyan ZH, Doan D, Brandon JL, Felix K, et al. (2008.) The critical role of the intrinsic VSMC proliferation and death programs in injury-induced neointimal hyperplasia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 294: H2276-2284.
175. Mochizuki S and Okada Y. (2007.) ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer Sci.* 98: 621-628.
176. Molloy CJ, Pawlowski JE, Taylor DS, Turner CE, et al. (1996.) Thrombin receptor activation elicits rapid protein tyrosine phosphorylation and stimulation of the raf-1/MAP kinase pathway preceding delayed mitogenesis in cultured rat aortic smooth muscle cells: evidence for an obligate autocrine mechanism promoting cell proliferation induced by G-protein-coupled receptor agonist. *J Clin Invest.* 97: 1173-1183.
177. Moon S-K, Jung S-Y, Choi Y-H, Lee Y-C, et al. (2004.) PDTC, metal chelating compound, induces G1 phase cell cycle arrest in vascular smooth muscle cells through inducing p21Cip1 expression: Involvement of p38 mitogen activated protein kinase. *Journal of Cellular Physiology.* 198: 310-323.
178. Morla AO and Mogford JE. (2000.) Control of smooth muscle cell proliferation and phenotype by integrin signaling through focal adhesion kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 272: 298-302.
179. Moy AB, Van Engelenhoven J, Bodmer J, Kamath J, et al. (1996.) Histamine and thrombin modulate endothelial focal adhesion through centripetal and centrifugal forces. *J Clin Invest.* 97: 1020-1027.
180. Mukhin YV, Gooz M, Raymond JR and Garnovskaya MN. (2006.) Collagenase-2 and -3 mediate epidermal growth factor receptor transactivation by bradykinin B2 receptor in kidney cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 318: 1033-1043.
181. Mulvany MJ. (1991.) Are vascular abnormalities a primary cause or secondary consequence of hypertension? *Hypertension.* 18: I52-57.
182. Mulvany MJ, Hansen OK and Aalkjaer C. (1978.) Direct evidence that the greater contractility of resistance vessels in spontaneously hypertensive rats is associated with a narrowed lumen, a thickened media, and an increased number of smooth muscle cell layers. *Circ Res.* 43: 854-864.
183. Nakano T, Raines EW, Abraham JA, Klagsbrun M, et al. (1994.) Lysophosphatidylcholine upregulates the level of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor mRNA in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 1069-1073.
184. Nakata A, Miyagawa J, Yamashita S, Nishida M, et al. (1996.) Localization of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in human coronary

- arteries. Possible roles of HB-EGF in the formation of coronary atherosclerosis. *Circulation*. 94: 2778-2786.
185. Nanney LB, Stoscheck CM and King LE. (1988.) Characterization of binding and receptors for epidermal growth factor in smooth muscle. *Cell Tissue Res*. 254: 125-132.
 186. Newby AC. (2005.) Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev*. 85: 1-31.
 187. Newby AC. (2006.) Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc Res*. 69: 614-624.
 188. Newby AC and Zaltsman AB. (1999.) Fibrous cap formation or destruction--the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation. *Cardiovasc Res*. 41: 345-360.
 189. Nishino N and Powers JC. (1978.) Peptide hydroxamic acids as inhibitors of thermolysin. *Biochemistry*. 17: 2846-2850.
 190. Nyalendo C, Michaud M, Beaulieu E, Roghi C, et al. (2007.) Src-dependent phosphorylation of membrane type I matrix metalloproteinase on cytoplasmic tyrosine 573: role in endothelial and tumor cell migration. *J Biol Chem*. 282: 15690-15699.
 191. Ohtsu H, Dempsey PJ and Eguchi S. (2006a.) ADAMs as mediators of EGF receptor transactivation by G protein-coupled receptors. *Am J Physiol Cell Physiol*. 291: C1-10.
 192. Ohtsu H, Dempsey PJ, Frank GD, Brailoiu E, et al. (2006b.) ADAM17 mediates epidermal growth factor receptor transactivation and vascular smooth muscle cell hypertrophy induced by angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 26: e133-137.
 193. Okada A, Mochizuki S, Yatabe T, Kimura T, et al. (2008.) ADAM-12 (meltrin alpha) is involved in chondrocyte proliferation via cleavage of insulin-like growth factor binding protein 5 in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum*. 58: 778-789.
 194. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA and Hynes NE. (2000.) The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*. 19: 3159-3167.
 195. Osherov N and Levitzki A. (1994.) Epidermal-growth-factor-dependent activation of the src-family kinases. *Eur J Biochem*. 225: 1047-1053.
 196. Pauletto P, Sartore S and Pessina AC. (1994.) Smooth-muscle-cell proliferation and differentiation in neointima formation and vascular restenosis. *Clin Sci (Lond)*. 87: 467-479.
 197. Pauly RR, Passaniti A, Bilato C, Monticone R, et al. (1994.) Migration of cultured vascular smooth muscle cells through a basement membrane barrier requires type IV collagenase activity and is inhibited by cellular differentiation. *Circ Res*. 75: 41-54.

198. Poon M, Marx SO, Gallo R, Badimon JJ, et al. (1996.) Rapamycin inhibits vascular smooth muscle cell migration. *J Clin Invest.* 98: 2277-2283.
199. Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, et al. (1999.) EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature.* 402: 884-888.
200. Prescott SM, Zimmerman GA and McIntyre TM. (1984.) 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.* 81: 3534-3538.
201. Pruessmeyer J, Martin C, Hess FM, Schwarz N, et al. (2010.) A disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17) mediates inflammation-induced shedding of syndecan-1 and -4 by lung epithelial cells. *J Biol Chem.* 285: 555-564.
202. Raab G and Klagsbrun M. (1997.) Heparin-binding EGF-like growth factor. *Biochim Biophys Acta.* 1333: F179-199.
203. Reape TJ, Wilson VJ, Kanczler JM, Ward JP, et al. (1997.) Detection and cellular localization of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor mRNA and protein in human atherosclerotic tissue. *J Mol Cell Cardiol.* 29: 1639-1648.
204. Reynolds CM, Eguchi S, Frank GD and Motley ED. (2002.) Signaling mechanisms of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 39: 525-529.
205. Risinger GM, Jr., Hunt TS, Updike DL, Bullen EC, et al. (2006.) Matrix metalloproteinase-2 expression by vascular smooth muscle cells is mediated by both stimulatory and inhibitory signals in response to growth factors. *J Biol Chem.* 281: 25915-25925.
206. Rivard A and Andres V. (2000.) Vascular smooth muscle cell proliferation in the pathogenesis of atherosclerotic cardiovascular diseases. *Histol Histopathol.* 15: 557-571.
207. Roelle S, Grosse R, Aigner A, Krell HW, et al. (2003.) Matrix metalloproteinases 2 and 9 mediate epidermal growth factor receptor transactivation by gonadotropin-releasing hormone. *J Biol Chem.* 278: 47307-47318.
208. Rojas M, Yao S and Lin YZ. (1996.) Controlling epidermal growth factor (EGF)-stimulated Ras activation in intact cells by a cell-permeable peptide mimicking phosphorylated EGF receptor. *J Biol Chem.* 271: 27456-27461.
209. Roque M, Reis ED, Cordon-Cardo C, Taubman MB, et al. (2001.) Effect of p27 deficiency and rapamycin on intimal hyperplasia: in vivo and in vitro studies using a p27 knockout mouse model. *Lab Invest.* 81: 895-903.
210. Ross R. (1971.) The smooth muscle cell. II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J Cell Biol.* 50: 172-186.
211. Ross R. (1993.) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 362: 801-809.

212. Ross R. (1999.) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 340: 115-126.
213. Rosse C, Linch M, Kermorgant S, Cameron AJ, et al. (2010.) PKC and the control of localized signal dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11: 103-112.
214. Sandoval R, Malik AB, Naqvi T, Mehta D, et al. (2001.) Requirement for Ca²⁺ signaling in the mechanism of thrombin-induced increase in endothelial permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 280: L239-247.
215. Schafer B, Marg B, Gschwind A and Ullrich A. (2004.) Distinct ADAM metalloproteinases regulate G protein-coupled receptor-induced cell proliferation and survival. *J Biol Chem.* 279: 47929-47938.
216. Schini-Kerth VB, Bassus S, Fisslthaler B, Kirchmaier CM, et al. (1997.) 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 factorAB. *Circulation.* 96: 3888-3896.
217. Schini VB, Hendrickson H, Heublein DM, Burnett JC, Jr., et al. (1989.) Thrombin enhances the release of endothelin from cultured porcine aortic endothelial cells. *Eur J Pharmacol.* 165: 333-334.
218. Schlessinger J, Plotnikov AN, Ibrahim OA, Eliseenkova AV, et al. (2000.) Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol Cell.* 6: 743-750.
219. Schreier B, Döhler M, Rabe S, Schneider B, et al. (2011.) Consequences of Epidermal Growth Factor Receptor (ErbB1) Loss for Vascular Smooth Muscle Cells From Mice With Targeted Deletion of ErbB1. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 31: 1643-1652.
220. Seals DF and Courtneidge SA. (2003.) The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.* 17: 7-30.
221. Seger R and Krebs EG. (1995.) The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 9: 726-735.
222. Selvais C, Gaide Chevronnay HP, Lemoine P, Dedieu S, et al. (2009.) Metalloproteinase-dependent shedding of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 ectodomain decreases endocytic clearance of endometrial matrix metalloproteinase-2 and -9 at menstruation. *Endocrinology.* 150: 3792-3799.
223. Shah BH, Yesilkaya A, Olivares-Reyes JA, Chen H-D, et al. (2004.) Differential Pathways of Angiotensin II-Induced Extracellularly Regulated Kinase 1/2 Phosphorylation in Specific Cell Types: Role of Heparin-Binding Epidermal Growth Factor. *Molecular Endocrinology.* 18: 2035-2048.
224. Shah PK and Galis ZS. (2001.) Matrix metalloproteinase hypothesis of plaque rupture: players keep piling up but questions remain. *Circulation.* 104: 1878-1880.
225. Shankar R, de la Motte CA, Poptic EJ and DiCorleto PE. (1994.) 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.* 269: 13936-13941.
226. Sherr CJ. (1995.) Mammalian G1 cyclins and cell cycle progression. *Proc Assoc Am Physicians.* 107: 181-186.
227. Smaill JB, Rewcastle GW, Loo JA, Greis KD, et al. (2000a.) Tyrosine kinase inhibitors. 17. Irreversible inhibitors of the epidermal growth factor receptor: 4-(Phenylamino)quinazoline- and 4-(Phenylamino)pyrido. *J Med Chem.* 43: 3199.
228. Smaill JB, Rewcastle GW, Loo JA, Greis KD, et al. (2000b.) Tyrosine kinase inhibitors. 17. Irreversible inhibitors of the epidermal growth factor receptor: 4-(phenylamino)quinazoline- and 4-(phenylamino)pyrido[3,2-d]pyrimidine-6-acrylamides bearing additional solubilizing functions. *J Med Chem.* 43: 1380-1397.
229. Smiljanic K, Dobutovic B, Obradovic M, Nikolic D, et al. (2011.) Involvement of the ADAM 12 in thrombin-induced rat's VSMCs proliferation. *Curr Med Chem.* 18: 3382-3386.
230. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, et al. (1985.) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150: 76-85.
231. Smith RC, Branellec D, Gorski DH, Guo K, et al. (1997.) p21CIP1-mediated inhibition of cell proliferation by overexpression of the gax homeodomain gene. *Genes Dev.* 11: 1674-1689.
232. Solorzano CC, Ksontini R, Pruitt JH, Auffenberg T, et al. (1997.) A matrix metalloproteinase inhibitor prevents processing of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and abrogates endotoxin-induced lethality. *Shock.* 7: 427-431.
233. Song KS, Kim JS, Yun EJ, Kim YR, et al. (2008.) Rottlerin induces autophagy and apoptotic cell death through a PKC-delta-independent pathway in HT1080 human fibrosarcoma cells: the protective role of autophagy in apoptosis. *Autophagy.* 4: 650-658.
234. Southgate KM, Davies M, Booth RF and Newby AC. (1992.) Involvement of extracellular-matrix-degrading metalloproteinases in rabbit aortic smooth-muscle cell proliferation. *Biochem J.* 288 (Pt 1): 93-99.
235. Southgate KM, Fisher M, Banning AP, Thurston VJ, et al. (1996.) Upregulation of basement membrane-degrading metalloproteinase secretion after balloon injury of pig carotid arteries. *Circ Res.* 79: 1177-1187.
236. Sporn LA, Marder VJ and Wagner DD. (1989.) Differing polarity of the constitutive and regulated secretory pathways for von Willebrand factor in endothelial cells. *J Cell Biol.* 108: 1283-1289.
237. Standley PR, Zhang F, Ram JL, Zemel MB, et al. (1991.) Insulin attenuates vasopressin-induced calcium transients and a voltage-dependent calcium response in rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 88: 1230-1236.
238. Stepien O, Gogusev J, Zhu DL, Iouzalén L, et al. (1998.) Amlodipine inhibition of serum-, thrombin-, or fibroblast growth factor-induced vascular smooth-muscle cell proliferation. *J Cardiovasc Pharmacol.* 31: 786-793.

239. Stix B, Kahne T, Sletten K, Raynes J, et al. (2001.) Proteolysis of AA amyloid fibril proteins by matrix metalloproteinases-1, -2, and -3. *Am J Pathol.* 159: 561-570.
240. Stocker W, Grams F, Baumann U, Reinemer P, et al. (1995.) The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci.* 4: 823-840.
241. Subramanian SV, Fitzgerald ML and Bernfield M. (1997.) Regulated shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains by thrombin and growth factor receptor activation. *J Biol Chem.* 272: 14713-14720.
242. Sun J, Marx SO, Chen HJ, Poon M, et al. (2001.) Role for p27(Kip1) in Vascular Smooth Muscle Cell Migration. *Circulation.* 103: 2967-2972.
243. Sundberg C, Thodeti CK, Kveiborg M, Larsson C, et al. (2004.) Regulation of ADAM12 cell-surface expression by protein kinase C epsilon. *J Biol Chem.* 279: 51601-51611.
244. Suzuki A, Kadota N, Hara T, Nakagami Y, et al. (2000.) Meltrin alpha cytoplasmic domain interacts with SH3 domains of Src and Grb2 and is phosphorylated by v-Src. *Oncogene.* 19: 5842-5850.
245. Šerban NM (1995). Pokretne i nepokretne ćelije. Beograd, Savremena Administacija.
246. Takaguri A, Kimura K, Hinoki A, Bourne AM, et al. (2011a.) A disintegrin and metalloprotease 17 mediates neointimal hyperplasia in vasculature. *Hypertension.* 57: 841-845.
247. Takaguri A, Kimura K, Hinoki A, Bourne AM, et al. (2011b.) A Disintegrin and Metalloprotease 17 Mediates Neointimal Hyperplasia in Vasculature. *Hypertension.* 57: 841-845.
248. Tamura R, Miyagawa J, Nishida M, Kihara S, et al. (2001.) Immunohistochemical localization of Betacellulin, a member of epidermal growth factor family, in atherosclerotic plaques of human aorta. *Atherosclerosis.* 155: 413-423.
249. Tan M, Xu X, Ohba M, Ogawa W, et al. (2003.) Thrombin rapidly induces protein kinase D phosphorylation, and protein kinase C delta mediates the activation. *J Biol Chem.* 278: 2824-2828.
250. Taniguchi CM, Emanuelli B and Kahn CR. (2006.) Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7: 85-96.
251. Thyberg J. (1998.) Phenotypic modulation of smooth muscle cells during formation of neointimal thickenings following vascular injury. *Histol Histopathol.* 13: 871-891.
252. Tohgo A, Choy EW, Gesty-Palmer D, Pierce KL, et al. (2003.) The stability of the G protein-coupled receptor-beta-arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation. *J Biol Chem.* 278: 6258-6267.

253. Tohgo A, Pierce KL, Choy EW, Lefkowitz RJ, et al. (2002.) beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. *J Biol Chem.* 277: 9429-9436.
254. Tokumaru S, Higashiyama S, Endo T, Nakagawa T, et al. (2000.) Ectodomain shedding of epidermal growth factor receptor ligands is required for keratinocyte migration in cutaneous wound healing. *J Cell Biol.* 151: 209-220.
255. Tokunou T, Ichiki T, Takeda K, Funakoshi Y, et al. (2001.) Thrombin induces interleukin-6 expression through the cAMP response element in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21: 1759-1763.
256. Tomita M, Hirata Y, Uchihashi M and Fujita T. (1986.) Characterization of epidermal growth factor receptors in cultured vascular smooth muscle cells of rat aorta. *Endocrinol Jpn.* 33: 177-184.
257. Uglow EB, Slater S, Sala-Newby GB, Aguilera-Garcia CM, et al. (2003.) Dismantling of cadherin-mediated cell-cell contacts modulates smooth muscle cell proliferation. *Circ Res.* 92: 1314-1321.
258. Uhm JH, Dooley NP, Villemure JG and Yong VW. (1996.) Glioma invasion in vitro: regulation by matrix metalloproteinase-2 and protein kinase C. *Clin Exp Metastasis.* 14: 421-433.
259. Uzui H, Lee JD, Shimizu H, Tsutani H, et al. (2000.) The role of protein-tyrosine phosphorylation and gelatinase production in the migration and proliferation of smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 149: 51-59.
260. van Nieuw Amerongen GP, Beckers CM, Achekar ID, Zeeman S, et al. (2007.) Involvement of Rho kinase in endothelial barrier maintenance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27: 2332-2339.
261. van Nieuw Amerongen GP, Musters RJ, Eringa EC, Sipkema P, et al. (2008.) Thrombin-induced endothelial barrier disruption in intact microvessels: role of RhoA/Rho kinase-myosin phosphatase axis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 294: C1234-1241.
262. van Nieuw Amerongen GP, van Delft S, Vermeer MA, Collard JG, et al. (2000.) Activation of RhoA by thrombin in endothelial hyperpermeability: role of Rho kinase and protein tyrosine kinases. *Circ Res.* 87: 335-340.
263. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, et al. (2005.) Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25: 2054-2061.
264. Visse R and Nagase H. (2003.) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 92: 827-839.
265. Wahl MI and Carpenter G. (1987.) Role of growth factors and their receptors in the control of normal cell proliferation and cancer. *Clin Physiol Biochem.* 5: 130-139.

266. Walker HA, Whitelock JM, Garl PJ, Nemenoff RA, et al. (2003.) Perlecan up-regulation of FRNK suppresses smooth muscle cell proliferation via inhibition of FAK signaling. *Mol Biol Cell*. 14: 1941-1952.
267. Walsh K, Perlman HR and Smith RC (1999). 24 - Regulation of Vascular Smooth Muscle Differentiation and Cell Cycle. *Heart Development*. P. H. Richard and R. Nadia. San Diego, Academic Press: 429-443.
268. Walton GM, Chen WS, Rosenfeld MG and Gill GN. (1990.) Analysis of deletions of the carboxyl terminus of the epidermal growth factor receptor reveals self-phosphorylation at tyrosine 992 and enhanced in vivo tyrosine phosphorylation of cell substrates. *J Biol Chem*. 265: 1750-1754.
269. Wang H, Ubl JJ, Stricker R and Reiser G. (2002.) Thrombin (PAR-1)-induced proliferation in astrocytes via MAPK involves multiple signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol*. 283: C1351-1364.
270. Wang X, Chow FL, Oka T, Hao L, et al. (2009a.) Matrix metalloproteinase-7 and ADAM-12 (a disintegrin and metalloproteinase-12) define a signaling axis in agonist-induced hypertension and cardiac hypertrophy. *Circulation*. 119: 2480-2489.
271. Wang Z, Kong L, Kang J, Morgan JH, 3rd, et al. (2009b.) Thrombin stimulates mitogenesis in pig cerebrovascular smooth muscle cells involving activation of pro-matrix metalloproteinase-2. *Neurosci Lett*. 451: 199-203.
272. Watts VL and Motley ED. (2009.) Role of protease-activated receptor-1 in endothelial nitric oxide synthase-Thr495 phosphorylation. *Exp Biol Med (Maywood)*. 234: 132-139.
273. Way KJ, Chou E and King GL. (2000.) Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends Pharmacol Sci*. 21: 181-187.
274. Westrick RJ, Bodary PF, Xu Z, Shen YC, et al. (2001.) Deficiency of tissue factor pathway inhibitor promotes atherosclerosis and thrombosis in mice. *Circulation*. 103: 3044-3046.
275. Wolfsgruber W, Feil S, Brummer S, Kuppinger O, et al. (2003.) A proatherogenic role for cGMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100: 13519-13524.
276. Woodworth CD, Michael E, Marker D, Allen S, et al. (2005.) Inhibition of the epidermal growth factor receptor increases expression of genes that stimulate inflammation, apoptosis, and cell attachment. *Mol Cancer Ther*. 4: 650-658.
277. Wu W, Graves LM, Gill GN, Parsons SJ, et al. (2002.) Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on tyrosine 845 is required for zinc-induced Ras activation. *J Biol Chem*. 277: 24252-24257.
278. www.ChemDrug.com
279. www.millipore.com
280. www.roche-applied-science.com

281. Xu S, Fu J, Chen J, Xiao P, et al. (2009a.) Development of an optimized protocol for primary culture of smooth muscle cells from rat thoracic aortas. *Cytotechnology*. 61: 65-72.
282. Xu Y, Shao Y, Zhou J, Voorhees JJ, et al. (2009b.) Ultraviolet irradiation-induces epidermal growth factor receptor (EGFR) nuclear translocation in human keratinocytes. *J Cell Biochem*. 107: 873-880.
283. Yamaguchi T, Miki Y and Yoshida K. (2007.) Protein kinase C delta activates I κ B-kinase alpha to induce the p53 tumor suppressor in response to oxidative stress. *Cell Signal*. 19: 2088-2097.
284. Yamamoto T, Ebisuya M, Ashida F, Okamoto K, et al. (2006.) Continuous ERK activation downregulates antiproliferative genes throughout G1 phase to allow cell-cycle progression. *Curr Biol*. 16: 1171-1182.
285. Yamori Y, Igawa T, Kanbe T, Kihara M, et al. (1981.) Mechanisms of structural vascular changes in genetic hypertension: analyses on cultured vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci (Lond)*. 61 Suppl 7: 121s-123s.
286. Yang CM, Lin MI, Hsieh HL, Sun CC, et al. (2005.) Bradykinin-induced p42/p44 MAPK phosphorylation and cell proliferation via Src, EGF receptors, and PI3-K/Akt in vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol*. 203: 538-546.
287. Yang L, Lewis CM, Chandrasekharan UM, Kinney CM, et al. (2006.) Arginase activity is increased by thrombin: a mechanism for endothelial dysfunction in arterial thrombosis. *J Am Coll Surg*. 203: 817-826.
288. Yap JL, Worlikar S, MacKerell AD, Jr., Shapiro P, et al. (2011.) Small-molecule inhibitors of the ERK signaling pathway: Towards novel anticancer therapeutics. *ChemMedChem*. 6: 38-48.
289. Yarden Y and Sliwkowski MX. (2001.) Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2: 127-137.
290. Yin X, Polidano E, Faverdin C and Marche P. (2005.) Role of L-type calcium channel blocking in epidermal growth factor receptor-independent activation of extracellular signal regulated kinase 1/2. *J Hypertens*. 23: 337-350.
291. Yoshida K, Tosaka A, Takeuchi S and Kobayashi N. (1994.) Epidermal growth factor receptor content in human renal cell carcinomas. *Cancer*. 73: 1913-1918.
292. Yu G, Rux AH, Ma P, Bdeir K, et al. (2005.) Endothelial expression of E-selectin is induced by the platelet-specific chemokine platelet factor 4 through LRP in an NF- κ B-dependent manner. *Blood*. 105: 3545-3551.
293. Zania P, Papaconstantinou M, Flordellis CS, Maragoudakis ME, et al. (2008.) Thrombin mediates mitogenesis and survival of human endothelial cells through distinct mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol*. 294: C1215-1226.
294. Zempo N, Kenagy RD, Au YP, Bendeck M, et al. (1994.) Matrix metalloproteinases of vascular wall cells are increased in balloon-injured rat carotid artery. *J Vasc Surg*. 20: 209-217.

295. Zempo N, Koyama N, Kenagy RD, Lea HJ, et al. (1996.) Regulation of vascular smooth muscle cell migration and proliferation in vitro and in injured rat arteries by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 16: 28-33.
296. Zeng H, Lozinskaya IM, Lin Z, Willette RN, et al. (2006.) Mallotoxin is a novel human ether-a-go-go-related gene (hERG) potassium channel activator. *J Pharmacol Exp Ther.* 319: 957-962.
297. Zhang D, Anantharam V, Kanthasamy A and Kanthasamy AG. (2007a.) Neuroprotective effect of protein kinase C delta inhibitor rottlerin in cell culture and animal models of Parkinson's disease. *J Pharmacol Exp Ther.* 322: 913-922.
298. Zhang H, Chalothorn D, Jackson LF, Lee DC, et al. (2004.) Transactivation of epidermal growth factor receptor mediates catecholamine-induced growth of vascular smooth muscle. *Circ Res.* 95: 989-997.
299. Zhang W and Colman RW. (2007b.) Thrombin regulates intracellular cyclic AMP concentration in human platelets through phosphorylation/activation of phosphodiesterase 3A. *Blood.* 110: 1475-1482.
300. Zhang YZ, Gao PJ, Wang XY, Stepien O, et al. (2000.) The inhibitory mechanisms of amlodipine in human vascular smooth muscle cell proliferation. *Hypertens Res.* 23: 403-406.
301. Zwick E, Daub H, Aoki N, Yamaguchi-Aoki Y, et al. (1997.) Critical role of calcium- dependent epidermal growth factor receptor transactivation in PC12 cell membrane depolarization and bradykinin signaling. *J Biol Chem.* 272: 24767-24770.
302. Zwick E, Hackel PO, Prenzel N and Ullrich A. (1999.) The EGF receptor as central transducer of heterologous signalling systems. *Trends Pharmacol Sci.* 20: 408-412.

BIOGRAFIJA

Katarina Smiljanić, rođena Bajić (07.01.1971. godine u Beogradu), završila je studije biohemije na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, 1994. godine, kao student generacije 1990., i četvrti nosilac diplome „Dorote Stefanovi“. Diplomski rad odbranila je 7.10.1994. godine, sa ocenom 10.

Iste godine upisala je poslediplomske studije na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, smer: Biohemija. Magistrirala je 17.12.1999. godine na Katedri za Biohemiju Hemijskog Fakulteta Univerziteta u Beogradu sa ocenom 10 i prosečnom ocenom ispita 10,0 na magistarskim studijama, odbranivši tezu pod naslovom: „Noradrenergi na transmisija u kičmenoj moždini pacova: efekti kortizola i streptozotocina.“ Eksperimentalni deo teze urađen je u potpunosti na Katedri za Farmakologiju i Toksikologiju Medicinskog fakulteta u Kuvajtu iz čega je proistekla publikacija u tada vrhunskom međunarodnom časopisu *Brain Research*.

Doktorska disertacija pod naslovom “Uticaj trombina na regulaciju proliferacije glatkih mišićnih ćelija aorte pacova” prihvaćena je na Univerzitetu u Beogradu 24.11.2011. godine. Iz disertacije su do sada proistekli radovi u vrhunskom međunarodnom časopisu *Current Medical Chemistry* i nacionalnom “Medicinska Istraživanja”.

Od 1.10.2008. volontira kao istraživač u Laboratoriji za Radiobiologiju i molekularnu genetiku instituta za nuklearne nauke „Vinča“. Paralelno je zvanično bila zaposlena u GlaxoSmithKline Export Ltd. predstavništvu u Srbiji kao rukovodilac odeljenja za vakcine od 2004. do 2010. Dvogodišnji porodiljski period na ime trećeg deteta posvetila je volonterskom, naučno-istraživačkom radu u grupi dr Esme Isenović, NSV.

2011. godine održala je predavanje po pozivu na skupu internacionalnog značaja na kome je učestvovalo i pet dobitnika Nobelove nagrade: „3rd International Conference on Drug Discovery & Therapy“ (Feb 7-10th, 2011, Dubai), pod nazivom: „Involvement of MMP-2 and ADAM-12 in Thrombin-Induced Rat VSMCs Proliferation.”

Glavna oblast naučno-istraživačkog rada u kojoj je trenutno angažovana je molekularna endokrinologija.

Samohrana je majka troje dece.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Катарина Т. Смиљанић, (рођ. Бајић)

број индекса н/а

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Утицај тромбина на регулацију пролиферације глатких

мишићних ћелија аорте пацова“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 25.05.2012.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Катарина Т. Смиљанић, (рођ. Бајић)

Број индекса: н/а

Студијски програм: Биологија; Молекуларна ендокринологија

Наслов рада: „Утицај тромбина на регулацију пролиферације глатких
мишићних ћелија аорте пацова“

Ментори: Др. Есма Исеновић, научни саветник Института „Винча“, Универзитет
у Београду;

Др Јелена Ђорђевић, ванредни професор Биолошког факултета,
Универзитета у Београду

Потписани/а Катарина Т. Смиљанић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 25.05.2012.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Утицај тромбина на регулацију пролиферације глатких мишићних ћелија аорте пацова“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 25.05.2012.

Потпис докторанда

