

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДІНА

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

Жерносеков Дмитро Данилович

Гриф \_\_\_\_\_

Прим № \_\_\_\_\_

УДК 616.155.2+576.522+616.155.2

ДИСЕРТАЦІЯ

ПОЛІФУНКЦІОНАЛЬНА РОЛЬ АДГЕЗИВНИХ ПРОТЕЇНІВ У  
МІЖКЛІТИННИХ КОНТАКТАХ ТКАНИН ССАВЦІВ В ОНТОГЕНЕЗІ ТА  
ЗА ПАТОЛОГІЧНИХ СТАНІВ

03.00.04 – біохімія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Д.Д. Жерносеков

Науковий консультант Гриненко Тетяна Вікторівна, доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН  
України

Київ – 2019

## АНОТАЦІЯ

**Жерносеков Д.Д. Поліфункціональна роль адгезивних протеїнів у формуванні міжклітинних контактів тканин ссавців в онтогенезі та за патологічних станів. – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 «Біохімія». – Інститут біохімії НАН України, Київ, 2019.

Робота присвячена визначенню ролі адгезивних протеїнів за умов нормального розвитку та при функціональних порушеннях в організмі ссавців.

Досліджено експресію нейронального протеїну клітинної адгезії N-CAM1 під час розвитку та старіння тканин. Визначено мРНК, що відповідають за синтез ізоформ протеїну N-CAM1 у скелетних та серцевих м'язах. Показано, що під час постнатального розвитку скелетних та серцевих м'язів експресія мРНК, що кодують протеїн N-CAM1 знижується, а під час старіння – підвищується.

Досліджено експресію додаткових екзонів в мРНК протеїну N-CAM1 у скелетних та серцевих м'язах під час постнатального розвитку. Встановлено, що експресія цих екзонів пов'язана головним чином з мРНК розміром 5,2 та 2,9 кб. Показано, що додатковий екзон VASE, для якого характерна експресія в мРНК протеїну N-CAM1 серцевих м'язів, в скелетних м'язах практично не визначався. Зроблено висновок про тканиноспецифічну експресію сплайс варіантів мРНК протеїну N-CAM1 з екзоном VASE. Досліджено поліпептидний склад ізоформ протеїну N-CAM1 у серцевих та скелетних м'язах щурів. Показано, що кількість адгезивного протеїну N-CAM1 в серцевих та скелетних м'язах змінюється відповідно до віку тварини: знижується під час постнатального розвитку та підвищується під час старіння, що свідчить про залучення цього протеїну до компенсаторних механізмів, які мають місце у м'язах під час старіння ссавців.

Досліджена можливість появи аутоантитіл до адгезивного протеїну N-CAM1 в сироватці крові хворих з гострою формою шизофренії. За умов такого патологічного стану визначена наявність аутоантитіл до мембранних ізоформ протеїну N-CAM1.

Досліджено експресію N-кадгеринового поліпептиду (CDH2) в тканинах щура. На відміну від N-CAM1 не виявлено суттєвих змін в експресії мРНК кадгеринового протеїну під час постнатального розвитку скелетних та серцевих м'язів щура.

Показана специфічна експресія мРНК кадгеринових протеїнів в тканинах різного генезу (головний мозок, печінка, нирки, легені, серцеві та скелетні м'язи). Високий рівень експресії мРНК CDH2 показано для усіх досліджуваних тканин, в той час як експресія мРНК CDH1 обмежується тканинами печінки, нирок та легенів, а експресія мРНК CDH3 характерна головним чином для тканин нирок та легенів ссавців.

Досліджено вплив іонів кальцію на протеолітичну деградацію CDH2. За наявності в середовищі мілімолярних концентрацій іонів кальцію відбувається деградація цитоплазматичного домену CDH2, в той час як за умов відсутності кальцію має місце деградація екстрацелюлярного домену.

Використання моделі вироблення умовного рефлексу пасивного уникнення не показало критичної ролі N-кадгерину в процесі навчання. Виявлено, що блокування кадгеринових протеїнів за допомогою антитіл в структурах гіпокампу та кори головного мозку не є критичним для формування навичу у дослідних тварин.

Показано, що компоненти плазміноген/плазмінової системи створюють модулюючий вплив на адгезивні взаємодії між тромбоцитами. Lys-плазміноген, на відміну від Glu-форми, створює інгібувальний вплив на агрегацію тромбоцитів, індуковану ADP, тромбіном та колагеном. Показано, що інгібувальний ефект Lys-форми зимогену опосередкований лізин зв'язуючими сайтами його кринглових структур. Не виявлено інгібувального

впливу Lys-плазміногену на адгезивні контакти, що забезпечуються глікопротеїном GP Іb-IX-V та фактором фон Віллебранду.

Встановлено, що Lys-плазміноген перешкоджає перебудові актинового цитоскелету тромбоцитів, стимульованих тромбіном та колагеном, що може бути одним із механізмів антиагрегаційної та антисекреторної дії Lys-плазміногену, оскільки встановлено, що попередня інкубація клітин з Lys-плазміногеном та наступною активацією тромбіном призводить до зниження кількості Р-селективних тромбоцитів.

Доведено модулюючий вплив Lys-плазміногену на експонування адгезивного протеїну вітронектину на поверхні активованих тромбоцитів. Запропоновано механізм бівалентного зв'язку Lys-плазміногену з поверхневим рецептором та вітронектином, який вивільнився з альфа-гранул внаслідок тромбоцитарної активації.

Таким чином, доведено, що в організмі ссавців функціональні зміни в тканинах на певних етапах розвитку пов'язані зі змінами в експресії специфічних адгезивних протеїнів. Адгезивні взаємодії між тромбоцитами, які забезпечують функціональне призначення цих клітин, регулюються елементами плазміноген/плазмінової системи.

**Ключові слова:** протеїни клітинної адгезії, міжклітинні контакти, плазміноген/плазмінова система.

## SUMMARY

**Zhernossekov D.D. Polyfunctional role of adhesive proteins in the formation of intercellular contacts in mammalian tissues in ontogenesis and under pathological states.** – Manuscript.

Thesis for a scientific degree of a doctor of biological sciences by speciality 03.00.04 «Biochemistry». – Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine. Kyiv, 2019.

The thesis describes the peculiarities of expression of adhesive proteins in mammalian tissues under physiological state and pathology.

It was investigated the expression of cell adhesion protein N-CAM1 at the developing and aging tissues. It was determined the expression of minor exons of N-CAM1 in skeletal and heart muscles in rats at the different steps of the postnatal age. mRNAs that are responsible for synthesis of N-CAM1 isoforms in skeletal and heart muscles were determined. It was found that m-RNA expression of N-CAM1 was decreased during postnatal development, but increased at the aging tissues. The expression of splice variant of mRNA with minor exons was investigated in rat skeletal and heart tissue at postnatal development and aging. It was found that this expression was related with mRNA of 5.2 and 2.9 kb. It was shown that VASE exon, which was expressed in mRNA N-CAM1 in heart, was practically absent in skeletal muscle. It was made the conclusion about tissue specific expression of this minor exon. The expression of N-CAM1 isoforms in skeletal and heart muscles was determined at all ages. There was no correlation between the m-RNA expression and the proportion of polypeptide isoforms of N-CAM1 in skeletal and heart tissue.

Quantification of N-CAM1 protein, which was determined by enzyme-linked immunosorbent assay, showed that the amount of this protein was changed according to the animal's age: there was a down regulation during postnatal development but the increase during aging in skeletal and heart muscles. It was

concluded that N-CAM1 was involved in the compensatory mechanisms that took place in muscles during the aging of mammals.

The presence of autoantibodies to membrane isoforms of N-CAM1 with 140 and 180 kDa in serum of patients with the acute form of schizophrenia was shown. The obtained data confirmed the fact that the appearance of these autoantibodies in serum can be considered as a marker of this pathology.

The expression of N-cadherin (CDH2) in rat tissues was investigated. Unlike N-CAM1 expression, there were no significant changes in N-cadherin mRNA expression at all ages of skeletal and heart rat tissues.

The specific expression of mRNA of cadherin proteins was shown in tissues of different genesis (brain, liver, kidneys, lungs, skeletal and heart muscles). The high level of expression of mRNA CDH2 was noticed for all investigated tissues meanwhile the expression of mRNA CDH1 was limited by liver, kidneys and lungs; the expression of mRNA CDH3 was basically shown in mammalian kidneys and lungs.

The effect of calcium ions on the stability of CDH2 was investigated. In the presence of calcium ions proteolytic degradation of cytoplasmic domain took place, while in the absence of calcium proteolytic degradation of extracellular domain of CDH2 was observed.

The crucial role of N-cadherin in memory formation was not shown on the model of passive avoidance in rats. The blocking of cadherin proteins with specific antibodies in brain and hippocampus structures did not lead to disruption of memory formation in animals.

It was shown that components of plasminogen/plasmin system made a modulating effect on adhesive interaction between platelets. Lys-plasminogen unlike Glu-form showed an inhibitory effect on platelet aggregation induced by ADP, thrombin and collagen. It was determined that inhibitory effect of Lys-plasminogen was mediated by LBS of its kringle structures. Lys-plasminogen had no inhibitory effect on the adhesive contacts which were mediated by GP Ib-IX-V and von Willebrand factor.

It was shown that Lys-plasminogen caused the negative influence on actin rearrangement in platelets stimulated by thrombin or collagen. It could be one of the possible mechanisms of antiadhesive and antiselectin action of Lys-plasminogen because, as it was shown, the preliminary incubation of platelets with Lys-plasminogen followed by thrombin stimulation led to the decrease of P-selectin-positive platelets in preparations.

Lys-plasminogen had a modulating effect on vitronectin exposure on the surface of activated platelets. We proposed the mechanism of bivalent interaction of Lys-plasminogen with a surface platelet receptor and vitronectin that was released from alpha-granules due to platelet activation.

So, it was proved that functional changes in tissues of mammalian organisms are related with the changes of the expression of specific adhesive proteins. Adhesive interactions between platelets, which provide the functional destination of these cells, are modulated by the components of plasminogen/plasmin system.

**Key words:** cell adhesion proteins, cell-cell contacts, plasminogen/plasmin system.

### Список публікацій здобувача

1. Gaardsvoll H., Krog L., Zhernossekov D., Andersson A-M., Edvardsen K., Olsen M., Bock E., Linnemann D. Age-related changes in expression of neural cell adhesion molecule (NCAM) in heart: a comparative study of newborn, adult and aged rats. Eur J Cell Biol. 1993. 61(1):100 – 107. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
2. Andersson A-M, Olsen M., Zhernossekov D., Gaardsvoll H., Krog L., Linnemann D., Bock E. Biochem.J. Age-related changes in expression of neural cell adhesion molecule in skeletal muscle: a comparative study of newborn, adult and aged rats. 1993. 290(Pt 3):641 – 648. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
3. Linnemann D., Gaardsvoll H., Dalseg A-M., Zhernossekov D., Lundgren T., Edvardsen K., Bock E. Characterization of N-cadherin messenger RNA and polypeptide expression in rat. Int J Devl Neuroscience. 1994.15(5):441 – 450. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
4. Жерносеков Д. Д., Гайдар Ю.А., Тихамиров А. Е., Колесниченко В. С., Чёрная В. И. Иммуногистохимическое изучение N-кадгерина в ткани развивающейся поджелудочной железы. Современные тенденции в развитии медицины и здравоохранения. Днепропетровский государственный университет. Днепропетровск. 1995 С. 67-68. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*



*результатів, підготовка матеріалів до друку).*

5. Жерносеков Д.Д. Недзвецький В.С. Взаємодія білків адгезії зі структурними складовими цитоскелета тваринних клітин. *Український біохімічний журнал*. 1998. 70(1):3-15. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*
6. Жерносеков Д.Д. Білки клітинної адгезії нервової тканини під час нормального розвитку та при патології. Монографія, вид-во Дніпропетровського національного університету. 1998. 80 С. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*
7. Жерносеков Д.Д. / Структурно-функциональные особенности нейроспецифических адгезивных белков иммуноглобулинового семейства. / Д.Д. Жерносеков, // Биополимеры и клетка— 1999. — Т. 15, № 62 — С.143 — 147. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*
8. Спіріна І. Д. Наявність аутоантіл до нейроспецифічних білків у сироватці хворих з різними формами шизофренії / І. Д. Спіріна, Я. Є. Фенева, Ю. М. Бреславська, Д.Д. Жерносеков, В. С. Недзвецький // Медичні перспективи — 1999. — Т. 4, № 2. — С. 46-47. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
9. Недзвецький В.С. Ідентифікація аутоантитіл, які реагують з цитоскелетними і мембранними білками при нервово-психічних розладах / В.С. Недзвецький., Д.Д. Жерносеков., С.В. Кириченко., І.Д. Спіріна., Я.Є. Фенева // Вісник ДНУ ім. О.Гончара — 2000. — Біологія. Випуск 7. — С. 246-250. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
10. Жерносеков Д.Д. Нейроспецифічні білки та пам'ять. / Д.Д. Жерносеков // //Нейрофізіологія— 2000. — Т. 32, № 5. — С.397 — 401. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних,*

*підготовка матеріалів до друку).*

11. Жерносеков Д.Д. Роль белков клеточной адгезии N-CAM и N-кадгерина при выработке реакции избегания у крыс. / Д.Д. Жерносеков, П.А. Неруш // Нейрофизиология– 2000. – Т. 32, №6. – С. 421 – 423. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
12. Жерносеков Д.Д. Экспрессия нейроспецифических белков клеточной адгезии при опухолевом росте. / Д.Д. Жерносеков. // Біологічний вісник ХНУ ім. В.Н. Каразіна. – 2001. – Физиология и биохимия животных – Т.5 № 1-2 – С. 92-94. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*
13. Жерносеков Д. Д. Действие стрессовых факторов на процесс обучения животных / Жерносеков Д. Д. // Вісник Луганського національного педагогічного університету. – 2002. – Т. 51, № 7. – С. 58–62. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*
14. Жерносеков Д. Д. Экспрессия нейронального белка клеточной адгезии N-CAM при старении / Жерносеков Д. Д. // Збірник наукових праць Луганського національного аграрного університету. – 2003. – Т. 37, № 25. – С. 72–73. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*
15. Сопин Е. О. Влияние тяжелых металлов на функцию белков клеточной адгезии в тканях млекопитающих / Е. О. Сопин, Жерносеков Д. Д. // Вісник Луганського національного педагогічного університету. – 2005. – Т. 86, № 6. – С. 143–149. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*
16. Жерносеков Д.Д. Адгезивные белки в процессе воспаления. / Д.Д. Жерносеков. // Біополімери і клітина – 2007. – Т. 23, № 6. – Р. 483–488. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних,*

*підготовка матеріалів до друку).*

17. Жерносеков Д.Д. Роль адгезивних білків у процесі нормального і патологічного тромбоутворення / Д.Д. Жерносеков // Лабораторна діагностика. – 2007. – Т. 2, № 40. – С. 72–75. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*
18. Жерносеков Д. Д. Протеїн С: механізми функціонування та методи одержання / Жерносеков Д. Д., Т. В. Куркіна // Біотехнологія. – 2008. – Т. 1, № 4. – С. 9-17. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*
19. Жерносеков Д.Д. Структурно-функциональные особенности ингибитора активатора плазминогена ПАИ-1 / Д.Д. Жерносеков., Э.Н. Золотарева., А.С. Кондратюк. // Biopolimers and Cell. – 2010. – Vol. 26, № 5. – Р. 255–264. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*
20. Рока-Мойя Я. Вплив екзогенного Ліз-плазміногену на АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів / Я. Рока-Мойя, Д. Жерносеков, Е. Золотарьова, Т. Гриненко // Вісник КНУ ім. Т. Шевченка. – 2011. – Біологія. № 58. – С. 34–46. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
21. Жерносеков Д.Д. Структурно-функциональная характеристика витронектина и его роль в системе гемостаза/ Д.Д. Жерносеков., Э.Н. Золотарева. // Biopolimers and Cell. – 2011. – Vol. 27, № 4. – Р. 258–263. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*
22. Рока-Мойя Я. М. Вплив плазміногену/плазміну на агрегаційну здатність тромбоцитів / Я. М. Рока-Мойя, Д. Д. Жерносеков, Т. В. Гриненко // Biopolimers and Cell. – 2012. – Vol. 28, № 5. – Р. 352–356. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

23. Жерносеков Д.Д. Роль плазминоген/плазмина в функціонуванні кліток крові / Д.Д. Жерносеков., Е.І. Юсова., Т.В. Гриненко // Український біохімічний журнал. – 2012. – Т. 84, № 4. – С. 5-19. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*
24. Рока-Мойя Я. М. Розробка та оптимізація методів визначення активності інгібітора активатора плазміногену 1-го типу в плазмі крові / Я. М. Рока-Мойя, Д. Д. Жерносеков, А. С. Кондратюк, Т. В. Гриненко // Український біохімічний журнал. – 2013. – Т. 85, № 4. – С. 111–118. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
25. Тихомиров А. О. Вплив Lys-форми плазміногену на реконструкцію актинового цитоскелету тромбоцитів / А. О. Тихомиров, Д. Д. Жерносеков, Я. М. Рока-Мойя, С. І. Діордієва, Т. В. Гриненко // Фізіол. журн. – 2014. – Т. 60, № 1. – С. 25–33. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
26. Roka-Moya Y. M. The study of the sites of plasminogen molecule which are responsible for inhibitory effect of Lys-plasminogen on platelet aggregation / Y. M. Roka-Moya, D. D. Zhernossekov, E. I. Yusova, L. G. Kapustianenko, T. V. Grinenko // Ukrainian Biochemical Journal. – 2014. – Vol. 86, N 5. – P. 80–87. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
27. Roka-Moya Y. M. Novel aspects of platelet aggregation / Y. M. Roka-Moya, V. L. Bilous, D. D. Zhernossekov, T. V. Grinenko // Biopolimers and Cell. – 2014. – Vol. 30, N 1. – P. 10–15. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*
28. Zhernossekov D.D. Lys-plasminogen stimulates vitronectin exposure on the platelet surface. / D. D. Zhernossekov., Y. M. Roka-Moya, A.A. Tykhomyrov., T.V. Grinenko //Biopolimers and Cells– 2015. – Vol. 31, N 2. –

- Р. 104-108. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
29. Тихомиров А. О. Вплив Lys-форми плазміногену на секрецію тромбоцитів людини/ А. О. Тихомиров, Д. Д. Жерносеков, Я. М. Рока-Мойя, С. І. Діордієва, Т. В. Гриненко // Український фізіологічний журнал. – 2015. – Т. 61, № 6. – С. 26–34. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
  30. Zhernossekov D.D. Extracellular annexins in hemostasis system. / D. D. Zhernossekov, Y. M. Roka Moiiia, T.V. Grinenko T.V. // Biopolymers and Cell – 2016 – 32, N 2 – P.98-104. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*
  31. Zhernossekov D. D. Glu- and Lys-forms of plasminogen differentially affect phosphatidylserine exposure on the platelet surface / D. D. Zhernossekov, Y. M. Roka-Moiiia, A. O. Tykhomyrov, M. M Guzyk, T. V. Grinenko // Ukr. Biochem. J. – 2017 – 89, special issue – P. 103-111. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
  32. Tykhomyrov A. O. Surface-exposed actin binds plasminogen on the membrane of agonist-activated platelets: a flow cytometry study / A. O. Tykhomyrov, D. D. Zhernossekov, T. V. Grinenko // Biopolymers and Cell – 2017 – 33, N 3 – P. 172-182. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
  33. Tykhomyrov A.A., Zhernosekov D.D., Guzyk M.M., Korsa V.V., Grinenko T.V. Plasminogen modulates formation of reactive oxygen species in human platelets. Ukrainian Biochemical Journal. 2018. 90(6):31–40. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
  34. Чещевик В.Т., Жерносеков Д.Д. Тромбоцитарная агрегация. Механизм участия адгезивных молекул и митохондрий / В.Т. Чещевик,

- Д.Д. Жерносеков // Веснік Палескага дзярж. ун-та. Серыя прыродазнаўчых навук. – 2017. – № 2. – С. 51–61. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*
35. Березин В. А. Экспрессия нейроспецифических белков клеточной адгезии (N-CAM) и промежуточных филаментов (ГФКБ) в перевиваемых крысиных глиомах / В. А. Березин [и др.] // Функции нейроглии. Тбилиси: Мецниереба. – 1993. – С. 259 – 265. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
  36. Zhernossekov D. D. Immunohistochemical study of N-cadherin in developing human pancreas / D. D. Zhernossekov [et al.] // European HPB Surgery. – 1995. – Vol. 9, № 1. – P. 146. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
  37. Chornaya V. Neurospecific proteins in the presence of risk factors at children / V. Chornaya [et al.] // 23<sup>th</sup> Meeting of FEBS. – 1995. – P. 163. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*
  38. Zhernossekov D. D. Etude des proteines neurospecifiques dans les regions du cerveau responsables de formation de la memoire / D. D. Zhernossekov, V. S. Nedzvetsky, A. A. Tikhomiroff // Матеріали IV Міжнародної конференції «Франція та Україна, науково-практичний досвід у контексті діалогу національних культур», Дніпропетровськ. – 1997. – № 2. – С. 126. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
  39. Недзвецький В. С. Нейроспецифічні білки цитоскелета та адгезії нервових клітин при нейроектомії / В. С. Недзвецький, Д. Д. Жерносеков, С. В. Кіріченко // Матеріали VII Українського Біохімічного з'їзду, Київ. – 1997. – С. 156. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення*

*та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

40. Недзвецький В. С. Нейроспецифічні білки проміжних філаментів нейронів та гліальних клітин і молекули адгезії клітин при пошкодженнях нервової тканини / В. С. Недзвецький, Д. Д. Жерносеков, С. В. Кіріченко // Матеріали V Міжнародної конференції «Франція та Україна, науково-практичний досвід у контексті діалогу національних культур», Дніпропетровськ. – 1998. – № 2. – С. 82-83. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
41. Zhernossekov D. D. Role of N-cadherin in animals' learning process / D. D. Zhernossekov, P. A. Nerush, V. U. Gritsan // Архив клинической и экспериментальной медицины. – 2001. – Vol. 10, № 2. – С. 157. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
42. Zhernossekov D. D. The role of neural cell adhesion molecule N-CAM in aging processes / D. D. Zhernossekov, P. A. Nerush, V. U. Gritsan // Материалы V Международного симпозиума “Биологические механизмы старения” Харьков. – 2002. – С. 49. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
43. Котельник О. А. Экспрессия нейроспецифического адгезивного белка N-CAM в структурах мозга крыс при гемолитической анемии / О. А. Котельник [и др.] // Фізіологічний журнал. – 2002. – Т. 48, № 2. – С. 25-26. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
44. Жерносеков Д. Д. Экспрессия кальций-зависимого адгезивного белка N-кадгерина в процессе развития и старения тканей животных / Д. Д. Жерносеков // Материалы VI Международного симпозиума “Биологические механизмы старения” Харьков. – 2004. – С. 21-22. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних,*

*підготовка матеріалів до друку).*

45. Sopin Y. O. Influence of metal ion on the function of cell adhesion molecules in the nervous tissue / Y. O. Sopin, D. D. Zhernossekov // Нейронауки: теоретичні та клінічні аспекти, Донецьк. – 2005. – Vol. 1, № 1. – С. 114. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*
46. Тихомиров А. А. Ангиостатины: генерация и роль в норме и патологиях, ассоциированных со старением / А. А. Тихомиров [и др.] // Ukrainian Biochemical Journal. – 2006. – Vol 78, № 3. – Р. 60-61. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
47. Жерносеков Д. Д. Пошук впливу плазміногену на агрегаційну здатність тромбоцитів / Д. Д. Жерносеков, Е. М. Золотарьова, Я. М. Рока-Мойя // X Український біохімічний з'їзд, Одеса, Україна, 13-17 вересня 2010 р.: Український біохімічний журнал. – 2010. – Т. 82, № 4 (додаток 1). – С. 66. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
48. Рока-Мойя Я. Вплив компонентів плазміноген-плазмінової системи на агрегацію та секрецію тромбоцитів / Я. Рока-Мойя, Д. Жерносеков, Т. Гриненко // Матеріали VIII Міжнародної наукової конференції «Молодь і поступ біології», Львів. – 2012 – С. 71-72. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
49. Roka-Moya Y.M. Inhibitory effect Lys-plasminogen on washed platelet aggregation induced by different agonists / Y. M. Roka-Moya, D. D. Zhernossekov, T. V. Grinenko // Aktualne problemy nowoczesnych nauk, Przemysl, Polska, 07-15 czerwca 2012: Materiały konferencji. – 2012. – Volume 40. Nauk biologicznych. Rolnictwo. Weterynaria. – Przemysl, Nauka i studia. – S. 20–27. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*



50. Рока-Мойя Я.М. Влияние антикоагулянтных препаратов на основе гепарина на агрегацию и секрецию тромбоцитов / Я. М. Рока-Мойя, Д. Д. Жерносеков, В. Н. Рыбачук, Т. В. Гриненко // «Молодые ученые в решении актуальных проблем науки»: IV Научно-практическая конференция, Владикавказ, РФ, 17-18 июня 2013 г.: Материалы конференции, Часть 1. – Владикавказ, 2013. – С. 247–251. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
51. Roka-Moiia Y. M. Plasminogen kringle 5 abolishes the inhibitory effect of Lys-plasminogen on platelet aggregation / Y. M. Roka-Moiia [et al.] // IX Jakub K. Parnas Conference «Proteins from birth to death», Jerusalem. – 2013. – P. 94-95. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
52. Білоус В. Л. Ефекти плазміногену та гепарину на агрегацію та секрецію тромбоцитів людини / В. Л. Білоус, Я. Рока-Мойя, Д. Д. Жерносеков // Матеріали IX Міжнародної наукової конференції «Молодь і поступ біології», Львів. – 2013. – С. 33-34. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
53. Roka-Moiia Y. M. Effect of Lys-plasminogen on platelet functions / Y. M. Roka-Moiia, D. D. Zhernossekov, T. V. Grinenko // FEBS Journal. – 2013. – Vol. 280 – P. 195. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
54. Рока-Мойя Я. М. Про механізм інгібувального ефекту Lys-плазміногену на агрегацію тромбоцитів людини / Я. М. Рока-Мойя, Д. Д. Жерносеков, Т. В. Гриненко // Ukrainian Biochemical Journal. – 2013. – Vol. 85, № 4. – P. 147. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
55. Білоус В. Л. Вплив плазміногену та його фрагментів на агрегаційну здатність тромбоцитів / В. Л. Білоус, Я. М. Рока-Мойя, Д. Д. Жерносеков,

- О. І. Юсова, Л. Г. Капустяненко, Т. В. Гриненко // «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології»: 2-га Міжнародна наукова конференція, м. Дніпропетровськ, Україна, 24-25 вересня 2013: Матеріали конференції. – 2013. – С. 76. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
56. Рока-Мойя Я. М. Роль доменів плазміногену у забезпеченні інгібування Lys-плазміногеном агрегації тромбоцитів / Я. М. Рока-Мойя, В. Л. Білоус, Л. Г. Капустяненко, Д. Д. Жерносеков // XI Український біохімічний з'їзд, Київ, Україна, 6-10 жовтня 2014 р.: Український біохімічний журнал. – 2014. – Т. 86, № 5 (додаток 1). – С. 76. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
57. Roka-Moiia Y. M. Platelets as regulators of plasminogen activation system / Y. M. Roka-Moiia, D. D. Zhernossekov, T. V. Grinenko // 5<sup>th</sup> TriNet Meeting -RECOOP annual project review meeting. – Wroclaw, Poland, October 17-19, – 2014. – P. 46-47. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
58. Гриненко Т. В. Плазміноген/плазмінова система. Нові уявлення про фізіологічну та патофізіологічну роль / Т. В. Гриненко [та ін.] // Матеріали XI Українського біохімічного конгресу Київ. – 2014. – С. 21. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
59. Bilous V.L. Concerning the mechanism of inhibitory effect of Lys-plasminogen on the aggregation of human platelets / V. L. Bilous, Y. M. Roka-Moya, D. D. Zhernossekov // «Adaptation Strategy of the Living Systems»: International Interdisciplinary Conference, Novy Svet, Ukraine, 12-17 May 2014: Abstract Book. - Kyiv: VS Martynyuk Publisher, 2014 . – P. 4-5. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз*

*результатів, підготовка матеріалів до друку).*

60. Рока-Мойя Я. М. Разработка и валидация метода определения активности ингибитора активатора плазминогена 1 типа в плазме крови / Я. М. Рока-Мойя, В. Л. Билоус, Д. Д. Жерносеков, В. Н. Рыбачук, Т. В. Гриненко // «Молодые ученые в решении актуальных проблем науки»: V Научно-практическая конференция, Владикавказ, РФ, 18-21 июня 2014 г.: Материалы конференции. – Владикавказ, 2014. – С. 176–179. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
61. Roka-Moiia Y. M. Mechanism of inhibition of human platelet aggregation by Lys-plasminogen / Y. M. Roka-Moiia, D. D. Zhernossekov // I Congress «BIO 2014», Warsaw, Poland, September 9-12 2014: Acta Biochimica Polonica – 2014. – Vol. 61, Supplement 1. – P. 159. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
62. Жерносеков Д. Д. Регуляция функциональной активности тромбоцитов человека компонентами плазминоген-плазминовой системы / Д. Д. Жерносеков [и др.] // Материалы. Международной научно-практической конференции «Современные проблемы естество-знания в науке и образовательном процессе». Минск. – 2015. – С. 16-17. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
63. Roka-Moiia Y. M. Platelets as regulators of plasminogen activation system / Y. M. Roka-Moiia, D. D. Zhernossekov, T. V. Grinenko // Bridges in Life Sciences 10<sup>th</sup> Annual Scientific Conference. – Wroclaw, Poland, April 16-19. – 2015. – P. 38. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
64. Roka-Moiia Y. Glu- and Lys-forms of plasminogen distinctly affect platelet aggregation, secretion and phosphatidylserine exposure / Y. Roka-Moiia [et al.] // 7<sup>th</sup> TriNet Meeting -RECOOP annual project review meeting. –

- Budapest, Hungary, October 6-9, 2016. – P. 97. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
65. Рока-Мойя Я. М. Плазміноген модулює зв'язування екзогенного анексину V тромбоцитами людини / Я. М. Рока-Мойя [та ін.] // Ukrainian Biochemical Journal. – 2016. – Vol. 88, № 4. – P.114. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
66. Logash M. V., Dzhalilova E. A., Zhernosiekov D. D. Dose-dependence of morphological changes and platelet aggregation after nalbuphine administration on rats. International research and practice conference “Innovative technology in medicine: experience of Poland and Ukraine”, Lublin, Poland, April 28–29, 2017. P. 168. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
67. Zhernossekov D.D., Grinenko T.V. Extracellular annexins in hemostasis system. plasminogen influence on annexin A5 exposure. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Контроль безпечності харчових продуктів. Україна-ЄС: невирішені питання», Київ. 2018. С. 127. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

## ЗМІСТ

|                                                                                                                                                |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ .....</b>                                                                                                         | <b>25</b> |
| <b>ВСТУП .....</b>                                                                                                                             | <b>27</b> |
| <b>РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....</b>                                                                                                        | <b>35</b> |
| 1. Загальний огляд протеїнів клітинної адгезії .....                                                                                           | 35        |
| 1. 1. Структурно-функціональні особливості протеїнів адгезії родини імуноглобулінів .....                                                      | 37        |
| 1. 2. Загальна характеристика протеїнів кадгеринової родини.....                                                                               | 44        |
| 1. 3. Структурно-функціональні особливості селектинів .....                                                                                    | 55        |
| 1. 4. Інтегрини – адгезивні протеїни, що передають міжклітинні сигнали. Тромбоцитарні інтегрини, їх структурно-функціональні особливості ..... | 58        |
| 1. 5. Загальна характеристика лігандів інтегрину $\alpha\text{IIb} \beta 3$ . .....                                                            | 62        |
| 1. 6. Екстрацелюлярні анексини та їх роль у забезпеченні протеїн-клітинних взаємоду .....                                                      | 73        |
| 1. 7. Плазміноген/плазмін та його роль у взаємодіях клітина-клітина та клітина-матрикс.....                                                    | 77        |
| <b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....</b>                                                                                           | <b>86</b> |
| 2. 1. Реактиви та матеріали .....                                                                                                              | 86        |
| 2. 2. Методи досліджень.....                                                                                                                   | 87        |
| 2. 2. 1. Синтез олігонуклеотидних проб для проведення Нозерн-блот аналізу.....                                                                 | 87        |
| 2. 2. 2. Нозерн блот аналіз.....                                                                                                               | 89        |
| 2.2.3. Отримання антитіл до протеїнів клітинної адгезії.....                                                                                   | 92        |
| 2.2.4 Вестерн-блот аналіз .....                                                                                                                | 94        |

|                                                                                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.2.5. Вивчення протеолітичної деградації N-кадгеринового поліпептиду.....                                                                            | 97  |
| 2.2.6 Імуногістохімічне дослідження експресії N-кадгерину під час ембріонального розвитку підшлункової залози людини .....                            | 97  |
| 2.2.7. Обробка препаратів протеїну N-CAM ендосіалідазою N.....                                                                                        | 98  |
| 2.2.8.Визначення кількості протеїну N-CAM методом імуноферментного аналізу .....                                                                      | 99  |
| 2.2.9. Одержання Glu- та Lys-форм плазміногену .....                                                                                                  | 99  |
| 2.2.10. Одержання плазміну.....                                                                                                                       | 102 |
| 2.2.11 Одержання фрагментів плазміногену.....                                                                                                         | 103 |
| 2.2.12 Одержання DD-фрагментів фібрину .....                                                                                                          | 105 |
| 2.2.13. Метод визначення рівня ПАІ-1 з використанням хромогенного субстрату.....                                                                      | 108 |
| 2.2.14 Отримання збагаченої тромбоцитами плазми крові та відмитих тромбоцитів .....                                                                   | 113 |
| 2.2.15. Дослідження впливу компонентів плазміноген/плазмінової системи на агрегацію тромбоцитів методом агрегометрії.....                             | 114 |
| 2.2.16. Дослідження впливу різних форм плазміногену на актиновий цитоскелет тромбоцитів.....                                                          | 115 |
| 2.2.17. Дослідження впливу різних форм плазміногену на експонування вітронектину на поверхні тромбоцитів методом протокової цитофлуориметрії .....    | 117 |
| 2.2.18. Дослідження впливу різних форм плазміногену на експонування Р-селектину на поверхні тромбоцитів методом протокової цитофлуориметрії .....     | 120 |
| 2.2.19. Дослідження впливу різних форм плазміногену на експонування фосфатидилсерину на поверхні тромбоцитів методом протокової цитофлуориметрії..... | 121 |
| 2.2.20. Методи електрофорезу в поліакриламідному гелі.....                                                                                            | 123 |
| 2.2.20.1. Електрофорез в поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію.....                                                            | 123 |

|                                                                            |     |
|----------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.2.20.2. Електрофорез в поліакриламідному гелі за кислих значень рН ..... | 123 |
| 2.2.21. Визначення концентрації протеїнів .....                            | 123 |
| 2.2.22. Математична обробка результатів та статистичний аналіз.....        | 124 |

### **РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ...126**

|                                                                                                                                        |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.1. Нейрональний протеїн клітинної адгезії N-CAM1 в скелетних м'язах під час постнатального розвитку та старіння щурів .....          | 126 |
| 3.2. Нейрональний протеїн клітинної адгезії N-CAM1 в серцевих м'язах під час постнатального розвитку та старіння щурів .....           | 140 |
| 3.3. Визначення аутоантитіл до нейроспецифічного протеїну клітинної адгезії N-CAM1 в сироватці хворих з гострою формою шизофренії..... | 152 |
| 3.4. Нейрональний протеїн кальцій-залежної адгезії N-кадгерин під час постнатального та ембріонального розвитку тканин ссавців .....   | 156 |
| 3.5. Протеолітична деградація N-кадгеринового поліпептиду та її фізіологічна роль .....                                                | 166 |
| 3.6. Роль протеїнів клітинної адгезії імуноглобулінової та кадгеринової родини при виробленні реакції уникання у щурів .....           | 171 |
| 3.7. Модулюючий вплив плазміногену/плазміну на формування адгезивних зв'язків між тромбоцитами під час агрегації .....                 | 175 |
| 3.8. Вплив антикоагулянтних препаратів гепарину на ефекти плазміногену щодо утворення міжтромбоцитарних адгезивних зв'язків .....      | 205 |
| 3.9. Вплив плазміногену на перебудову актинового цитоскелету тромбоцитів за їх активації.....                                          | 214 |
| 3.10. Вплив плазміногену на експонування вітронектину тромбоцитами людини.....                                                         | 219 |
| 3.11. Вплив плазміногену на експонування Р-селектину на поверхні тромбоцитів .....                                                     | 227 |

3.12. Вплив плазміногену на експонування фосфатидилсерину на  
поверхні тромбоцитів..... 237

**РОЗДІЛ 4. ЗАКЛЮЧЕННЯ ..... 251**

**ВИСНОВКИ ..... 265**

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ ..... 267**



## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

|                |                                                                       |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------|
| ССЗ            | серцево-судинні захворювання                                          |
| N-CAM1         | neural cell adhesion molecule, нейрональна молекула клітинної адгезії |
| vWF            | фактор фон Віллебранда                                                |
| ADP            | аденозиндифосфат                                                      |
| GP             | глікопротеїн                                                          |
| PLC            | фосфоліпаза C                                                         |
| PAR            | рецептори, що активуються протеазами                                  |
| G-актин        | глобулярний актин                                                     |
| F-актин        | філаментний актин                                                     |
| MC-актин       | актин мембранного кортексу                                            |
| K1-K5          | кринглові домени плазміногену 1-5                                     |
| LBS            | лізинзв'язувальні сайти                                               |
| PAI-1          | інгібітор активатора плазміногену 1 типу                              |
| tPA            | тканинний активатор плазміногену                                      |
| sc-tPA         | одноланцюгова форма тканинного активатора плазміногену                |
| tc-tPA         | дволанцюгова форма тканинного активатора плазміногену                 |
| uPA            | урокиназа                                                             |
| $\alpha_2$ -AP | $\alpha_2$ -антиплазмін                                               |
| ЕДТО           | етилендіамінотетраоцтова кислота                                      |
| desAB-фібрин   | полімерний фібрин, утворений з молекул фібриногену                    |

|         |                                                                                             |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
|         | з відщепленими фібринопептидами А та В                                                      |
| Т       | світлопропускання (%)                                                                       |
| ЗТП     | збагачена тромбоцитами плазма                                                               |
| БТП     | бідна тромбоцитами плазма                                                                   |
| КВ      | коефіцієнт варіації                                                                         |
| ЕФП     | еуглобулінова фракція плазми                                                                |
| НГ      | нефракціонований гепарин                                                                    |
| НМГ     | низькомолекулярний гепарин                                                                  |
| pNPGV   | <i>p</i> -нітрофенілгуанідинбензоат                                                         |
| S 2251  | хромогенний субстрат плазміну<br>(H-D-Val-L-Leu-L-Lys- <i>p</i> -нітроанілід дигідрохлорид) |
| DS-Na   | додецилсульфат натрію                                                                       |
| ПААГ    | поліакриламідний гель                                                                       |
| 6-АГК   | 6-аміногексанова кислота                                                                    |
| IU, MO  | міжнародні одиниці                                                                          |
| од. NIH | одиниця National Institute of Health (США)                                                  |
| CU      | казеїнолітична одиниця                                                                      |
| OD      | оптична густина                                                                             |

## ВСТУП

**Актуальність проблеми.** Адгезивні міжклітинні взаємодії є необхідною умовою для формування та підтримки структури, а також нормального функціонування тканин. Адгезивні протеїни (АП) виступають в якості сигнальних рецепторів, які зв'язуються з лігандними молекулами на поверхні клітин та забезпечують передачу сигналу до клітини. Нормальне функціонування організму нерозривно пов'язано з експонуванням певних АП на поверхні клітин відповідно до змін, що відбуваються в організмі протягом розвитку або за дії певних чинників. Показана участь АП в процесі формування синапсів, міграції нейронів, формування пам'яті та диференціації тканин [1]. Експресія АП на поверхні клітин змінюється при онкогенезі і може вважатися маркером цього процесу [2, 3, 4].

Разом з тим залишається невизначеною експресія на поверхні м'язових клітин специфічних ізоформ протеїну клітинної адгезії N-CAM1, що утворилися завдяки альтернативного сплайсингу, їх роль в процесі постнатального розвитку та старіння організму. Для нейронального АП кадгеринової родини, на відміну від нейрональних протеїнів імуноглобулінової родини, залишається неясною його роль в процесі формування пам'яті [5]. Хоча відомо, що нервово-психічні захворювання пов'язані з порушенням роботи генів адгезивних нейрональних протеїнів, проте немає вичерпної ясності відносно значущості АП як маркерів психічних розладів [6]. Враховуючи важливу роль компонентів плазміноген-плазмінової системи в розвитку практично всіх патологічних процесів, в генезисі та перебудові тканин, абсолютно не розкрита роль цих компонентів у формуванні адгезивних взаємодій між клітинами крові, зокрема, між тромбоцитами. Разом з тим, дослідження модулюючої ролі плазміногену та його компонентів є виключно важливими, оскільки вони

пов'язані з корекцією патологічного тромбоутворення при серцево-судинних захворюваннях, кількість яких невпинно зростає [7, 8].

Теоретичний аспект проблеми пов'язаний з подальшим з'ясуванням механізмів адгезивної взаємодії в тканинах ссавців та людини. Зокрема, виявлення закономірностей експонування та структурних особливостей АП клітинної поверхні змін дає уявлення про формування адгезивних міжклітинних контактів, які забезпечують функціонування систем організму під час фізіологічних та патологічних змін.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Представлена дисертаційна робота є завершеним дослідженням, що виконане автором відповідно до програми експериментальних досліджень, спланованих, проведених та узагальнених протягом 1991-2006 рр на кафедрі біохімії Дніпровського університета ім. О. Гончара у рамках бюджетних наукових тем: №40-94, № ДР 095U014532 «Дослідження нервово специфічних білків у нормі та за наявності факторів ризику з ціллю розробки методів діагностики патологічних станів дітей» та №02-20-97, № ДР 0197U000653 «Фундаментальні дослідження впливу синергічної дії екопатогених чинників та наукове обґрунтування нових комплексних методів діагностики, корекції та профілактики порушень стану здоров'я населення» Міністерства освіти України. Експериментальна частина роботи в період 2006-2017 рр виконувалася згідно з бюджетною науковою тематикою відділу хімії та біохімії ферментів Інституту біохімії ім.О.В.Палладіна НАН України в рамках бюджетних наукових тем «Структурно-функціональний аналіз білків за норми та деяких патологій» (№ ДР 0107U007187, 2007-2011 рр.), «Молекулярні механізми функціонування ферментів системи гемостазу» (№ДР 0110U002701, 2010-2012 рр.), «Розробка діагностикумів для тестування стану системи руйнування тромбів» (№ ДР 0113U003649, 2013-2015 рр.), «Ангіостатини як ендogenous регулятори функціональної активності клітин» (№ ДР 0112U002624, 2012-2016 рр.), «Механізми регуляції

плазміноген/плазміном міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій в системі гемостазу за норми та патології» (№ ДР 0113U003203, 2013-2017 рр.).

### **Мета і завдання досліджень.**

Мета роботи – розкрити закономірності експресії/експонування адгезивних протеїнів та дослідити роль плазміноген/плазмінової системи у формуванні адгезивних взаємодій між тромбоцитами.

Для реалізації поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

1. В  
вивчити закономірності експресії нейронального протеїну клітинної адгезії N-CAM1 в скелетних та серцевих м'язах в різні періоди постнатального розвитку та при старінні щурів.
2. В  
вивчити тканиноспецифічну експресію матричних РНК та поліпептидних ізоформ протеїнів кадгерінового родини.
3. Виявити роль нейронального протеїну клітинної адгезії кадгерінової родини в процесі навчання при застосуванні експериментальної моделі.
4. Виявити модулюючий вплив компонентів плазміноген-плазмінової системи на формування адгезивних зв'язків між тромбоцитами.

**Об'єкт дослідження:** протеїни клітинної адгезії та їх ліганди.

**Предмет дослідження:** зміни в експресії адгезивних протеїнів, що належать до різних класів адгезивних рецепторів та їх лігандів за нормальних умов та при патології.

**Методи дослідження:** препаративної біохімії, біохімічної мембранології, нозерн-блот та вестерн-блот-аналіз, протокової цитофлуориметрії, фізіологічні (модель умовного рефлексу пасивного уникнення), статистичного аналізу.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше показано, що під час постнатального розвитку скелетних та серцевих м'язів експресія мРНК, що кодують протеїн N-CAM1, знижується, а під час старіння – підвищується.

Аналогічно змінюється і кількість протеїну N-CAM1 в тканинах скелетних та серцевих м'язів. Отримані нові дані щодо експресії сплайс-варіантів мРНК протеїну N-CAM1 з додатковими екзонами (екзону VASE та м'язово-специфічних екзонів) у скелетних та серцевих м'язах щурів. Додатковий екзон VASE, для якого показана експресія в мРНК протеїну N-CAM1 в тканинах головного мозку та серцевих м'язах, у скелетних м'язах практично не визначається. Сплайс-варіанти мРНК протеїну N-CAM1 з додатковими екзонами мають виражену експресію у скелетних та серцевих м'язах, причому експресія цих сплайс-варіантів змінюється відповідно до періоду постнатального розвитку тварин. Таким чином, експресія мРНК протеїну N-CAM1 є відображенням компенсаторних механізмів, що відбуваються у м'язовій тканині під час старіння ссавців.

Вперше показано, що в сироватці крові хворих з гострою формою шизофренії присутні аутоантитіла, що реагують з поліпептидами мембранної та цитоскелетної фракції протеїнів головного мозку людини. Наявність аутоантитіл до мембранних ізоформ протеїну N-CAM1 у сироватці крові свідчить про деструктивні зміни в нервовій тканині під час гострої фази шизофренічної хвороби.

Виявлено специфічну експресію мРНК кадгеринових протеїнів в тканинах різного генезу (головний мозок, печінка, нирки, легені, серцеві та скелетні м'язи). Високий рівень експресії мРНК N-кадгерину (CDH2) показано для усіх досліджуваних тканин, в той час як експресія мРНК CDH1 обмежується тканинами печінки, нирок та легенів, а експресія мРНК CDH3 характерна головним чином для тканин нирок та легенів.

Показано що нейрональний кадгерин та нейрональний протеїн імуноглобулінової родини мають певні особливості експресії в тканинах. Експресія протеїну N-CAM1 змінюється залежно від періоду постнатального

розвитку тварини, в той час як для N-кадгеринового протеїну характерна постійна експресія в тканинах постнатального періоду та при старінні. Разом з тим, як показано на прикладі підшлункової залози, N-кадгерин може виступати як маркерна молекула, що специфічно визначається на певних стадіях ембріонального розвитку цієї тканини.

Досліджено вплив іонів кальцію на протеолітичну деградацію CDH2. За наявності в середовищі мілімолярних концентрацій іонів кальцію відбувається деградація цитоплазматичного домену CDH2, в той час як за умов відсутності кальцію має місце деградація екстрацелюлярного домену.

Введення антитіл до протеїну N-CAM1 в структури гіпокампу та кори головного мозку щурів виявляло повну втрату виробленого навику, в той час як введення антитіл до нейронального кадгерину не впливало на процес навчання.

Вперше показано, що Lys-плазміноген, для якого характерна відкрита конформація, спричиняє інгібувальний вплив на агрегацію тромбоцитів. Цей ефект реалізується завдяки лізин-зв'язуючим сайтам молекули та виявляє специфічність, оскільки не визначається в разі адгезивних контактів, що забезпечуються глікопротеїном GP Ib-IX-V та фактором фон Віллебранда.

Запропоновано механізм, за яким відбувається підвищене експонування адгезивного протеїну вітронектину на тромбоцитарній поверхні за наявності у середовищі інкубації Lys-плазміногену.

Вперше показано, що Lys-плазміноген через взаємодію з рецепторами на поверхні тромбоцитів викликає порушення реконструкції актинових мікрофіламентів і, як наслідок, призводить до зменшення кількості експонованого Р-селектину на поверхні активованих тромбоцитів.

Показано, що Glu-плазміноген підсилює агоніст-індуковане експонування фосфатидилсерину на поверхні активованих тромбоцитів.

### **Практичне значення одержаних результатів.**

Виявлені закономірності експресії нейронального протеїну клітинної адгезії N-CAM1 будуть використані при створенні експериментальних

моделей при вивченні змін, що відбуваються в серцевих та скелетних м'язах при старінні.

Отримані результати можуть бути використані при розробці оптимальних методів фармакологічної корекції патологічного тромбоутворення за серцево-судинних захворювань, кількість яких невинно зростає. Результати і висновки роботи стосовно ролі адгезивних протеїнів в нормі та за патологічних процесів можуть бути використані при викладанні теоретичних курсів «клітинна біологія» та «молекулярна біологія» у вищих навчальних закладах біологічного і медичного профілю.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертаційна робота є завершеним науковим дослідженням в галузі біохімії. Здобувачем самостійно проведено аналіз літературних джерел за темою дисертації, сплановано та виконано основний обсяг експериментальних досліджень. Проведено математичну обробку та статистичний аналіз отриманих результатів. Аналіз та узагальнення результатів роботи, розробку модельних систем з використанням тромбоцитів проведено спільно з н.с., к.б.н. Рока-Мойя Я.М. Фрагменти плазміногену людини (K1-3, K4, K5 та мініплазміноген) отримано спільно з с.н.с., к.б.н. Юсовою О.І. та н.с., к.б.н. Капустяненко Л.Г., вивчення перетворення Glu-плазміногену на Lys-форму на поверхні активованих тромбоцитів – спільно з с.н.с., к.б.н. Юсовою О.І., дослідження актинового цитоскелету тромбоцитів, експонування вітронектину, Р-селектину та фосфатидилсерину на поверхні тромбоцитів – спільно з с.н.с., к.б.н. Тихомировим А.О. та н.с., к.б.н. Рока-Мойя Я.М. Дослідження адгезивних протеїнів в сироватці хворих на шизофренію проводили сумісно з д.б.н. Недзвецьким В.С. Імуногістохімічні дослідження експресії N-кадгерину в тканині підшлункової залози проведено сумісно з д.б.н. Гайдаром Ю.А., дослідження ролі протеїнів клітинної адгезії імуноглобулінової та кадгеринової родини при виробленні реакції уникання у щурів було проведено сумісно з проф. Нерушем П.О. Дослідження



експресії протеїнів адгезії N-CAM1 та N-кадгерину проводилися в Протеїн лабораторії Копенгагенського університету під керівництвом проф. Бок Е.

Всі положення і висновки роботи сформульовано особисто автором дисертації. Основоположні концепції і висновки роботи обговорювались з науковим консультантом, д.б.н. Гриненко Т.В.

**Апробація результатів дисертації** Основні положення дисертації представлені на міжнародних та вітчизняних конференціях та конгресах. European INPBA Congress “Athens 95” (1995р Афіни, Греція), VII Український біохімічний зїзд (Київ, 1997), Міжнародна конференція Франція та Україна, науково-практичний досвід у контексті діалогу національних культур (Дніпропетровськ, 1997 та 1998), конференція Українського товариства нейронаук (Донецьк, 2001 та Донецьк, 2005), Український біохімічний конгрес (м. Одеса, 2010 та м. Київ, 2014), Міжнародна конференція молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери» (м. Харків, 2011 та 2012), Міжнародна наукова конференція «Молодь та поступ біології» (м. Львів, 2012 та 2013), Науково-практична конференція «Молодые ученые в решении актуальных проблем науки» (м. Владикавказ, РФ, 2012, 2013 та 2014), Науково-практична конференція «Aktualne problemy nowoczesnych nauk» (м. Перемишль, Польща, 2012), Конференція-конкурс молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології» (м. Київ, 2013 та 2014), 38-й Конгрес FEBS «Mechanisms in Biology» (м. Санкт-Петербург, РФ, 2013), II Міжнародна конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (м. Дніпропетровськ, 2013), IX Jakub K. Parnas Conference: Proteins from Birth to Death (м. Єрусалим, Ізраїль, 2013), II Міждисциплінарна конференція «Адаптаційні стратегії живих систем» (Новий Світ, АР Крим, 2014), I Конгрес «BIO 2014» (м. Варшава, Польща, 2014), Міжнародна конференція «Современные проблемы естествознания в науке и образовательном процессе» (м. Мінськ, Білорусь 2015), Міжнародна конференція Annual Conference «Bridges in Life Sciences» RECOOP HST ASSOCIATION (м. Вроцлав, Польща 2014 та 2015, м. Будапешт, Угорщина

2016) а також на науковому семінарі Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАНУ «Актуальні проблеми сучасної біохімії» (Київ, 2007 та 2017pp).

**Публікації.** За результатами дисертаційної роботи опубліковано 67 друкованих праць, в тому числі 33 статті, з яких 22 у наукових фахових виданнях України, 4 статті у закордонних виданнях та 33 тези доповідей на вітчизняних і міжнародних конференціях та з'їздах.

**Структура та об'єм дисертації.** Дисертація складається з вступу, основної частини, що включає огляд літератури, експериментальну частину (2 розділи) та заключення, висновків, списку використаних літературних джерел (498 найменувань). Роботу викладено на 319 сторінках друкованого тексту, проілюстровано 75 рисунками, 5 таблицями.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1. Загальний огляд протеїнів клітинної адгезії

Адгезія – це життєво важлива властивість клітин. Вона забезпечує стабільність навколишнього середовища для росту клітин та дозволяє клітинам мігрувати. Адгезія клітин між собою, до екстрацелюлярного матриксу та поверхні ендотелію опосередкована великою кількістю мембранних протеїнів відомих під назвою молекул клітинної адгезії. В літературі всі протеїни клітинної адгезії підрозділяють на декілька основних класів:

- Адгезивні молекули імуноглобулінової родини, вони беруть участь в міжклітинній адгезії, грають важливу роль під час ембріогенезу, заживлення ран, імунної відповіді та формування пам'яті.
- Кадгерини – кальцій-залежні адгезивні протеїни, що відповідають за гомофільні адгезивні контакти.
- Інтегрини – гетеродимерні молекули, які функціонують як клітинно-субстратні та міжклітинні адгезивні рецептори.
- Селектини – адгезивні молекули, що мають у своєму складі лектин-подібний домен, який забезпечує адгезію лейкоцитів до ендотеліальних клітин.

Адгезивні молекули відповідають за міжклітинні взаємодії, та створюють єдиний комплексний механізм, що діє на клітинній поверхні. До цього механізму крім молекул клітинної адгезії залучені багато інших молекул, таких як цитокіни та деякі поверхневі протеїни, наприклад, анексини. Порушення будь-якої ланки механізму адгезивних взаємодій приводить до патологічного стану організму [9, 10]. Молекули клітинної адгезії функціонують як рецептори, що запускають процеси в клітині та контролюють такі життєво важливі процеси як ембріогенез, міграцію

клітин, клітинний ріст, диференціацію та апоптоз. Адгезивні глікопротеїни необхідні для нормального гомеостазу, імунного нагляду та цілісності судинних структур. Так, при тимусній селекції, коли видаляються Т-клітини, які не здатні впізнавати молекули головного комплексу гістосумісності або ті, які впізнають власні антигени, молекули адгезії V-CAM-1 та I-CAM-1 можуть грати ко-стимуляторну роль під час відбіру тимоцитів [11].

З іншого боку адгезивні протеїни імуноглобулінової родини, селектини та кадгерини забезпечують етапи міграції лейкоцитів з кров'яного русла до об'єктів запалення [12]. На поверхні клітин судинного ендотелію експонуються адгезивні протеїни, що забезпечують взаємодію ендотеліальних клітин з матриксом та регулюють проникненість судин.

Представники адгезивних молекул імуноглобулінової родини та кадгеринів мають локалізацію в синаптичних сайтах аксонів та дендритів. Ці молекули з'єднують пре- та постсинаптичні структури і беруть участь у формуванні, созріванні та функціонуванні синаптичних контактів. Разом з механізмами синаптичної передачі адгезивні молекули є важливим елементом в транс-клітинній комунікації, що обумовлена синапсами [13]

Під час розвитку пухлини, коли відбувається втрата адгезивних контактів за типом клітина-клітина або клітина-матрикс, молекули адгезії набувають структурно-функціональних змін. Ці зміни сприяють росту клітин та розповсюдженню пухлини. Класичним прикладом може слугувати експресія Е-кадгерину на поверхні епітеліальних клітин. Було виявлено, що в пухлинах епітеліального походження експонування цього кадгерину на поверхні клітин значно знижене або завдяки змінам в експресії цього протеїну, або завдяки структурним змінам в катенінових протеїнах, що забезпечують зв'язок кадгеринів з цитоскелетними складовими [14]. Дослідження останніх років виявили, що молекули клітинної адгезії можуть виступати в якості супресорів пухлин, така здатність притаманна her-1 та her-2 [15].

Окрему увагу приділяють так званим «розчинним» формам молекул клітинної адгезії. Вони надходять в кровоток, тому рівень цих протеїнів в плазмі розглядають як діагностичний маркер. Так, наприклад, розчинна форма протеїну I-SAM-1 має підвищений рівень у сироватці пацієнтів з асимптоматичною формою СНІДу порівняно з групою здорових донорів, а у хворих на СНІД з симптоматичною вираженістю рівень цього протеїну достовірно перевищував показники, отримані для групи хворих з асимптоматичною формою [16].

В роботі дана стисла характеристика кожного з основних класів, найбільш досліджені представники кожного класу розглянуті окремо. Крім того, представлені літературні дані стосовно структурно-функціональних особливостей анексинів, оскільки експонування певних анексинів на поверхні тромбоцитів пов'язано з міжклітинними адгезивними контактами цих клітин.

### **1.1. Структурно-функціональні особливості протеїнів родини імуноглобулінів**

Адгезивні протеїни імуноглобулінової (Ig) родини – найбільш чисельна група адгезивних молекул. Функціональне навантаження цих протеїнів надзвичайно важливе – вони забезпечують міжнейрональні контакти, контакти нейронів з гліальними клітинами та компонентами екстрацелюлярного матриксу, беруть участь в процесах міграції клітин, аксонального росту, а також є надзвичайно важливими для формування енграм пам'яті [17]. Всі представники цієї родини мають у своєму складі якнайменш один Ig-подібний домен в екстрацелюлярному регіоні. Починаючи з 80-х років минулого століття, родина постійно поповнювалась новими представниками і тому було запропоновано розділення родини на декілька груп залежно від будови екстрацелюлярного регіону [18]. Протеїни першої групи мають у складі екстрацелюлярного регіону тільки Ig-подібні

домени (PECAM-1, глікопротеїн асоційований з мієліном, протеїн периферичного мієліну та інші). Протеїни другої групи мають у своєму складі фібронектинові повтори III типу (протеїни L1, TAG-1, N-CAM1 та ін.).

Протеїн PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1) є класичним представником першої групи. Він складається з шости Ig-подібних доменів, одного трансмембранного домену та одного цитозольного фрагменту, молекулярна маса цього глікопротеїну становить 130 кДа. В молекулі PECAM-1 визначено сайти N- та O-глікозилювання [19]. Протеїн здатен утворювати зв'язок гомофільного та гетерофільного типу. За гомофільний зв'язок відповідає перший екстрацелюлярний домен PECAM-1, а гетерофільний зв'язок може утворюватися завдяки першому, другому або шостому домену. Зокрема, за зв'язок з інтегрином  $\alpha V \beta 3$  відповідають перший та другий екстрацелюлярні домени [20, 21]. Цитозольний фрагмент протеїну PECAM-1 відповідає за зв'язок з катенінами – протеїнами, що входять до складу цитоскелетних структур. PECAM-1 виявляється на поверхні тромбоцитів, моноцитів, нейтрофілів та експонується на клітинах судин. Визначено важливу роль цього протеїну під час міграції лейкоцитів до місця запалення. Вважають, що проникнення лейкоцитів скрізь міжклітинні переходи судинного ендотелію здійснюється саме за допомогою PECAM-1 [22]. Нажаль, механізм, за яким молекула протеїну PECAM-1 здійснює цю функцію, залишається досі невисвітленим. Було визначено, що цей адгезивний протеїн є чутливим маркером пухлино-асоційованого ангіогенезу. Показано, що PECAM-1 залучається до ангіогенезу як під час нормального ембріонального розвитку, так і в разі формування метастазів [23]. Дослідження на тваринних моделях показали, що обробка тканин антитілами до PECAM-1 інгібує цитокін-індукований та пухлинний ангіогенез [24].

До протеїнів першої групи слід віднести родину протеїнів I-CAM (intercellular cell adhesion molecules). Це – трансмембранні глікопротеїни, які

містять у своєму складі від двох до дев'яти Ig-подібних доменів та здатні утворювати зв'язок з лейкоцитарним інтегрином LFA-1 (leukocyte function-associated antigen). I-CAM-1 за звичайних умов експонується в невеликій кількості на ендотеліальних клітинах судин та клітинах імунної системи. Але концентрація цього адгезивного протеїну може підвищуватися при стимуляції цитокінами. Стимулятори експресії I-CAM-1 – інтерлейкін -1 та фактор некрозу пухлин TNF (tumor necrosis factor) [25]. Важають, що при активації лейкоцити приєднуються до ендотеліальних клітин завдяки адгезивним зв'язкам між LFA-1 та I-CAM-1 [26]. Було визначено, що перший екстрацелюлярний домен протеїну I-CAM-1 відповідає за зв'язок з інтегрином LFA-1, рінновірусом людини та фібриногеном. Зв'язування фібриногену з першим доменом I-CAM-1 забезпечує адгезію лейкоцитів до судинного ендотелію. В цьому ж домені відбувається зв'язування з еритроцитами інфікованими малярійним плазмодієм. Було показано, що зв'язуючі сайти для інтегрину LFA-1, рінновірусу людини, фібриногену та інфікованих еритроцитів перекриваються, але не є ідентичними [26]. Інші представники родини I-CAM – протеїни I-CAM-2 та I-CAM-3 мають схожість з I-CAM-1 в амінокислотній послідовності (якнайменш на 30%) та схожі адгезивні властивості. Характерною особливістю I-CAM-3 є його здатність брати участь в ініціації імунної відповіді. Деякі автори розглядають I-CAM-3 не тільки як адгезивний протеїн, але й як сигнальну молекулу [27].

Одним з представників нейрональних протеїнів першої групи є протеїн P<sub>0</sub>, який визначено як головний протеїн периферичного мієліну. Цей протеїн має просту будову – він складається з одного Ig-подібного домена, трансмембранного та цитоплазматичного доменів. P<sub>0</sub> виступає як гомофільний ліганд і може сприяти росту аксона [28]. До цієї ж групи відносять MAG (myelin associated glycoprotein) який забезпечує зв'язок гліальних клітин з аксонами та експонуються на поверхні олігодендроцитів та шванновських клітин. Відомо щонайменше дві форми MAG, що

утворюються завдяки альтернативному сплайсінгу простого гена. Обидві форми містять у своєму складі п'ять Ig-подібних доменів, трансмембранний та цитоплазматичний домени, довжиною останнього ці форми і різняться.

Найбільш дослідженим представником другої групи і взагалі всієї родини вважають протеїн з назвою N-CAM1 (neural cell adhesion molecule), попередник якого, за думкою Еделмана, став засновником цієї родини адгезивних молекул [29]. Перші повідомлення про цей протеїн надійшли в 70 роки [30, 31], а в 90-х була досліджена генна структура протеїну N-CAM1, а також були визначені матричні РНК, які походили від цього гену. Було визначено 26 екзонів гену N-CAM1. Чотири основні ізоформи цього протеїну утворюються завдяки альтернативному сплайсінгу (рис.1.1).

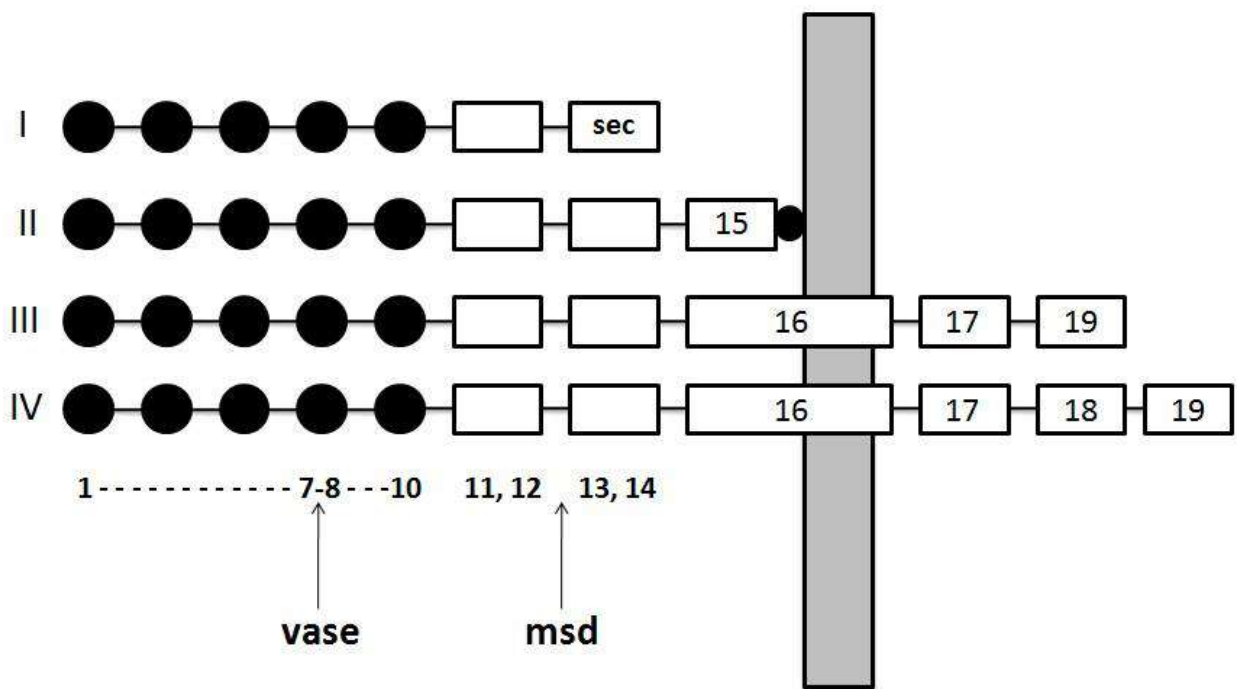


Рис. 1.1. Схематичне зображення ізоформ протеїну N-CAM1:

I – ізоформа з молекулярною масою 110 кДа, II – ізоформа з молекулярною масою 120 кДа, III – ізоформа з молекулярною масою 140 кДа, IV – ізоформа з молекулярною масою 180 кДа, арабськими цифрами позначені екзони, що експресуються у відповідних ізоформах. Чорні кола – імуноглобулінові домени, білі прямокутники без цифр – фібрoneктиніві повтори третього типу, VASE – варіабельний домен, альтернативно



сплайсуємий екзон розташований між 7-м та 8-м екзонами; msd – група додаткових екзонів, які знаходяться між 12-м та 13-м екзонами.

Для всіх ізоформ протеїну N-CAM1 притаманна експресія перших десяти екзонів, що кодують регіон п'яти Ig-подібних доменів. Ці домени складають основну частину екстрацелюлярного регіону протеїну (близько 480 амінокислотних залишків). Експресія 11-го та 12-го екзонів також характерна для всіх ізоформ протеїну. Саме 12 екзон кодує амінокислотну послідовність фібронектинового повтору. Якщо відразу після 12 екзону експресується екзон SEC (239 пар основ), то результатом буде синтез так званої «розчинної» ізоформи N-CAM1 з молекулярною масою 110-115 кДа. Ізоформа «SEC» вперше була знайдена в культурі клітин м'язів людини. Як свідчать результати імуноблотінгу, ця ізоформа представлена найменшою кількістю порівняльно з мембранними ізоформами [32]. Для ізоформ N-CAM1 з молекулярною масою 120, 140 та 180 кДа характерна експресія 13-го та 14-го екзонів. Амінокислотна послідовність, що кодується завдяки 13-му екзону, має схожість з послідовністю, яка кодується 12-м екзоном і, відповідно, є гомологічною фібронектиновому повтору. Експресія 15-го екзона призводить до появи ізоформи N-CAM1 з молекулярною масою 120 кДа. Ця ізоформа прикріплюється до мембрани фосфатидилінозитоловим якорем. Спільна експресія 16, 17-го та 19-го екзонів обумовлює синтез трансмембранної ізоформи N-CAM1 з молекулярною масою 140 кДа. Якщо крім вищезначених екзонів експресується 18-й екзон, то результатом буде поява ізоформи з молекулярною масою 180 кДа. Серед досліджень гену N-CAM1 особливе місце займає визначення додаткових екзонів цього протеїну. Було показано, що між 7-м та 8-м екзонами знаходиться екзон VASE (варіабельний домен, альтернативно сплайсуємий екзон), який складається з 30 пар основ [33]. Включення десяти додаткових амінокислотних залишків, які кодує VASE змінює четвертий Ig-подібний домен таким чином, що надає йому конформацію, яка схожа з варіабельним

доменом імуноглобуліну. Визначення екзону VASE знайшло практичне застосування – було показано, що в спинномозковій рідині хворих з психічними розладами значно підвищений вміст ізоформи N-CAM 120 з експресією VASE [34]. Додаткові екзони MSD (специфічні домени м'язів) експресуються завдяки альтернативному сплайсінгу і розташовані між 12-м та 13-м екзонами гену N-CAM1. Ці екзони мають позначення MSD 1a-1c. Спочатку вважалося, що експресія MSD екзонів є характерною для протеїну N-CAM1, вилученого з м'язової тканини. Але пізніше було доведено, що різноманітні комбінації цих екзонів можна знайти у препаратах матричних РНК головного мозку хребетних тварин [35]. Завдяки екзону MSD 1a утворюється декілька пролинових залишків, а MSD 1b відповідає за синтез амінокислотної послідовності із залишками серину та треоніну. Цей факт має значення, оскільки таким чином у складі ізоформ з експресією MSD 1b з'являється додатковий сайт для глікозилювання. Окрім вищезначених екзонів MSD між 12-м та 13-м екзонами розташований екзон AAG, який теж експресується альтернативно. Якщо відбувається експресія цього екзону, то у складі протеїну з'являється послідовність Gln-Gly. Експресія додаткових екзонів залежить від типу тканини. Показано, що MSD 1b та 1c експресуються у протеїні N-CAM1, вилученого з скелетних та серцевих м'язів, а для MSD 1a та AAG показана експресія в головному мозку [35]. Як впливає експресія цих екзонів на адгезивні властивості протеїну N-CAM1 визначити важко. Послідовності, що кодуються цими екзонами розташовані далеко від сайтів адгезивного зв'язку. Можна припустити лише їх опосередкований вплив на процес міжмолекулярної взаємодії. Разом з тим показана позитивна роль експресії MSD екзонів на здатність протеїну N-CAM1 до стимуляції злиття міобластів (попередників м'язових клітин) під час ембріонального розвитку [36].

В нервовій тканині різні ізоформи N-CAM1 мають специфічний розподіл. Ізоформа N-CAM-140 знайдена, головним чином, в зоні конусу роста аксонів та на поверхні нейронів, що підлягають розвитку; N-CAM-180

експонується в сайтах міжклітинних контактів, зокрема в зоні постсинаптичних бляшок зрілих нейронів, в той час як ізоформа N-CAM-120 експонується в більшості випадків на поверхні гліальних клітин [37, 38, 39]. Вміст протеїну N-CAM1 не обмежується лише нервовою тканиною, його знайдено в скелетних та серцевих м'язах, клітинах підшлункової залози, на поверхні Т-лімфоцитів [40, 41, 42, 43, 44]. Взаємодія протеїну N-CAM1 з іншими протеїнами відбувається завдяки екстрацелюлярному та цитоплазматичному доменам. Гомофільний зв'язок N-CAM1 - N-CAM1 може бути двох типів [45]. Якщо взаємодіють між собою дві молекули N-CAM1, що розташовані на одній клітинній поверхні, то це – цис-взаємодія, якщо на протилежних поверхнях – транс-взаємодія. Утворення цис-димерної форми N-CAM1 можливо коли взаємодіють перші два Ig-подібних домени кожної молекули протеїну. Транс-взаємодія цис-димерів N-CAM1 опосередкована або взаємодією між другим та третім Ig-подібними доменами, або між трьома першими доменами [46]. Гомофільний зв'язок є важливим для адгезивних взаємодій між клітинами та в процесі N-CAM1-залежного росту нейрита [47]. Завдяки гетерофільному зв'язку N-CAM1 взаємодіє з іншими представниками адгезивної родини – протеїнами TAG-1 (transient axonal glycoprotein) та L1. Слід зазначити, що для взаємодії з L1 важливим є четвертий Ig-подібний домен протеїну N-CAM1 [48]. Важливим адгезивним партнером протеїну N-CAM1 є також рецептор фактора росту фібробластів FGFR, що здатен утворювати зв'язок з двома фібронектиновими повторами молекули N-CAM1. Ця взаємодія запускає FGFR-сигнальний каскад, який стимулює рост аксону та пухлинний ріст [49, 50].

Завдяки цитоплазматичному домену N-CAM1 здатен утворювати зв'язок з протеїнами цитоскелету та деякими сигнальними молекулами. Було показано, що цитоскелетний протеїн спектрин зв'язується з ізоформами N-CAM-180, N-CAM-140 та опосередковано з ізоформою N-CAM-120 [51]. Вважають, що такий зв'язок грає важливу роль в процесі N-

CAM1-опосередкованого росту нейрита [52]. Ізоформи N-CAM-180 та N-CAM-140 здатні утворювати зв'язок з тубулінами та фосфоліпазою C $\gamma$  [53].

Молекула N-CAM1 розглядається в багатьох дослідженнях як сигнальний рецептор. N-CAM1-залежний сигналінг реалізується як через гомофільні, так і через гетерофільні взаємодії. Шлях сигналінгу залежить від місця знаходження протеїну N-CAM1, у складі ліпідних рафтів або поза ними. Ліпідні рафти – мембранні мікродомени, які визначають як платформи для протеїн-протеїнової та протеїн-ліпідної взаємодії. Якщо N-CAM1 знаходиться поза рафтами, то він активує c-AMP залежну протеїнкіназу за механізмом, який ще досі не висвітлений [54]. До того ж, взаємодія N-CAM1 з FGFR активує фосфоліпазу C $\gamma$ , яка звільнює диацилгліцерол з мембранних ліпідів. Далі за дії диацилгліцеролліпази утворюється арахідонова кислота. Вищезначені фактори сприяють підвищенню концентрації внутришньоклітинного кальцію, що впливає через відповідні шляхи на транскрипційні механізми та цитоскелетні структури. У складі ліпідних рафтів N-CAM1 діє через інший сигнальний шлях – gas-мітоген активовану протеїн кіназу [55]. Зроблено висновок, що N-CAM1-залежний сигналінг (незалежно від місця знаходження протеїну) має одну кінцеву мету – реорганізація цитоскелетних структур та вплив на генну транскрипцію, що є необхідним фактором для клітинної міграції та росту аксона [56].

## **1.2. Загальна характеристика протеїнів кадгеринової родини**

Білки кальцій-залежної адгезії одержали назву кадгеринів від англійської *calciumadherent* – кальцій-зв'язуючі. Кадгерини забезпечують сортування клітин під час морфогенезу, а також відіграють важливу роль у процесі сигналінга [57, 58]. Кадгеринова адгезія має кілька особливостей.

По-перше, міжпротеїнові взаємодії, які забезпечуються кадгеринами є найміцнішими порівняно з тими, що утворюють інші адгезивні молекули. Доки функціонують кадгерини, інактивація інших адгезивних систем не має значного впливу на клітинну адгезію. Зниження кадгеринової адгезії в дорослій тканині може свідчити про наявність патології. Так, наприклад, завдяки такому зниженню ракові клітини набувають здатності до міграції.

По-друге, кадгеринава адгезія відбувається виключно по гомофільному механізму. Тобто кадгерини, які розташовані на поверхні однієї клітини, здатні здійснювати зв'язок із кадгеринами лише того ж класу іншої клітини. Клітини, що належать до однієї тканини, експресують кадгерини переважно одного класу. Це можна уявити за допомогою наступного експерименту [59]. Відомо, що клітини культури фібробластів не мають кадгеринів на поверхні і не мають ніяких адгезивних зв'язків між собою. Такі клітини одержали назву L-клітин. Якщо L-клітини піддати трансфекції ДНК, яка кодує E-кадгерин, то трансфected L-клітини набувають здатності до кальцій-залежної адгезії. Адгезивний зв'язок трансфected L-клітин повністю блокується антитілами до E-кадгерину. Оскільки трансфected L-клітини не здатні до адгезивного зв'язку з інтактними клітинами, то можна зробити висновок, що міжклітинна взаємодія в цьому випадку відбувається завдяки E-кадгериновим білкам, які знаходяться на поверхні двох клітин. При змішуванні L-клітин, на поверхні яких експресовані кадгерини різних класів, спостерігали сортування клітин відповідно класу експресуемого кадгерину. Сегрегація була очевидною також і в разі змішування клітин, які різняться кількісним складом кадгеринів одного класу. Таким чином, кількісні та якісні відмінності кадгеринової адгезії можуть відігравати важливу роль під час формування тканин [60].

Третьою особливістю кадгеринових білків можна вважати їх структурну схожість. На думку деяких авторів [61], кадгерини — це сімейство близькородинних білків, які мають тканеспецифічні домени.

Сімейство кадгеринів нараховує більш ніж сотню протеїнів. Спочатку були визначені так звані “класичні” кадгерини, що названі відповідно до тканин, де їх було знайдено. Так, Е-кадгерин зустрічається у багатьох типах епітеліальних клітин, N-кадгерин знайдено у нервовій тканині, Р-кадгерин — головний кадгерин плаценти та епідермісу [62]. Далі було знайдено R, B, EP-кадгерини. Вони мають усі риси, притаманні класичним кадгеринам (тобто наявність сайтів для адгезивного впізнавання та зв'язку з іонами кальцію, зв'язок із цитоскелетними складовими, посттрансляційний процесінг).

Використання молекулярно-генетичних підходів привело до визначення додаткових кадгеринів в тканинах хребетних та безхребетних тварин. Ці протеїни теж включено до кадгеринового родини, але вони мають певні відмінності. Так, М- та Т-кадгерини схожі за структурою на класичні кадгерини, але мають специфічну модифікацію або відсутність деяких доменів [62, 63]. Група десмосомальних кадгеринів (десмоколін та десмоглеїн) відрізняється не тільки складом, але має власні функціональні особливості [64]. Структура кадгеринів має схожі риси. Найчастіше кадгерини — це трансмембранні білки з молекулярною масою 125-135 кДа. Зазвичай молекула кадгеринового протеїну складається з п'яти екстрацелюлярних доменів, трансмембранного та цитоплазматичного доменів (рис. 1.2).

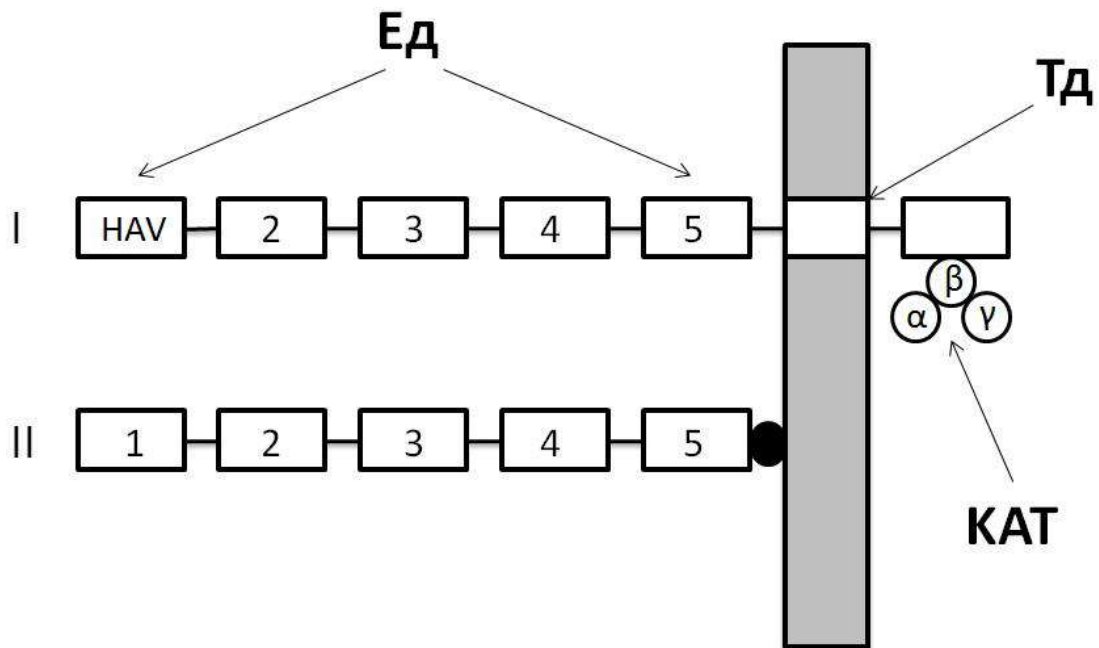


Рис. 1.2. Схематичне зображення структури кадгеринів: I – структура E, N, P, B, R-кадгеринів, II - структура T-кадгерину, Ед-екстрацелюлярні домени, Тд- трансмембранний домен, Кат- катенини.

При аналізі амінокислотного складу екстрацелюлярних доменів різних кадгеринових протеїнів виявилось, що чотири домени, які знаходяться ближче до N-кінця поліпептиду, відзначаються високим ступенем консервативності, а п'ятий домен має значно більшу різноманітність. Було показано, що перший екстрацелюлярний домен містить у собі послідовність, завдяки якій відбувається ефективний гомофільний зв'язок. Вважають, що такою важливою послідовністю може бути His-Ala-Val (HAV).

Мутаційні зміни у першому домені впливають на специфічність адгезивного зв'язку. Мутантний Р-кадгерин, в якому мутаційні зміни торкалися першого екстрацелюлярного домену, здобув здатність адгезивного зв'язку не лише з Р-кадгерином, але й з Е-кадгерином [28]. Крім того, ряд авторів зазначає, що саме з цим доменом відбувається зв'язок антитіл, які блокують кадгеринову адгезію [65, 66]. Амінокислотна послідовність першого екстрацелюлярного домену не перевищує 113 амінокислотних залишків. Характерною особливістю екстрацелюлярних доменів є наявність

специфічних ділянок для зв'язку іонів кальцію. Відомо, що ці іони необхідні для виконання гомофільного адгезивного зв'язку. Спочатку у складі Е-кадгерину, а далі у складі інших кадгеринів були визначені кластерні структури, здатні зв'язувати іони кальцію [67, 68]. Поліпептидна структура регіонів, де знаходяться кластерні структури, має вигляд або  $\beta$ -конформації, або клубка. Аналіз амінокислотної послідовності кальцій-зв'язуючих регіонів показав, що структура цих регіонів має певні особливості [69]. Просторова структура кадгеринового поліпептиду з кальцій-зв'язуючими сайтами представлена на рис. 1.3.

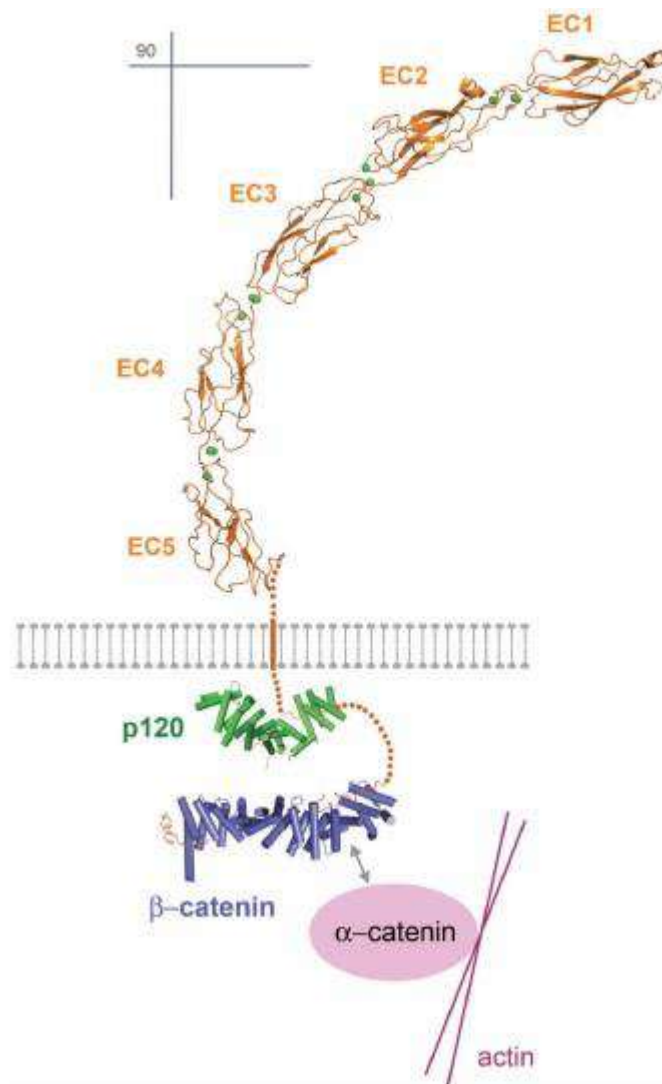


Рис. 1.3. Схематичне зображення просторової структури класичних кадгеринів.

[69]



EC1 - EC5 – екстрацелюлярні домени кадгерину, зелені кружочки – іони кальцію, помаранчеві кружочки з внутрішньої сторони мембрани – цитоплазматичний домен.

Кальцій-зв'язуючі сайти знаходяться в кожному лінкерному регіоні між екстрацелюлярними доменами кадгеринової молекули. Три іони кальцію утримуються кожним лінкерним регіоном, в структурі класичних кадгеринів дванадцять іонів. Афінність кальцієвих сайтів неоднакова, проте за фізіологічних умов вся молекула кадгерину насичена кальцієм. Вважають, що наявність кальцію в структурі кадгеринів надає ригідності молекулі і захищає від дії протеолітичних ензимів. Слід зауважити, що завдяки ригідності екстрацелюлярна частина кадгеринової молекули має певний нахил. Перший екстрацелюлярний домен розташований під кутом  $90^\circ$  відносно п'ятого домену. Така конформація сприяє утворенню цис- та транс-кадгеринових структур, коли взаємодіють або сусідні кадгеринові молекули, що знаходяться на одній клітинній поверхні (цис-зв'язок), або кадгерини, які розташовані на різних клітинах (транс-зв'язок). Трансмембранний домен є в складі багатьох, але не всіх кадгеринів. Коли було повідомлено про Т-кадгерин, автори роботи [70] виявили, що він приєднується до плазматичної мембрани завдяки фосфатидилінозитоловому якорю. Для інших членів родини визначено трансмембранний домен, який складається з 26-27 амінокислотних залишків. Цілком природно, що головну роль у формуванні такого домену відіграють амінокислоти з неполярними, гідрофобними R-групами. Так, наприклад, з 26 амінокислотних залишків трансмембранного домену В-кадгерину 13 припадає на лейцинові залишки, 6 — на валинові, 3 — на аланінові, 2 — на глицинові і по одному залишку припадає на ізолейцин та пролін [71]. Структура десмосомальних кадгеринів значно відрізняється від структури інших членів родини й за складом трансмембранного домену. З 27 залишків трансмембранного домену десмоколіну 19 припадає на залишки амінокислот з гідрофобними,

неполярними R-групами, а решта 9 є залишками амінокислот з полярними R-групами [72].

Найбільшою консервативністю серед кадгеринових доменів відзначаються цитоплазматичні домени. При порівнянні амінокислотної послідовності цитоплазматичних доменів N, P та E-кадгеринів миші, E-кадгерину людини та N-кадгерину курчати виявилось, що вона співпадає на 90 % [73]. У цілому ж амінокислотна послідовність вищезначених кадгеринів співпадає не більше ніж на 50 %. Такий консерватизм у складі цитоплазматичного домену може бути пояснений його функціональним навантаженням. Цитоплазматичні домени кадгеринів відповідають за зв'язок з цитоскелетними структурами. Цей зв'язок є дуже важливим для кадгеринової функції. Якщо повністю або частково вилучити цитоплазматичний домен із складу кадгеринів, то трансмембранні кадгерини виявляються неспроможними виконувати адгезивну функцію [74].

Дослідження кадгеринової структури виявили, що цитоплазматичні домени цих білків утворюють комплекс із специфічними протеїнами цитоскелету. Такі білки одержали назву катенинів [75]. Катенини — це периферичні цитоплазматичні протеїни, для яких вперше була показана асоціація з E-кадгерином при використанні антитіл до цього протеїну [76]. У цитоплазматичному домені E-кадгерину було знайдено амінокислотну послідовність із 72 залишків, яка відповідала за асоціацію з катенинами [77]. Далі визначили, що серед цієї послідовності найбільш важливими є лише 30 амінокислотних залишків [78]. Асоціацію з катенинами виявляють також N- та P-кадгерини [79]. Вважають, що катенини виступають як молекулярний елемент, який допомагає кадгеринам утворювати зв'язок з філаментами актину [78].

В науковій літературі є дані про асоціацію катенинів з продуктами гену пухлинного супресора [80], крім цього катенини є субстратами для тирозинової кінази [81]. Ці експериментальні дослідження узгоджуються з

припущенням, що катенини — це регулятори екстрацелюлярних адгезивних властивостей кадгеринів та їх взаємодії з цитоскелетними складовими.

Катенинові протеїни різняться між собою молекулярною масою:  $\alpha$ -катенин — 102 кДа,  $\beta$ -катенин — 88 кДа,  $\gamma$ -катенин — 80 кДа. Доведено, що  $\beta$ -катенин може утворювати прямий зв'язок із цитоплазматичним доменом кадгерину, в той час як  $\alpha$ -катенин відповідає за зв'язок з філаментами актину [82]. Визначення первинної структури показали схожість катенинів із відомими протеїнами, які беруть участь в контактах клітин між собою та екстрацелюлярним матриксом. Амінокислотна послідовність схожа у  $\alpha$ -катенину та вінкуліну [83]. Існує щонайменш дві ізоформи  $\alpha$ -катенину:  $\alpha E$  та  $\alpha N$  [84]. Білок  $\beta$ -катенин схожий за своєю амінокислотою послідовністю з компонентом десмосом, плакоглобіном [84, 85]. За даними амінокислотної послідовності [82] та імунохімічного аналізу [86],  $\gamma$ -катенин ідентичний або близький за складом до плакоглобіну [87]. Для визначення архітектурного комплексу кадгеринів з катенинами автори роботи [75] використали рекомбінантні катенини та E-кадгерин. Рекомбінантна технологія дозволила одержати вищезазвані протеїни у кількості, достатній для структурного та функціонального аналізу. Виявилося, що формування комплексу кадгерин-катенини неможливе без участі  $\beta$ -катенину. Цей катенин утворює зв'язки з  $\alpha$ -катенином та цитоплазматичним доменом E-кадгерину. Незважаючи на амінокислотну схожість, плакоглобін не може замінити  $\beta$ -катенин у комплексі кадгерин-катенини, хоча плакоглобін здатен утворювати зв'язок з цитоплазматичним доменом E-кадгерину та взаємодіяти з  $\alpha$ -катенином. Цілком імовірно, що  $\beta$ -катенин виявляє більшу афінність до E-кадгерину, ніж плакоглобін. Була визначена амінокислотна послідовність у складі  $\beta$ -катенину (залишки з 120 по 683), яка є важливою для зв'язку з E-кадгерином. Цікаво, що схожа послідовність є й у складі плакоглобіну. Цілком імовірно, що саме завдяки цій послідовності плакоглобін може зв'язуватися з E-кадгерином. Дослідження взаємодії  $\beta$ - та  $\alpha$ -катенинів довели, що ці два протеїни утворюють комплекс у співвідношенні 1:1. Крім цього було

знайдено амінокислотну послідовність у складі  $\beta$ -катенину (залишки з 120 по 151), завдяки якій відбувається зв'язок з  $\alpha$ -катенином. Кадгерини можуть бути асоційованими не лише з катенинами. Існують дані про спільну локалізацію кадгеринів з протеїнами клітинної поверхні. У багатьох тканинах тварин відзначають спільне розташування кадгеринів та N-ацетилгалактозамінфосфотрансферази. Автори роботи [88] показали, що цей ензим має структурну та функціональну асоціацію з кадгеринами. Викликають інтерес експериментальні дані про дослідження клітин з кадгериновими адгезивними контактами та коннексиновими щілинними контактами. Було встановлено, що пертурбація якого-небудь компонента адгезивного контакту приводила до формування адгезивного зв'язування іншого типу [89]. Незважаючи на те, що тип кадгерину (N, E, P) відображає його тканеву специфічність, останнім часом з'явилися дані, що представники одного кадгеринового типу зустрічаються у багатьох тканинах і, навпаки, для кожної конкретної тканини показана наявність декількох кадгеринів.

Нейрональним кадгерином вважається N-кадгерин. Важлива роль цього протеїну для розвитку нервової тканини була визначена за допомогою специфічних антитіл до нього. При введенні N-кадгеринових антитіл в ембріон тварин порушується не тільки нормальний розвиток нервової трубки, але й міграція клітин нервового гребеня [90]. У нервовій тканині було знайдено також інші кадгерини, а саме -R, T та E-кадгерини. Так, експресія E-кадгерину під час формування нейрональної пластини закінчувалась на стадії розвитку ектодерми, але цей кадгерин здатен до реекспресії під час нейронального розвитку. За даними авторів робіт [91, 92], E-кадгерин має тимчасову експресію під час розвитку центральної нервової системи миші, але постійну — під час розвитку периферичної. Серед регіонів центральної нервової системи на стадіях 10-15-денного розвитку експресія E-кадгерину була характерна для середнього мозку, проміжного мозку та мозжечку. Введення в культуру головного мозку антитіл до E-кадгерину викликало порушення морфогенезу. Для периферичної нервової системи експресія E-

кадгерину була визначена, починаючи із стадії 12-денного розвитку ембріона і до стадії дорослості тварини включно у спинних корінцях та трійчастих гангліях. Знаходять E-кадгерин на поверхні нейронів, сателітних та шванновських клітин [62, 93].

Характеризуючи розподіл R-кадгерину у нервовій системі, його досить часто порівнюють із розподілом N-кадгерину, можливо, через найбільшу схожість цих протеїнів. Так, експресія N-кадгерину мозку курчати значно знижується під час розвитку нервової системи і залишається на досить високому рівні лише в регіоні вентрикулярної вистилки, хороїдного сплетіння, спинного мозку та нижньої пластинки мозкового ствола [94]. Від експресії нейрональних кадгеринів залежать швидкість проростання та ступінь гіллястості аксонів, які розвиваються, а також відносна адгезивність між конусами росту та їх субстратами і взагалі рух аксонів [95]. Серед факторів, які впливають на ріст аксону, може бути активація вторинних месенджерів. Ця активація, як показали автори роботи [96], теж відбувається завдяки кадгериновим протеїнам. Аксони, вирощені в культурі, виявляли здатність розпластуватися уздовж фібробластів, трансфекованих N-кадгериновим геном. Для контрольних клітин такого виявлено не було. Але ріст аксонів на контрольних фібробластових клітинах може здійснюватись навіть у відсутності N-кадгерину, якщо відбувається активація агентів, які стимулюють кальцієві потоки. Можливо, що активація вторинних месенджерів є однією із функцій N-кадгерину. Цю гіпотезу підтверджують дослідження з N-кадгерином-90 (N-кад-90). Цей кадгерин є результатом протеолітичного гідролізу інтактного N-кадгерину, у складі N-кад-90 цитоплазматичний домен повністю відсутній. Модельні експерименти з N-кадгерином-90 виявили його здатність утворювати адгезивні зв'язки подібно до тих, що відбуваються завдяки інтактному N-кадгерину. Цікавим є те, що такі зв'язки не були кальцій-залежними, хоча N-кад-90 був захищений від трипсинізації іонами кальцію. Автори роботи [97] вважають, що залежність

від іонів кальцію кадгеринових білків може бути умовою для активації вторинних месенджерів.

Важливо зазначити, що для модуляції додаткових кадгеринових функцій часто необхідні інші фактори. Наприклад, було показано, що екзогенно доданий гангліозид GM-1 підсилював стимульований N-кадгерином ріст аксону серед клітин PC12 [98]. Фібробласти, які експресують N-кадгерин, утворювали адгезивні зв'язки з нейронами гіпокампу, що були взяті на ранніх стадіях розвитку. Відповідь на N-кадгеринову експресію відзначалась ростом аксонів. Хоча експресія N-кадгерину значно не змінювалась, було встановлено, що відповідь на N-кадгерин залежить частково від зовнішніх факторів [99].

Слід сказати, що на поверхні однієї тканини можуть експонуватися водночас різні кадгерини. У м'язах тварин та людини було знайдено N, T, R та M-кадгерини. Для N-кадгерину було показано його зв'язок з тканинами мезодермального походження, цей кадгерин експонується на поверхні міобластів, але після зливання міобластів його експресія значно знижується [100]. Цікаві дані були одержані авторами роботи [101] про E-кадгеринову експресію на поверхні клітин Лангергансу (макрофаги шкіри). Завдяки цій експресії макрофаги здатні чіплятися до кератиноцитів. Ці дослідження значно розширюють попередній погляд на функціональну роль кадгеринів.

Таким чином, множинна експресія кадгеринів під час розвитку тканин хребетних тварин може бути обумовлена тим, що функція цих протеїнів не обмежується лише селективною асоціацією клітин. Кадгерини є об'єктами для модуляції багатьма факторами, вони важливі і під час динамічних періодів гістогенезу, і для підтримки стабільного стану зрілих тканин. Існує припущення, що кадгерини здатні давати унікальну відповідь залежно від умов оточення [57]. Є докази того, що кадгерини грають важливу роль у формуванні синапсів. В зрілих синапсах кадгерини формують структури (puncta adherents), які оточують активну зону, що відповідає за вивільнення нейротрансмітерів [102]. Було показано, що деполяризація нейронів

гіпокампу призводить до підсилення N-кадгерин опосередкованої адгезії, протеїн димеризується і стає стійким до дії протеїназ [103].

В роботі було досліджено тканевий розподіл N-кадгерину під час постнатального розвитку та старіння щурів, а також зроблена спроба виявити роль цього протеїну при виробленні реакції уникання у цих тварин.

### 1.3. Структурно-функціональні особливості селектинів

Селектинові протеїни отримали свою назву завдяки наявності лектиноподібного домену, що зв'язує глікопротеїни. Для виконання функції селектинам необхідні іони кальцію. Вважають, що селектини – це типові трансмембранні протеїни, однак є думка, щодо існування селектинів, які зв'язуються з мембраною за допомогою фосфатидилінозитолового якоря [104]. Лігандами селектинів є глікопротеїни або гліколіпіди. Незважаючи на те, що селектини мають глікопротеїнову природу, втрата ними вуглеводної частини не впливає на їхні адгезивні властивості [59]. В літературі описані E-, P- та L-селектини [105, 106]. Селектини – продукти споріднених генів, але вони розрізняються за специфічністю та тканинним розподілом [107]. P-селектин (GMP-140, PADGEM, CD 62) зберігається в альфа-гранулах тромбоцитів та тільцях Вайбеля-Паладі ендотеліальних клітин, L-селектин (LECAM-1, LAM-1) експонується на всіх гранулоцитах та моноцитах та на поверхні більшості лімфоцитів. E-селектин (ELAM-1) за нормальних умов виявляється тільки на поверхні мікросудин шкіри, але його експресія швидко стимулюється під впливом цитокінів запалення.

Всі селектинові протеїни мають спільну будову – N-кінцевий лектиновий домен, домен схожий зі структурою епідермального фактора росту, декілька (від двох до дев'яти) високогомологічних доменів, трансмембранний та цитоплазматичний домени (рис. 1.4).

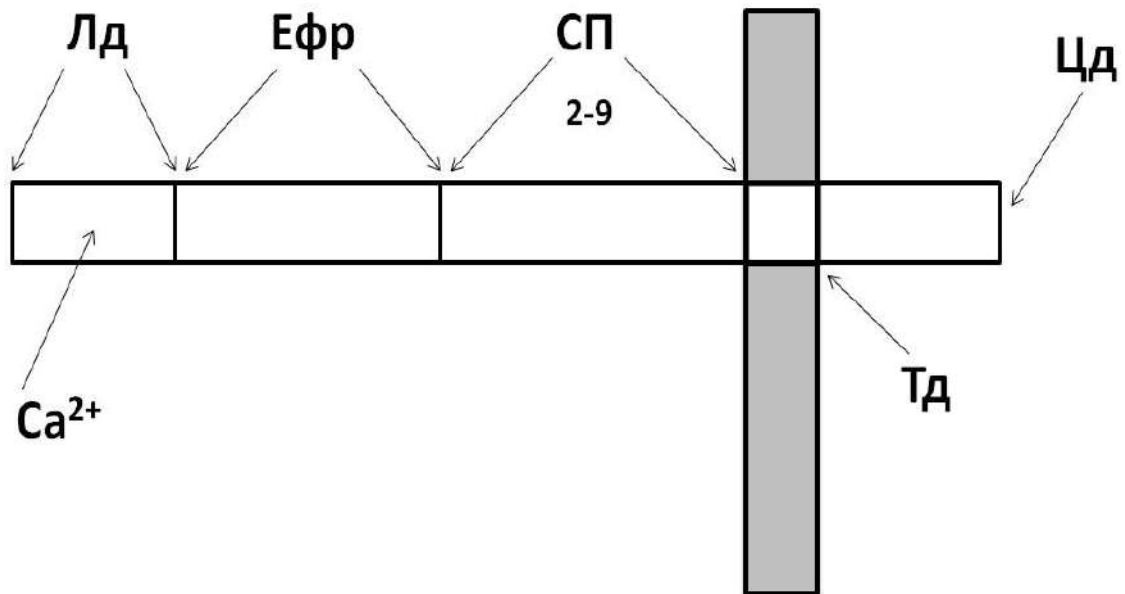


Рис. 1.4. Схематичне зображення структури селектинів:

Лд – лектиновий домен, ЕФР – домен схожий з епідермальним фактором росту, СП – селектинові повтори кількістю від 2 до 9, Тд – трансмембранний домен, Цд – цитоплазматичний домен.

Селектини виявляють високу ступінь гомології між собою і амінокислотна послідовність у селектинів різних видів теж має високу схожість. Найбільш консервативним вважається лектиновий домен, який відповідає за зв'язок з цукровими залишками. Є багато кандидатів на роль селектинових лігандів, але тільки Р-селектиновий ліганд, PSGL-1 охарактеризований на молекулярному, клітинному та функціональному рівні. PSGL-1 є не тільки головним лігандом Р-селектину, але здатен зв'язувати L-селектин та Е-селектин [108]. L-селектинові ліганди – муциноподібні протеїни ендотелію (мукозальний адресин MAdCAM, GlyCAM-1 та CD34), Е-селектиновий ліганд – лейкоцитарний глікопротеїн, що містить залишки фукози та сілової кислоти [109, 110].

Функціональну роль селектинових протеїнів традиційно пов'язують з запальним процесом. Саме селектини забезпечують лейкоцитарний ролінг, процес під час якого сповільнюється рух лейкоцитів уздовж судинної стінки.



Сигнал для початку ролінгу спричиняють прозапальні агенти, які переводять судинний ендотелій в активований стан. До таких агентів відносять гістамін, тромбін, брадикінін, лейкотриєн C<sub>4</sub> та інші. На активованому ендотелії спостерігається підвищена експресія E- та P-селектинів. Підвищується також експресія лейкоцитарного L-селектина. Вважають, що важливою особливістю ролінгу є секреція P-селектину з тілець Вайбеля-Паладі та його послідовний зв'язок з лігандом PSGL-1 на поверхні моноцитів, нейтрофілів та тромбоцитів [111]. З трансмембранної ізоформи P-селектину внаслідок протеолітичної деградації утворюється розчинна ізоформа – sP-селектин. Цей протеїн, зв'язуючись з моноцитами, призводить до появи на їх поверхні тканинного фактора – індуктора згортання крові. Тобто процеси запалення та тромбоутворення знаходяться у тісному зв'язку. Слід зазначити, що селектинова адгезія є нестійкою, але за умов дії стимулюючих агентів селектиновий ролінг активує лейкоцити. Детальний механізм цього процесу ще потребує висвітлення, але можна припустити таку послідовність подій. Зв'язок L-селектина з лігандом на ендотелії призводить до внутрішньоклітинного вивільнення іонів кальцію. Ці іони активують лейкоцитарні інтегрини та стимулюють синтез матричних РНК, що необхідні для синтезу цитокінів [112]. В свою чергу цитокіни активують клітини ендотелію та лейкоцити, що не були залучені до ролінгу. Лейкоцитарні селектини під час зв'язку з лігандом на поверхні ендотелію утворюють кластери в місцях клітинного контакту. Після активації інтегринів селектинові кластери виявляються сумісно з інтегриновими [113].

Хоча запальна реакція є природним захисним засобом організму, перехід цього процесу у хронічний стан супроводжується деструкцією здорових тканин та послабленням імунітету. Висвітлення молекулярних механізмів процесу запалення дає можливість для розробки певних заходів, спрямованих на зниження адгезивних властивостей ендотелію та лейкоцитів, а це в першу чергу стосується селектинової адгезії [114]. Однак оскільки хронічне інгібування селектинів може призвести до небажаних наслідків, а

саме – до пригнічення імунної системи пацієнта, на сьогоднішній день не розроблено анти-селектинового препарату, який пройшов би клінічне тестування. Більш перспективним виявилось використання селектинів та антитіл до них в якості маркерів. Наприклад, при виявленні запалення нирок або серцевих м'язів доцільним було використання ультразвукових контрастуючих агентів спрямованих на розпізнання Р-селектину [115]. Досить поширеним є використання антитіл до Р-селектину для характеристики процесу секреції тромбоцитарних альфа-гранул. Відомо, що Р-селектин експонується на поверхні тромбоцитів лише за умов активації [116, 117]. В нашій роботі ми використовували цей підхід для оцінки впливу Glu- та Lys-плазміногену на процес секреції альфа- гранул тромбоцитів стимульованих тромбіном та колагеном.

#### **1.4. Інтегрини – адгезивні протеїни, що передають міжклітинні сигнали. Тромбоцитарні інтегрини, їх структурно-функціональні особливості**

Термін "інтегрини" був прийнятий для характеристики групи адгезивних протеїнів, які здатні виконувати інтегративну функцію, передаючи сигнал від екстрацелюлярних лігандів на внутрішньоклітинні цитоскелетні структури і навпаки [118, 119]. Завдяки інтегринам реалізуються адгезивні взаємодії клітина-клітина, клітина-матрикс та клітина-патоген. Описано не менш 24 інтегринів у хребетних тварин. Всі інтегрини складаються з двох субодиниць  $\alpha$  та  $\beta$ , які зв'язані між собою нековалентно. На поверхні інтактних тромбоцитів експонуються такі інтегрини –  $\alpha_2 \beta_1$ ,  $\alpha_5 \beta_1$   $\alpha_6 \beta_1$ ,  $\alpha_V \beta_3$  та  $\alpha_{IIb} \beta_3$  [120]. На поверхні активованих тромбоцитів крім цього було знайдено  $\alpha_L \beta_2$  та  $\alpha_M \beta_2$  [121]. Інтегрини мають спільний план будови (рис. 1.5 ) – видовжений екстрацелюлярний домен, трансмембранний регіон та короткий цитоплазматичний домен. N-кінцевий домен  $\alpha$ -субодиниць представлений 7

сегментами, кожен з яких складається приблизно з 60 амінокислотних залишків. Ці сегменти є фрагментами  $\beta$ -складчастої структури, які розташовані як лопаті гвинта навколо гіпотетичної вісі [122,123]. Близько половини інтегринових  $\alpha$ -субодиниць містять між другим та третім сегментами I-домен.

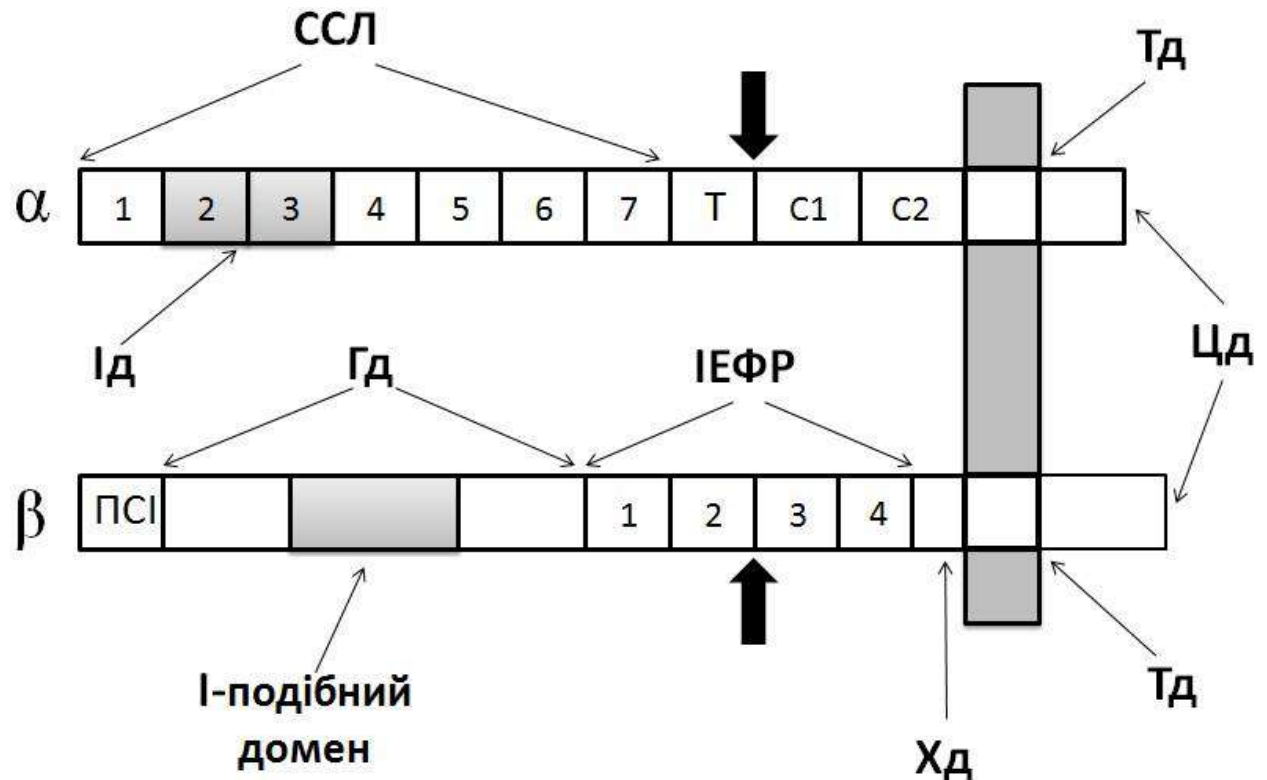


Рис. 1.5. Схематична будова інтегринів:

ССЛ – сегменти складчастого листа, Ід – I домен, Т – thigh домен, C1 та C2 – calf домени, ПСІ – домен, що виявляє схожість з будовою плексина, семафорина та інтегринів, Гд – гібридний домен, ІЕФР – інтегринові домени, які схожі з епідермальним фактором росту, Хд – хвостовий домен, Тд – трансмембранні домени, Цд – цитоплазматичні домени, ↓ – місця перетину субодиниць.

Цей домен має гомологію з доменами фактору фон Вілебранда і забезпечує зв'язування  $\alpha$ -субодиниць - з лігандами [124, 125]. Далі йдуть домени під назвою Т (від англ. thigh-стегно) та C1 і C2 (від англ. calf-

ікроножний м'яз). Назва утворена завдяки здатності інтегринів приймати так звану «зігнуту» конформацію, коли N-кінцевий домен субодиниці наближається до трансмембранного домену. Вигин структури відбувається між доменами  $t$  та  $c1$  (так званий «колінний» регіон  $\alpha$ -субодиниці). Перебування у «зігнутому» стані характерно для неактивованих інтегринів. Цитоплазматичний домен  $\alpha$ -субодиниць зазвичай невеликий – приблизно від 20 до 40 амінокислотних залишків, але є дуже важливим для виконання функції. Саме тут відбувається приєднання сигнальних, адапторних та цитоскелетних протеїнів. Слід зауважити, що цитоплазматичні домени двох субодиниць пов'язані між собою і порушення такої взаємодії – один із етапів механізму inside-out, коли відбувається передача сигналу з цитосеклетних структур на екстрацелюлярний домен [126].

Структура інтегринових  $\beta$ -субодиниць має свої особливості. Перший N-кінцевий домен складається приблизно з 50 амінокислотних залишків і має гомологію з іншими мембранними протеїнами, назва домену –ПСІ (плексин, семафорин та інтегрин). Далі йде гібридний домен, всередині якого розташований I-подібний домен (від 100 до 340 амінокислотних залишків). Саме тут відбувається зв'язок  $\beta$ -субодиниць з лігандами. Слід сказати, що ліганд-зв'язуюча кишеня формується з елементів двох субодиниць. Так, тромбоцитарний інтегрин  $\alpha IIb \beta 3$  формує ліганд зв'язуючу кишеню з фрагменту сегментів складчастого листа  $\alpha$ -субодиниці та послідовності I-подібного домену  $\beta$ -субодиниці [127]. За гібридним доменом в  $\beta$ -субодиниці знаходяться інтегринові домени схожі з епідермальним фактором росту (ІЕФР), а хвостовий домен, багатий на цистеїнові залишки, примикає до цитоплазматичного домену. Між другим та третім доменом ІЕФР знаходиться «колінний» регіон  $\beta$ -субодиниці. Цитоплазматичний домен може містити від 45 до 60 амінокислотних залишків. Тут відбувається приєднання таліну, ендонексину та деяких кальцій-зв'язуючих протеїнів [128]. Вищезначені особливості будови тромбоцитарних інтегринів забезпечують їх здатність до швидкої зміни конформації і переходу від стану з низькою

афінністю (за умов інтактних тромбоцитів) до високоафінного стану (за умов активації). Після активації тромбоцита інтегрин  $\text{PbIIIa}$ , який в інтактних тромбоцитах знаходився в зігнутому стані в області «колінних» регіонів, приймає випрямлений стан. В такому стані  $\text{PbIIIa}$  набуває здатності до приєднання адгезивних лігандів, - фібриногена, вітронектина, фібронектину [129]. Сигналом для переходу інтегрину у високоафінну форму вважають зростання концентрації іонів кальцію в цитоплазмі активованих тромбоцитів [130]. Підвищення концентрації кальцію призводить до реорганізації цитоскелету та зв'язування таліну з  $\beta 3$ -субодиницею інтегрину [131]. Асоціація таліну з хвостом  $\beta 3$  руйнує нековалентні взаємодії між  $\alpha$ - та  $\beta$ -субодиницями, що стабілізують низькоафінну конформацію інтегрину. Структурні зміни з цитоплазматичних частин  $\alpha\text{Pb}\beta 3$  призводять до конформаційних змін у його позаклітинних доменах, які, теж, відповідно, переходять у відкриту конформацію [132]. Після цього інтегриновий комплекс  $\alpha\text{Pb}\beta 3$  набуває здатності зв'язувати молекули адгезії. Вищезначені події характеризують сигналінг за типом «зсередини-назовні» (inside-out). Зв'язування лігандів з тромбоцитарними інтегринами сприяє запуску сигналінгу іншого типу, а саме - «ззовні-всередину». Внаслідок цього сигналінгу відбувається послідовність подій, що призводить до ретракції згустку та спредингу тромбоцитів на адгезивній поверхні клітини [133, 134].

Роль тромбоцитарних інтегринів в науковій літературі висвітлена не повністю, але деякі характеристики відомі по кожному представнику. Головним рецептором колагену на тромбоцитах вважають інтегрин  $\alpha 2 \beta 1$  ( $\text{GPIa-IIa}$ ,  $\text{CD 49b/CD 29}$ ). Цей інтегрин експонується в значній кількості (від 2 до 4 тисяч молекул на тромбоцит). Під час активації тромбоциту  $\alpha 2 \beta 1$  переходить в активований стан, що супроводжується конформаційними змінами в області I-домену  $\alpha 2$  субодиниці. Вважають, що первинний контакт з колагеном відбувається завдяки рецептору  $\text{GPVI}$ , але стійка колагенова адгезія можлива лише за умови залучення активованої форми  $\alpha 2 \beta 1$  [135]. Інтегрин  $\alpha \text{V} \beta 3$  представлений на поверхні тромбоцита в невеликій кількості

(приблизно 100-200 молекул на тромбоцит). Його роль до кінця не визначена. Було знайдено, що окрім вітронектина цей інтегрин здатен зв'язувати остеопонтін – глікопротеїн, що експонується на поверхні атеросклеротичних бляшок та ушкоджених артерій. Активовані тромбоцити приєднують остеопонтін виключно завдяки  $\alpha V \beta 3$  [136]. Інтегрини  $\alpha 5 \beta 1$  та  $\alpha 6 \beta 1$  забезпечують адгезію тромбоцитів відповідно до фібронектину та ламініну. Існує твердження, що ці інтегрини виступають в ролі доповнюючих компонентів у разі адгезії тромбоцитів до ушкоджених судин [137]. Роль інтегринів  $\alpha L \beta 2$  та  $\alpha M \beta 2$  в адгезії та активації тромбоцитів не виявлена. Однак, є повідомлення, що ці інтегрини здатні модулювати каспазну активацію і тривалість життя мишиних тромбоцитів [138]. Інтегрин  $\alpha IIb \beta 3$  представлений на поверхні тромбоцита найбільшою кількістю копій, 50-80 тисяч молекул на тромбоцит [139].  $\alpha IIb$  складається з двох ланцюгів – важкого (105кДа) та легкого (25 кДа), які зв'язані між собою дисульфідним зв'язком.  $\beta 3$  – одноланцюговий протеїн з молекулярною масою 95 кДа [140]. Вважають, що для інтегрину  $\alpha IIb \beta 3$  головним адгезивним лігандом, що забезпечує агрегацію тромбоцитів, є фібриноген, хоча була показана здатність цього інтегрину приєднувати інші молекули, а саме –фібронектин, тромбоспондин та вітронектин [141].

### 1.5. Загальна характеристика лігандів інтегрину $\alpha IIb \beta 3$

Головні адгезивні ліганди інтегрину  $\alpha IIb \beta 3$  – фібриноген, фактор фон Віллебранда, фібронектин, вітронектин та тромбоспондин. Всі означені протеїни входять до складу екстрацелюлярного матриксу і їх взаємодія з інтегрином підтримує ефективну агрегацію тромбоцитів. Кожен з лігандів здатен утворювати зв'язок якнайменш ще з одним рецептором на поверхні

клітин. Так, наприклад, фібриноген здатен зв'язуватися з інтегринами  $\alpha V\beta 3$  [142] та  $\alpha 5\beta 1$  [143].

Серед лігандів інтегрину  $\alpha IIb\beta 3$  найкраще за інші було охарактеризовано фібриноген. Цей протеїн є димером, що складається з трьох пар поліпептидних ланцюгів, які позначаються як  $A\alpha$ ,  $B\beta$  та  $\gamma$ -ланцюги (Рис. 1.6)

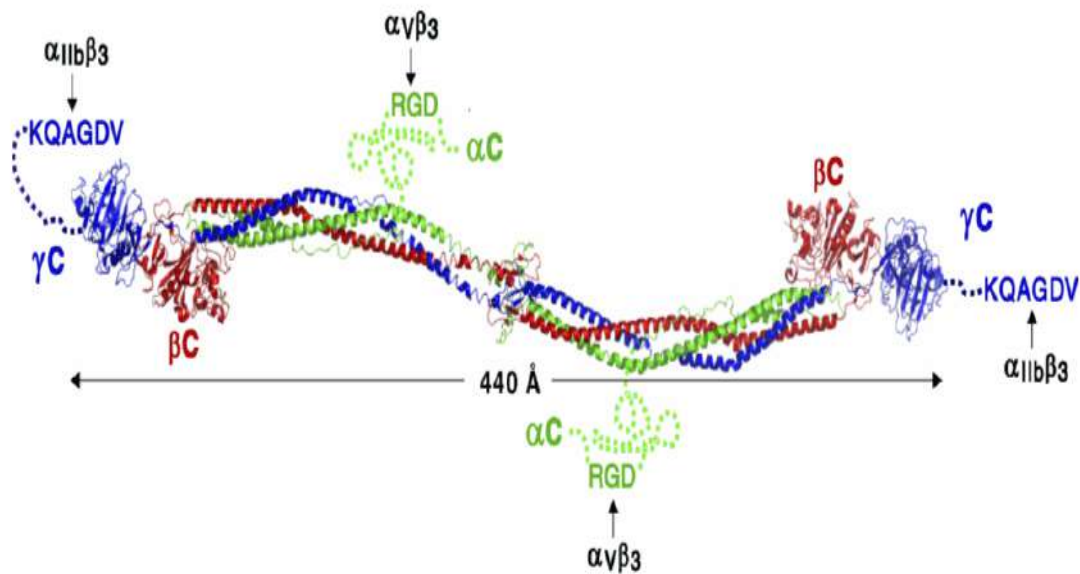


Рис.1.6. Схематична структура фібриногену.

[144]

Симетрична бівалентна структура фібриногенової молекули забезпечує ефективний зв'язок з двома молекулами інтегрину  $\alpha IIb\beta 3$ . Утворення такого комплексу є основою для тромбоцитарної агрегації. Зв'язок фібриногену з інтегрином  $\alpha IIb\beta 3$  залежить від наявності дивалентних катіонів і на першій стадії утворення є оборотнім. Далі відбувається його стабілізація і зв'язок стає необоротним [145]. Процесу стабілізації сприяють багато факторів серед яких відзначають ліганд-індуковані зміни в структурі рецептора, цитоскелетні перебудови [146] та асоціація фібриногену з іншими адгезивними лігандами, наприклад, тромбоспондином [147]. Знайдено три

сайти в кожній молекулі фібриногену, що залучені до зв'язку з  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ : дві послідовності RGD, що знаходяться в  $\alpha$ -ланцюзі, та додекапептидна послідовність HHLGGAKQAGDV, яка розташована поблизу С-кінця  $\gamma$ -ланцюга [148]. Було визначено, що первинним сайтом для зв'язку з інтегрином виступає саме додекапептидна послідовність [149]. Слід відзначити, що хоча ця послідовність знайдена лише в структурі фібриногена, пептиди на її основі інгібують зв'язок інших адгезивних лігандів з інтегрином  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  [150]. На базі двох вищезначених послідовностей були побудовані пептиди, які блокували зв'язок фібриногена з  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ , але цікаво, що природні інгібітори цього інтегрину, наприклад, компоненти зміїної отрути, та розроблені фармацевтичні препарати є в більшості випадків імітацією RGD-послідовності.

Широко відомий ліганд інтегрину  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  – фактор фон Віллебранда. Цей фактор виступає в ролі зв'язуючого агенту між компонентами судинної стінки та тромбоцитами або між тромбоцитами [151]. Зв'язок фактору фон Віллебранда з  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  відбувається за наявності конформаційних змін в структурі інтегрину. Такі зміни виникають завдяки передачі сигналу після утворення первинного зв'язку між фактором фон Віллебранда та глікопротеїном Ib на поверхні тромбоцита. Фактор фон Віллебранда містить у своєму складі упорядковані субодиниці, кожна з яких має молекулярну масу приблизно 275 кДа. Зріла субодиниця містить 2050 амінокислотних залишків.

До утворення міжтромбоцитарних контактів за участю інтегрину  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  може також залучатися тромбоспондин – гомотримерний глікопротеїн з молекулярною масою 450 кДа. Кожна субодиниця тромбоспондину складається з N- та С-кінцевих глобулярних доменів, проколагенового домену, трьох пропердин-схожих доменів (тромбоспондинові повтори першого типу), трьох EGF-гомологічних доменів (повтори другого типу) та семи повторів третього типу (рис. 1.7).



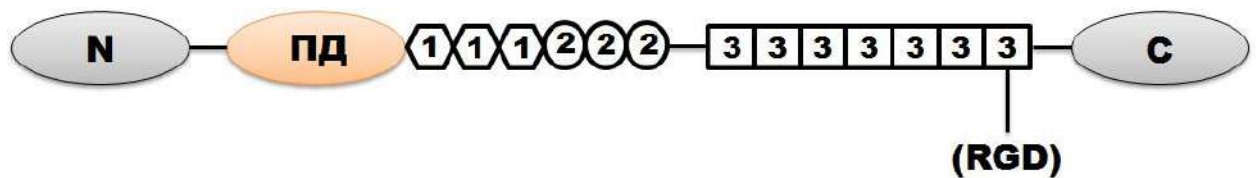


Рис. 1.7. Схематичне зображення мономеру тромбоспондину-1:

N – N-термінальний глобулярний домен, ПД – проколагеновий домен, C – C-кінцевий глобулярний домен. 1 – тромбоспондинові повтори першого типу, 2 – EGF-гомологічні домени (повтори другого типу), 3 – тромбоспондинові повтори третього типу.

N-кінцевий домен підлягає розщепленню протеїназами (тромбіном, плазміном, катепсином G, еластазою, трипсином та хімотрипсином). Цей домен забезпечує зв'язок тромбоспондину з фібриногеном та інтегринами  $\alpha 3 \beta 1$ ,  $\alpha 4 \beta 1$ ,  $\alpha 6 \beta 1$  та  $\alpha 9 \beta 1$ . Регіон тромбоспондинових повторів першого типу містить сайт для зв'язування фібронектину, фібриногену та плазміногену. Проколагеновий домен та тромбоспондинові повтори першого типу – це сайти для зв'язування тромбоцитарного рецептора тромбоспондина CD36. Вважають, що цей рецептор грає важливу роль в період експонування тромбоспондину на поверхні активованих тромбоцитів [152]. Інший рецептор тромбоспондину – CD 47 (протеїн, асоційований з інтегрином) зв'язується з молекулою тромбоспондину в цитоплазматичному регіоні [153]. В районі послідовності тромбоспондинових повторів третього типу було визначено послідовність RGD, яка є сайтом для зв'язування інтегринів  $\alpha II \beta 3$  та  $\alpha V \beta 3$ . Доступність послідовності RGD і, відповідно, адгезивні властивості тромбоспондину залежать від концентрації іонів кальцію та дисульфідних зв'язків. Як було показано в роботі [154] контрольоване відновлення дисульфідних зв'язків в молекулі тромбоспондину за допомогою дитіотреїтолу підвищувало RGD-залежні адгезивні властивості.

Стосовно зв'язку тромбоспондину з  $\beta 3$ -інтегринами вченими були отримані суперечливі дані. В роботі Lawler J. and Hynes R.O. [155] було

показано, що комплекси інтегринів  $\alpha\text{II} \beta 3$  та  $\alpha\text{V} \beta 3$ , які були виділені з мембрани тромбоцитів, утримуються на колонці з тромбоспондин-сефарозою. Це зв'язування специфічно інгібувалось пептидом GRGDSP. Але інші дослідники [156] не виявили взаємодії між тромбоспондином та інтегрином  $\alpha\text{II} \beta 3$ . Моноклональні антитіла до інтегрину  $\alpha\text{II}\beta 3$ , 10 E5 інгібували зв'язування тромбоспондину з поверхнею активованих тромбоцитів на 94%, в той час як інші антитіла до цього інтегрину (AP-2) не мали ефекту. Було зроблено припущення, що антитіла 10 E5 блокували сайти зв'язування фібрoneктину та фібриногену (обидва протеїни є лігандами тромбоспондину) з інтегрином  $\alpha\text{II} \beta 3$ . Це припущення узгоджується з таким фактом, що антитіла AP-2 інгібували на 85% зв'язування екзогенного фібриногену з інтегрином  $\alpha\text{II} \beta 3$ , але не заважали експонуванню на тромбоцитарній мембрані ендogenous фібриногену за умов тромбінової активації.

Важливим моментом є участь тромбоспондину в утворенні міжтромбоцитарних зв'язків під час агрегації цих клітин. Автори роботи [152] запропонували модель, згідно якої можливі два варіанти для участі тромбоспондину при формуванні міжтромбоцитарних контактів. Перший варіант – на поверхні активованих тромбоцитів експонується інтегрин  $\alpha\text{II} \beta 3$ , який зв'язується з фібриногеном, а той, в свою чергу з тромбоспондином. Якщо така триада утворилася на мембранах сусідніх тромбоцитів, що підлягають агрегації, то між молекулами тромбоспондинів з кожного боку утворюється зв'язок. Другий варіант – на поверхні активованих тромбоцитів завдяки рецепторам CD 36 або CD 47 відбувається експонування тромбоспондину, між тромбоспондинами сусідніх тромбоцитів формується контакт.

Іншим адгезивним лігандом інтегрину  $\alpha\text{II} \beta 3$  є фібрoneктин. Цей протеїн є димером з молекулярною масою 250 кДа. В значній кількості він знаходиться в плазмі (230-650  $\mu\text{g/ml}$ ), але його також знайдено в складі екстрацелюлярного матрикса та в  $\alpha$ -гранулах тромбоцитів. Кожна з

субодиниць димера складається з трьох типів повторюваних модулів, які визначають в науковій літературі як фібронектинові повтори FN 1, FN 2 та FN 3 (Рис.1.8). Модулі складають близько 90% всієї амінокислотної послідовності фібронектинової субодиниці, крім цього є конекторні (зв'язуючі) послідовності та варіабельна послідовність V, яка не має гомології з іншими частинами фібронектинової молекули. Кожен з FN 1 модулів складається з 45 амінокислотних залишків, FN 1 – приблизно з 60 амінокислотних залишків та FN 3 – приблизно з 90. Фібронектинові модулі входять до складу багатьох протеїнів тваринного походження. Так, повтори FN 1 поширені серед протеїнів хордових, повтори FN 2 мають схожість з крингловими доменами та зустрічаються у складі протеїнів хребетних тварин, а повтори FN 3 присутні в багатьох протеїнах екстрацелюлярного матриксу, поверхневих клітинних рецепторах та цитоскелетних протеїнах. До речі, адгезивний протеїн N-CAM1, який розглядається в роботі теж має у своєму складі фібронектинові повтори третього типу. У складі фібронектинових повторів третього типу знаходиться послідовність RGD, що забезпечує зв'язок фібронектину з інтегринами.



агрегації навіть за відсутності фібриногену або фактору фон Вілебранда, або обох [161]. На основі проведених експериментів WangY та співавтори [160] показали, що саме фібронектин відповідає за формування адгезивних зв'язків між тромбоцитами та ушкодженим ендотелієм в умовах гіпофібриногенемії. З іншого боку, було показано, що виснаження пулу фібронектину плазми за умов відсутності фібрину підсилює тромбоцитарну агрегацію. Механізм, завдяки якому, відбувається таке переключення функціональної ролі фібронектину залишається невиявленим [160].

Якщо роль фібриногену, тромбоспондину та фібронектину у забезпеченні ефективної агрегації тромбоцитів є більш-менш з'ясованою, то роль вітронектину залишається предметом дискусій.

Вітронектин – один з основних адгезивних протеїнів в циркулюючій плазмі, він водночас є компонентом альфа-гранул тромбоцитів та складовим екстрацелюлярного матриксу [162, 163]. В системі гемостазу його розглядають як прокоагулянтний фактор. Зниження рівня вітронектину плазми спостерігають у хворих з цирозом печінки, а якщо вітронектин відкладається на стінках судин, то це – ознака атеросклерозу [164]. Особливість вітронектину – утворення комплексів з інгібітором активатора плазміногена 1 типа (ПАІ-1), саме в комплексі з вітронектином існує активна форма цього інгібітора, яка є важливою для клінічної діагностики [165]. Існує думка, що вітронектин теж має діагностичне значення, є рекомендації розглядати його як протеїн гострої фази [162].

Вітронектин людини циркулює в крові у вигляді двох ізоформ – дволанцюгової (65 та 10кДа) та одноланцюгової (75 кДа). Вважають, що дволанцюгова ізоформа утворюється внаслідок дії невідомої протеїнази, яка розщеплює зв'язок Arg 379-Ala 380 в молекулі вітронектину. При цьому фрагменти 65 та 10 кДа залишаються разом завдяки дісульфідному зв'язку [166].

Ген вітронектину складається з восьми екзонів та семи інтронів, альтернативного сплайсінгу для вітронектина не виявлено. Зріла молекула,

яка утворюється після відокремлення сигнального пептиду, має 459 амінокислотних залишків (а.з.) [167]. В структурі вітронектину виділяють декілька складових.

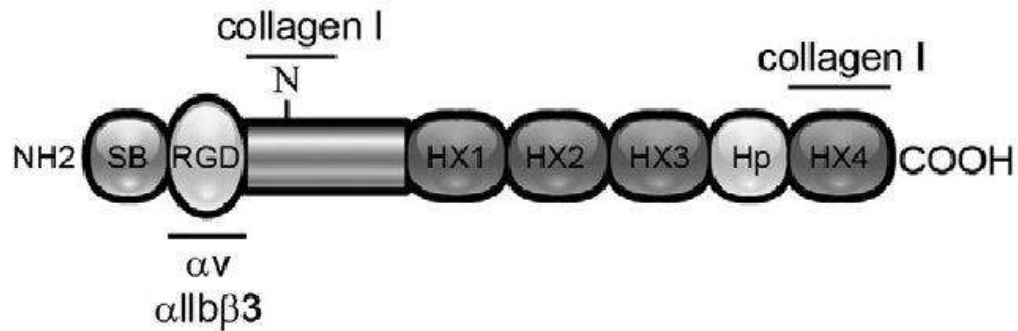


Рис. 1.9. Схематичне зображення структури вітронектину.

SB – соматомедин схожий домен, HX – гемопексинові повтори, HP – сайт для зв'язку з гепарином.

Першим іде N-кінцевий соматомедин схожий домен (SB), який складається з 44 а.з. Соматомедин існує як самостійний протеїн, він був виділений з сироватки людини та охарактеризований у 1996 році [168]. SB відповідає за зв'язок вітронектину з урокіназним рецептором та інгібітором активатора плазміногена ПАІ-1. Цей домен знаходять у складі інших протеїнів, наприклад у складі фактора стимуляції мегакаріоцитів, але здатність зв'язувати ПАІ-1 притаманна саме вітронектиновому SB [169]. У складі SB є вісім залишків цистеїну, які пов'язані між собою дисульфідними зв'язками. Ці залишки мають консервативне розташування у всіх видів ссавців та грають важливу роль у стабілізації SB. Якщо відбувалось відновлення S-S зв'язків, то вітронектин втрачав здатність приєднувати ПАІ-1 [162]. За першим доменом знаходиться послідовність RGD. Ця тріада зустрічається у складі багатьох адгезивних протеїнів (тромбоспондина, фібронектина, фактора фон Вілебранда та ін.) і є необхідною для зв'язку адгезивних лігандів з інтегриновими рецепторами [170].

Ці вищезначені домени є важливими при розгляді зв'язку ПАІ-1 з вітронектином на поверхні мембрани тромбоцитів [171, 172]. Відомо, що ПАІ-1 знаходиться в тромбоцитах у складі альфа-гранул в комплексі з вітронектином [173, 174]. З використанням електронної мікроскопії та ФІТЦ-мічених протеїнів було показано, що після активації тромбоцитів та вивільнення вмісту альфа-гранул відбувається посадка цього комплексу на тромбоцитарну мембрану [175]. Було встановлено, що вітронектин здатен утворювати зв'язок з віментином, який експонується на поверхні активованих тромбоцитів. В експериментах з іммобілізованими протеїнами було встановлено, що константа зв'язку іммобілізованого вітронектина з ПАІ-1 складала  $1,9 \times 10^{-7}$  М. Якщо іммобілізували ПАІ-1, то значення константи зв'язку було  $5,5 \times 10^{-8}$  М. На підставі цих даних було зроблено припущення, що в структурі вітронектину існує не менш двох сайтів для зв'язку з ПАІ-1, один з яких, що знаходиться у складі ССД, стає закритим після іммобілізації [176]. Таким чином, вважають, що взаємодія ПАІ-1 з ділянкою ССД вітронектина певною мірою інгібує інтегрин-обумовлену клітинну адгезію. Можливо це відбувається через стеричні перешкоди [171, 177].

За ділянкою RGD знаходиться сайт з високим вмістом глутамінової кислоти (Glu 53-Glu 64). Цей сайт – місце для сульфатування вітронектинової молекули (залишки Tyr 56 та Tyr 59). Вважають, що саме в цьому сайті відбувається приєднання комплексу тромбін-антитромбін III [178]. Далі знаходиться місце дії трансглутаминази (вона забезпечує зшивку вітронектинової молекули) та колаген-зв'язуючий домен. За цим доменом розташовані гемопексин подібні повтори (амінокислотні залишки з 132 по 459). Гемопексин – це глікопротеїн плазми, що бере участь у транспортуванні гема. В гемопексині плазми кожен з двох доменів складається з чотирьох гомологічних повторів. Гемопексинові повтори вітронектина – це місця для приєднання гепарину (амінокислотні залишки з 82 по 137 та з 175 по 219) [179]. Але головною ділянкою зв'язування глікозаміногліканів вважають сайт з високим вмістом лізину та аргініну

(амінокислотна послідовність Ala 341-Ala 380). Тут окрім гепарину приєднуються колаген, остеонектин, ПАІ-1 та плазміноген/плазмін.

При дослідженні впливу вітронектину на функціональний стан тромбоцитів було знайдено деякі особливості. Показано, що вітронектин інгібує АДФ та тромбін-індуковану агрегацію тромбоцитів. Було зроблено припущення, що він перешкоджає ефективному зв'язку фібриногена з інтегрином  $\text{PbIIIa}$ , оскільки обидва адгезивних ліганда (вітронектин та фібриноген) використовують для взаємодії з інтегрином послідовність RGD [180]. Пізніше було встановлено, що АДФ та тромбін-індукована агрегація тромбоцитів пригнічується антитілами до вітронектина. Тобто він – необхідний компонент ефективної агрегації [181]. Такого протиріччя можна уникнути, якщо взяти до уваги, що були задіяні дві різні форми вітронектину. Було знайдено, що вітронектин плазми існує у вигляді мономерної малоактивної форми, а тромбоцитами секретується активна мультимерна форма. Ліганд-зв'язуючі сайти приховані у складі мономерної форми, але вони стають доступними після дії певних індукторів (гепарин, ПАІ-1, комплекс тромбін-антитромбін та ін.) [182]. З використанням набору антитіл чутливих до зміни конформації та синтетичних пептидів були отримані докази того, що при переході від мономерної до мультимерної форми зміни в молекулі вітронектину відбуваються в області С-кінцевого гепарин-зв'язуючого домену (Ala 341-Ala 380) та в домені збагаченому залишками аспарагінової та глутамінової кислоти (Glu 53-Glu 64) [183]. Було зроблено припущення, що головну роль в стабілізації вітронектинових мультимерів грають іонні взаємодії, хоча не виключають також певний внесок гідрофобних зв'язків [184]. Мультимерна форма характерна для вітронектину, що знаходиться у складі екстрацелюлярного матриксу та для вітронектину, що секретується з альфа-гранул під час активації тромбоцитів. Як зазначалося раніше, мультимерна форма тромбоцитарного вітронектину здатна утворювати зв'язки з багатьма лігандами серед яких значиться і плазміноген.



### 1.6. Екстрацелюлярні анексини у забезпеченні протеїн-клітинних взаємодій

Анексини розглядають як родину кальцій-залежних протеїнів, що з високою специфічністю зв'язуються з фосфоліпідами. Структура цих протеїнів має декілька спільних рис [185]. У складі молекули анексинів виділяють N-кінцевий варіабельний домен та С-кінцевий коровий домен, що складається з чотирьох гомологічних доменів, кожен з яких має приблизно 70 амінокислотних залишків (рис.1.10). В гомологічних доменах знаходяться кальцій-зв'язувальні ділянки (KGXGT – 38 амінокислотних залишків - D/E), сайти зв'язування гепарину, фосфоліпідів та F-актину. N-кінцевий домен містить сайти посттрансляційної модифікації та міжпротеїнової взаємодії. Було показано, що саме цей домен забезпечує стабільність структури усієї молекули протеїну [186]. Для екстрацелюлярних анексинів А2 та А5 показана можливість взаємодії з вуглеводами, а саме глікозаміногліканами. Функціональне значення такої взаємодії залишається невизначеним [187, 188].

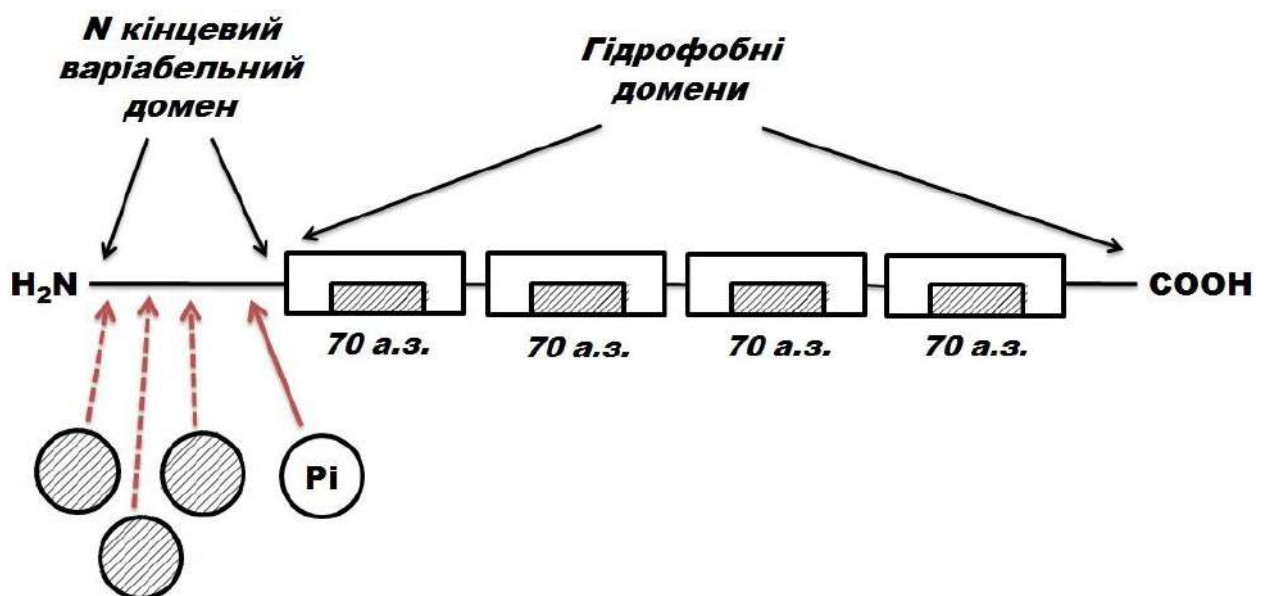
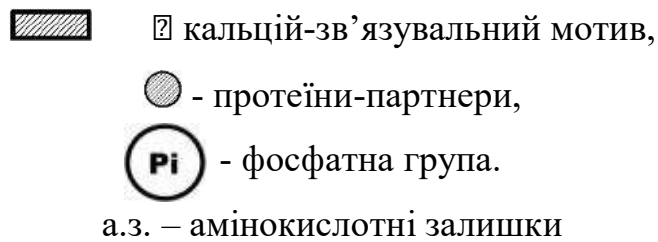


Рис. 1.10. Схематичне зображення структури анексинових протеїнів:



Анексини беруть участь у регуляції багатьох функцій, таких як екзоцитоз, ендоцитоз, іонний транспорт через мембрани, реорганізація мембран, окисно-відновні процеси, судинний транспорт та інгібування процесу згортання крові [189, 190]. Анексини не мають сигнальної послідовності, яка б дозволяла їм потрапляти з клітин через секреторні шляхи, тому їх поява в кров'яному руслі здебільшого пов'язана з апоптозом або патологічним станом тканин [191]. Так, при нестабільній стенокардії вміст анексину A5 в плазмі крові сягає  $4,96 \pm 0,22$  нг/мл, при гострому інфаркті міокарда –  $6,13 \pm 1,02$  нг/мл, тоді як в нормі – лише  $0,89 \pm 0,11$  нг/мл [191]. Проте, для деяких анексинів (A1, A2 та A5) показана екстрацелюлярна активність. Екстрацелюлярний анексин A5 виступає як антикоагулянт у плаценті, анексин A2 – як ендотеліальний рецептор для тканинного активатора плазміногену та плазміногену, а анексин A1 – як протизапальний агент [192, 193, 194].

Завдяки особливостям своєї будови та функціональному навантаженню анексини розглядаються як перспективні інструменти для діагностики. Є повідомлення, що агенти синтезовані на базі анексинів діють як маркери апоптозу [195, 196, 197]. Підвищений рівень анексину A5 спостерігається у пацієнтів з хронічною та гострою нирковою хворобою [198], а у людей з тяжкими серцевими захворюваннями високий рівень цього анексину в плазмі свідчить про наявність деструктивних процесів у органах [199, 200]. Анексин A5 розглядають також як потенційний маркер деяких пухлин [201]. До того ж, анексини можна розглядати в якості терапевтичних агентів. На базі анексину A 5 був синтезований препарат діанексин, який здатен зв'язувати

фосфатидилсерин з високою афінністю (0,16 нМ) [202]. Було показано, що введення діанексину призводило до інгібування формування тромбу і зменшення накопичування фібрину за умов експериментального тромбозу на моделях щурів та кролів. Анексин А5 пропонують для лікування пацієнтів з серповидно-клітинною анемією [203] та дифузною лімфомою В-клітин [204].

Завдяки тому, що екстрацелюлярні анексини діють як поверхневі протеїни, вони грають певну роль у забезпеченні протеїн-клітинних взаємодій. Так, анексини здатні зв'язуватись з фосфатидилсерином (ФС), який експонується на поверхні активованих тромбоцитів та ендотеліальних клітин [205]. Механізм зв'язування анексину А5 з мембраною тромбоцита, стимульованого тромбіном представлено на рис. 1.11. Досліди проведені Dorman D et al. показали, що для експонування фосфатидилсерину на зовнішній мембрані тромбоциту і для відповідного зв'язування анексину А5 критичними є такі події: зв'язок тромбіну з GP Ib, активація тромбіном рецепторів PAR-1, утворення міжтромбоцитарного контакту та наявність активної форми інтегрину  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  [206]. Водночас, фактор Вілебранда не залучається до формування прокоагулянтної поверхні тромбоциту і зв'язок інтегрину  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  з фібриногеном теж не є необхідною умовою для цього процесу. Блокування GP Ib або інтегрину  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  за допомогою специфічних антитіл зменшувало ефективність формування прокоагулянтної поверхні на 50% для кожного з вищезначених рецепторних протеїнів. Активація відповідних рецепторів приводила до збільшення концентрації внутрішньоклітинного кальцію та активації скрамблази, яка є необхідним компонентом для експонування фосфатидилсерину на зовнішній мембрані за flip-flop механізмом.

ФС полегшує збирання та активацію теназного та протромбіназного комплексів [207]. Зв'язування анексину А5 з ФС призводить до формування «антикоагулянтного щита» на клітинній мембрані [208]. Анексин А5 вважається головним анексином тромбоцитів людини [Ramstrom, 2010] і його зв'язування з цими клітинами є досить специфічним ( $K_d = 7\text{nM}$ ) [209]. Було

показано, що кожен тромбоцит має приблизно 5000 сайтів для зв'язування анексину А5. Ця кількість може значно збільшуватися (до 40 разів) під час стимуляції тромбоцитів тромбіном. Обробка фосфоліпазою С або додавання препаратів фосфоліпази до суміші тромбоцитів призводило до інгібування зв'язування анексину А5 [210].

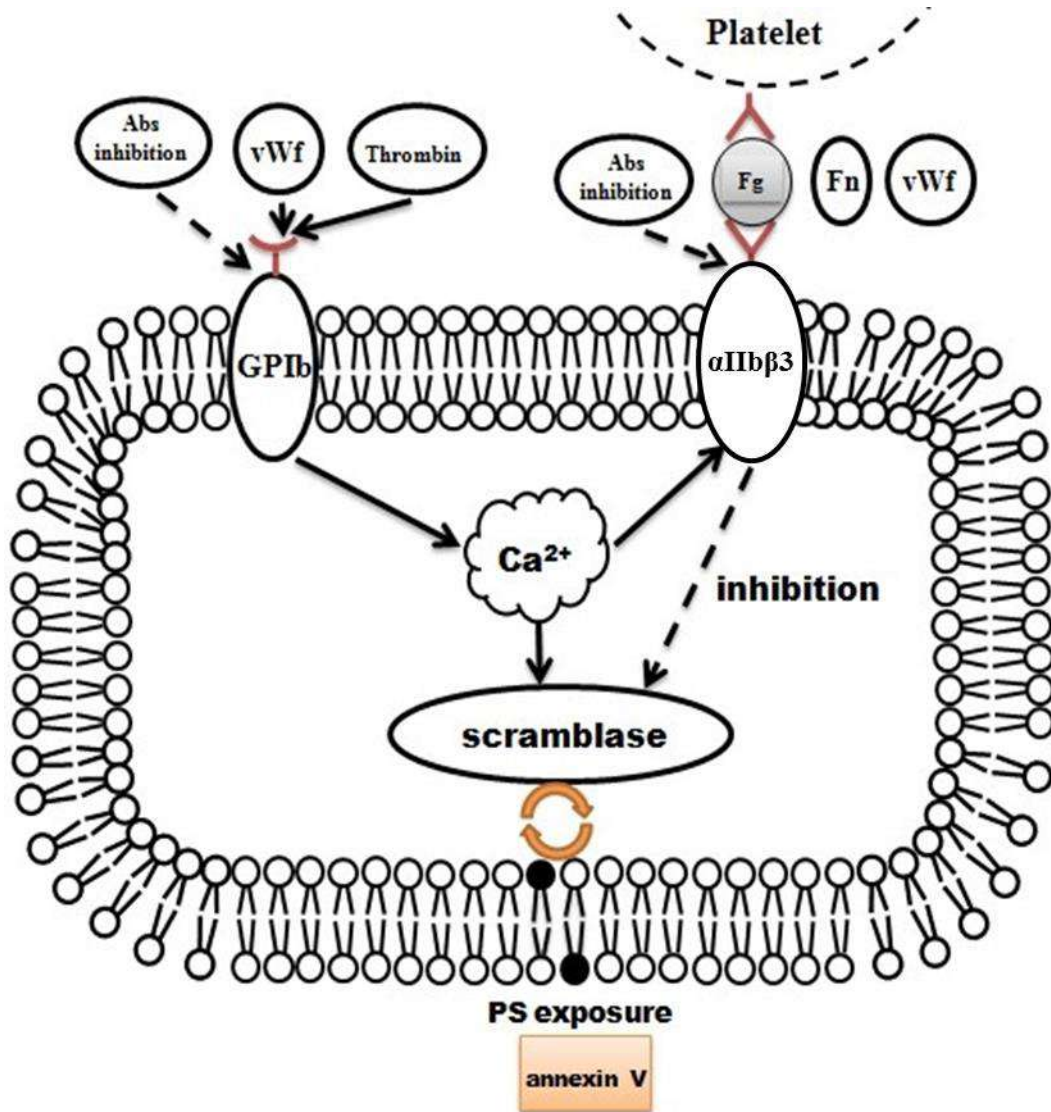


Рис. 1.11 Утворення прокоагулянтної поверхні тромбоцитів за умов тромбінової стимуляції.

[211]

Fg – фібриноген, Fn – фібрoneктин, vWf – фактор фон Віллебранда, PS – фосфатидилсерин.

Анексин А5 зв'язується також на апоптичних тромбоцитах, адже за умов апоптозу на поверхні клітин експонується ФС завдяки участі каспаз та

кальпаїнів [212]. Апоптоз тромбоцитів може бути викликаний дією тромбіну, який відомий як стимулюючий агент. Слід зауважити, що тромбоцити, які зберігаються протягом декількох днів, також стають ФС-позитивними [213]. Таким чином, щоб розрізнити активацію тромбоцитів та зміни, викликані апоптозом, рекомендовано додатково визначати інших біологічні маркери цих процесів [214]. Цікавим є вплив екстрацелюлярного анексину А5 на зв'язування плазміногену з клітинами крові. За умов апоптозу плазміноген значно підсилює експонування ФС на поверхні плазматичної мембрани моноцитів та нейтрофілів (так, у разі моноцитів експонування ФС зростало у 12,5 разів). Підвищене експонування ФС призводило до кращого зв'язування плазміногену з клітинами [215]. Виявлений ефект автори роботи пояснюють експонуванням гістону H2В на поверхні моноцитів під час апоптозу. Зазначений гістон має окремі сайти зв'язування плазміногену та ФС. Екзогенний анексин А5 конкурує з гістоном H2В за сайти зв'язування з ФС і таким чином перешкоджає взаємодії плазміногена з клітинами.

В наших експериментах ми дослідили вплив різних форм плазміногену (Glu- та Lys-) на експонування ФС на поверхні тромбоцитів людини за умов їх активації тромбіном та колагеном [216, 217].

### **1. 7. Плазміноген/плазмін та його роль во взаємодіях клітина-матрикс та міжклітинних взаємодіях**

Плазміноген/плазмінова система забезпечує розчинення фібринових згустків та підтримує гемостатичний баланс крові. Окрім цього було показано, що компоненти цієї системи беруть участь в ремоделюванні тканин, ангіогенезі, процесі запалення та інвазії пухлинних клітин [218, 219]. Нещодавно в науковій літературі з'явилося твердження, що плазміноген може виконувати роль адгезивного ліганду для інтегринових рецепторів, зокрема  $\alpha_M \beta_2$  та  $\alpha_5 \beta_1$  [8].

Циркулюючий в плазмі плазміноген, зимоген протеїнази плазміну, є одноланцюговою молекулою з молекулярною масою 92 кДа. Зріла молекула складається з 791 амінокислотного залишку та стабілізована 24 дисульфідними зв'язками. Плазміноген – це глікопротеїн, глікозилування відбувається по залишкам Ser 248, Thr 346 та додатково по Asn 289. Слід зауважити, що наявність останнього олігосахаридного залишку зменшує афінність плазміногену до фібрину та  $\alpha$ -2-антиплазміну [220]. Концентрація проензиму в плазмі крові становить близько 0,2 мг/мл (1,6 мкМ), а час напівжиття – близько 2,2 доби [221]. Молекула плазміногену має таку будову: N-кінцевий фінгер-домен (або PAN/Apple domain), за яким розташовані п'ять кринглових доменів (K1-K5), з'єднаних між собою шарнірними ділянками, та серинпротеїназний домен, в якому знаходиться каталітична тріада амінокислотних залишків His603, Asp646 та Ser741 [222]. Методом рентгеноструктурного аналізу показано, що при формуванні закритої конформації Glu-плазміногену домени згруповані у ромбоподібну структуру [223, 224]. Така конформація стабілізується за рахунок взаємодій фінгер-домену з п'ятим кринглом (Рис. 1.12).

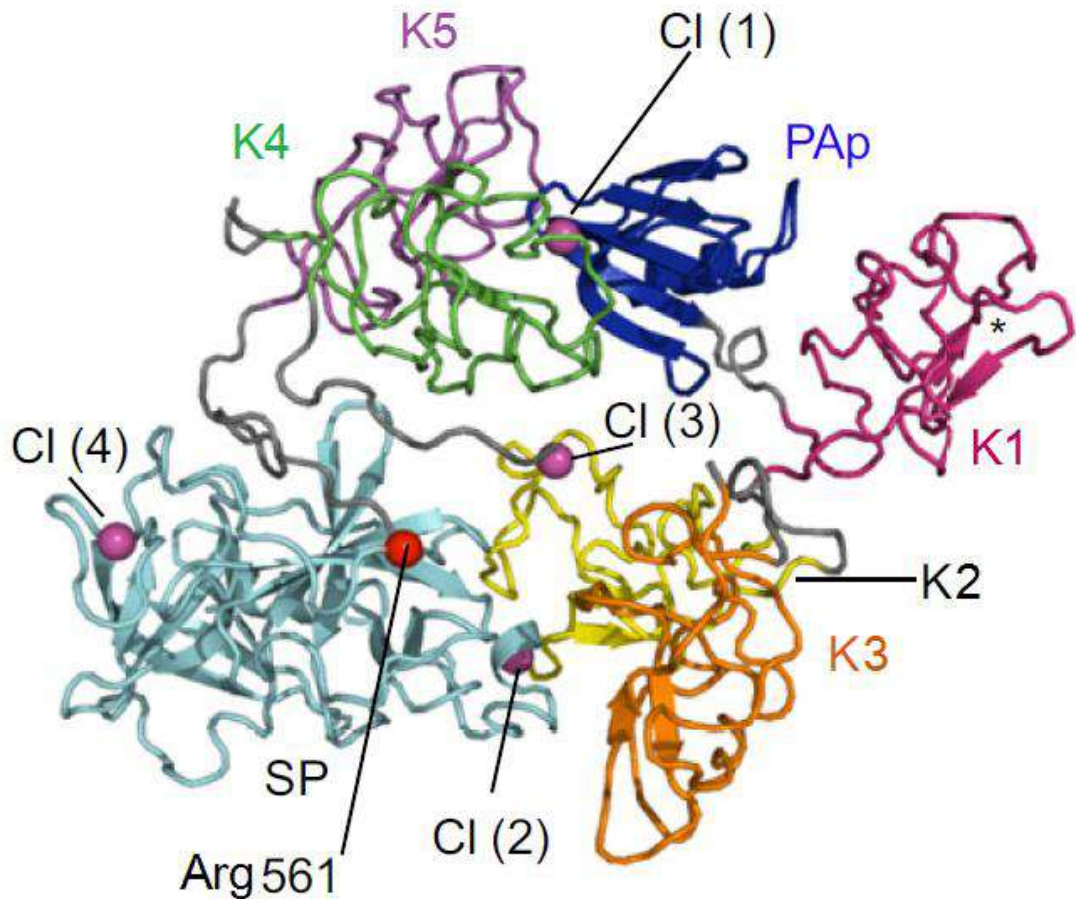


Рис. 1.12. Просторова структура молекули Glu-плазміногену.

Домени позначені кольором: PAr (фінгер-домен) – синій; K1 – рожевий; K2 – жовтий; K3 – оранжевий; K4 – зелений; K5 – фіолетовий; SP(серинпротеїназний домен) – блакитний; Arg561 – залишок аргініну у складі активаційної петлі; \* – лізинзв'язуючий сайт у складі K1; Cl(1-4) – іони хлору [223].

Скорочена форма проензиму (Lys-плазміноген) утворюється завдяки гідролізу плазміном пептидного зв'язку Lys77-Lys78 (рідше Lys78-Val79, Arg68-Met69) та відщеплення фінгер-домену [225]. Ця форма проензиму характеризується відкритою конформацією та відрізняється від повнорозмірної молекули за кінетичними параметрами зв'язування і активації. Він виявляє більш високу спорідненість до фібрин(оген)у, ніж Glu-плазміноген, а також більш ефективно розщеплюється активаторами [226,

227]. Кринглові домени плазміногену мають високий ступінь гомології між собою і складаються приблизно з 80 амінокислотних залишків. Ці домени містять сайти для зв'язку лізину та його аналогів та відповідають за специфічне розпізнавання  $\alpha_2$ -антиплазміна, фібрину, клітинних рецепторів, протеїнів плазми та міжклітинного матриксу [228, 229, 230, 231]. Було показано, що лізин-зв'язуючі сайти (ЛЗС) плазміногену є важливими для виконання адгезивної функції, оскільки додавання 6-аміногексанової кислоти (6-АГК) унеможлиблювало зв'язок між І-доменом  $\alpha$ -субодиниці інтегрину  $\alpha_M \beta_2$  та Glu-плазміногеном [8]. Специфічність кринглових ЛЗС обумовлена точковими амінокислотними замінами у послідовності кожного з них. Просторову структуру ЛЗС розглядають як гідрофобну кишеню на поверхні кринглового домену, з одного боку якої знаходиться негативно заряджений аніонний центр, що представлений двома залишками аспарагінової кислоти (взаємодіє з  $\epsilon$ -аміногрупою Lys), а з іншого – позитивно заряджений катіонний центр, представлений двома залишками аргиніну (взаємодіє з  $\epsilon$ -карбоксильною групою Lys). Сама гідрофобна кишеня утворена залишками ароматичних амінокислот [232]. Така структура ЛЗС характерна для першого та четвертого кринглів, які виявляють високу спорідненість до 6-АГК. Вважають, що саме ці кринглові домени відіграють провідну роль при зв'язуванні плазміногену з С-кінцевими залишками Lys у складі клітинних рецепторів або з такими, що з'являються в ході плазмінового гідролізу протеїнових субстратів [223, 233]. В аніонному сайті ЛЗС третього крингла замість залишку Asp 311 знаходиться Lys. Цей залишок не тільки нейтралізує негативний заряд сайту, але входить у гідрофобну кишеню, частково її перекриваючи. Цим можна пояснити повну відсутність афінності третього кринглу до 6-АГК або С-кінцевим залишкам лізину [234]. Унікальність структури п'ятого кринглу полягає у відсутності катіонного центру, що виключає можливість його зв'язування з карбоксильною групою С-кінцевих залишків Lys. При формуванні закритої конформації Glu-плазміногену ЛЗС п'ятого кринглу забезпечує докінг N-кінцевого фінгер-домену за рахунок



взаємодії з інтегральними залишками лізину. Результати рентгеноструктурного аналізу показали, що в ході конформаційних перебудов всередині молекули Glu-плазміногену п'ятий крингл може відкриватися для взаємодії з позитивно зарядженими залишками амінокислот у поліпептидній послідовності субстратів або рецепторів на клітинній поверхні [235]. Наслідком такої взаємодії буде розгортання проензиму, що необхідно для його ефективної активації протеазами-активаторами. Також показано, що конформацію плазміногену здатні змінювати інші агенти, що виявляють афінність до кринглових доменів, а саме – 6-АГК, бензамідин, моноклональні антитіла проти K4 і K5, деякі протеїни плазми та позаклітинного матриксу (ламатин, тромбоспондин, тетранектин, актин) [236, 237]. Серинпротеїназний домен плазмін(оген)у утворений 240 амінокислотними залишками С-кінцевої частини молекули. Каталітична тріада активного центру His 603, Asp 646 та Ser 741 розміщена всередині негативно зарядженої поверхневої ділянки, яка оточена позитивно зарядженими полями – екзосайтами [238]. Протеїназний домен з'єднаний з крингловими доменами послідовністю, що містить активаційну петлю та цільовий пептидний зв'язок Arg 561-Val 562, внаслідок розщеплення якого відбувається активація зимогену. Активація плазміногену та активність утвореного плазміну знаходяться під контролем в організмі. Процес активації плазміногену полягає у ензиматичному розщепленні пептидного зв'язку Arg 561-Val 562 тканинним активатором або урокіназою. Внаслідок цього формується активний центр і утворюється ензим Glu-плазмін, що складається з двох ланцюгів: N-кінцевого важкого (А ланцюг) та С-кінцевого легкого (В ланцюг), з'єднаних між собою двома дисульфідними зв'язками. В ході автолізу Glu-плазмін відщеплює N-кінцевий фінгер-домен, даючи початок Lys-плазміну. Плазмін – це трипсиноподібний ензим з широкою специфічністю. Він гідролізує пептидні зв'язки, утворені карбоксильною групою Lys або Arg. Субстратами плазміну є цілий ряд протеїнів, однак в організмі дія цього ензиму є обмеженою [239]. Припускають, що саме

структурні особливості окремих доменів та конформаційна динаміка молекули плазмін(оген)у лежать в основі чіткої регуляції процесу активації проензиму. При цьому специфічні міжмолекулярні взаємодії за участю кринглових доменів молекули забезпечують локалізацію плазмінової активності на поверхні субстрату або на клітинній мембрані. Нещодавно було встановлено, що окремі крингльові фрагменти плазміногену, як от K1, K1-3, K2-3, K1-4, K5, можуть виконувати самостійні функції, які не властиві материнській молекулі протеїну. Такі фрагменти утворюються в плазмі крові та на клітинній поверхні під дією еластази нейтрофілів, матриксних металопротеїназ, калікреїну або за рахунок автолізу плазміну. Ці фрагменти виявляють антиадгезивні, протизапальні та антиангіогенні властивості. На базі цих властивостей вони отримали назву «ангіостатини» [240, 241]. Виявлення цих біологічно активних молекул та встановлення механізмів їх дії стало поштовхом для дослідження альтернативних функцій плазмін(оген)у, зокрема його участі у забезпеченні міжклітинних комунікацій та внутрішньоклітинному сигналінгу.

Рецептори плазміногену – це багаточисельна та різноманітна група молекул, що включає поверхневі та інтегральні протеїни плазматичної мембрани, а також деякі розчинні сполуки протеїнової та вуглеводної природи. Всі вони об'єднані здатністю специфічно, проте з низькою афінністю, зв'язувати плазміноген. До особливостей рецепторів плазміногену належить їх значна кількість на поверхні клітин ( $10^5$ - $10^7$  молекул/клітину) та неоднорідність, тобто на поверхні клітин одного типу може бути представлено кілька типів молекул, що відповідають за зв'язування проензиму. Рецептори плазміногена знайдені на поверхні всіх клітин крові за виключенням еритроцитів. Кількість плазміногенових рецепторів на поверхні тромбоцитів становить приблизно 37000 молекул/клітину та зростає у декілька разів після стимуляції тромбіном [242]. Обробка тромбоцитарної поверхні карбоксипептидазою В, що відщеплює С-кінцеві залишки Lys від мембранних протеїнів, призводить до зниження кількості експонованих

сайтів зв'язування [243]. Слід сказати, що деякі рецептори плазміногена експонуються лише на активованих або трансформованих клітинах. Актин, який зазвичай відсутній на зовнішній мембрані тромбоцитів, експонується на поверхні після активації тромбіном [244, 245]. Серед тромбоцитарних рецепторів плазміногена особливу увагу привертають інтегринові рецептори.

За думкою деяких авторів плазміноген сприяє адгезії клітин завдяки інтегринам, що експонуються на поверхні нейтрофілів та моноцитоїдних клітин [8]. Відомо, що Glu-плазміноген може накопичуватися на поверхні екстрацелюлярного матриксу. Показана його колокалізація з матриксними протеїнами – фібронектином, ламініном та фібриногеном [246, 247]. Вважають, що протеїни екстрацелюлярного матриксу формують альтернативну поверхню (відмінну від поверхні фібринового згустку) для збірки компонентів, які забезпечують перетворення плазміногену в плазмін. В досліджах *in vitro* було показано, що імібілізований Glu-плазміноген (саме така форма знайдена на поверхні екстрацелюлярного матриксу) підтримує адгезію нейтрофілів, моноцитоїдних клітин культури U937 та генетично трансформованих клітин ембріональної ниркової тканини культури U 239 завдяки його зв'язку з інтегринами  $\alpha M \beta 2$  та  $\alpha 5 \beta 1$  [8, 248]. Механізм такого явища остаточно ще не з'ясовано, але знайдено певні особливості інтегрин-плазміногенової взаємодії. По-перше, було показано, що в разі інтегрину  $\alpha M \beta 2$  ефективний вплив на адгезію клітин здійснює лише імібілізований Glu-плазміноген, в той час як Lys-плазміноген або плазмін виявилися неактивними. Пояснення було отримано з експерименту, в якому досліджували здатність N-кінцевого домену плазміногену, що містив послідовність перших 78 амінокислотних залишків, підтримувати адгезію клітин. Виявилося, що N-кінцевий фрагмент сприяв адгезії клітин, які експонують інтегрин  $\alpha M \beta 2$  на своїй поверхні. Було зроблено висновок, що фінгер-домен плазміногену містить у своєму складі  $\alpha M \beta 2$ -зв'язуючий сайт. Разом з тим, було показано, що транексамова кислота інгібувала адгезію клітин до імібілізованого плазміногену. Таким чином, лізин-зв'язуючі сайти

плазміногену також виявляються необхідними для ефективної адгезії. З іншого боку, у складі інтегринової молекули, була знайдена ділянка, що забезпечувала адгезивний зв'язок з боку інтегринового рецептора. Такою ділянкою виявився I-домен у складі субодиниці  $\alpha$ M. Адгезивний зв'язок плазміногену з інтегрином  $\alpha 5 \beta 1$  має свої особливості. Інтегрин  $\alpha 5 \beta 1$  забезпечує адгезивний зв'язок нейтрофілів, моноцитотічних та ендотеліальних клітин до протеїнів екстрацелюлярного матриксу, зокрема до фібронектину та фібриногену [249]. Більшість адгезивних лігандів приєднується до цього інтегрину завдяки амінокислотній триаді RGD. Проте у разі приєднання до фібриногену може спостерігатися RGD-незалежний зв'язок [250]. Оскільки в складі плазміногену теж немає RGD-послідовності, питання про плазміногеновий сайт для зв'язку з цим інтегрином залишається відкритим. Інтегрин  $\alpha 5 \beta 1$  здатен утворювати зв'язки як з імобілізованим, так і з «розчинним» плазміногеном, до того ж було показано, що на відміну від  $\alpha$ M  $\beta 2$ , цей інтегрин сприяє перетворенню плазміногену в плазмін на поверхні клітин культури U 937. Розглянуті події можуть бути прикладом взаємодії лейкоцитів або ендотеліальних клітин з протеїнами екстрацелюлярного матриксу. Що стосується впливу плазміногену на адгезивні властивості тромбоцитів, що опосередковані дією інтегринів, то в сучасній літературі такі дані практично відсутні. На поверхні тромбоцитів експонуються інтегрини  $\alpha$ M  $\beta 2$ ,  $\alpha$ V  $\beta 3$  та  $\alpha$ IIb $\beta 3$ . Як згадувалося раніше, інтегрин  $\alpha$ M  $\beta 2$  з'являється на поверхні лише активованих тромбоцитів, і дані про його функціональну роль на мембрані практично відсутні. Інтегрин  $\alpha$ V  $\beta 3$  представлений на тромбоцитах невеликою кількістю копій, його роль для тромбоцитів теж не висвітлена. Але слід сказати, що завдяки цьому рецептору ендотеліальні клітини здатні зв'язувати як плазміноген так і ангіостатини. Зв'язування плазміногену призводить до появи плазміну і, як наслідок, – до міграції ендотеліальних клітин, тоді як зв'язування ангіостатину є сигналом до припинення міграції [251].

Як згадувалося раніше, інтегрин  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  експонується на поверхні активованих тромбоцитів. Зв'язок фібриногена з цим інтегрином призводить до утворення міжклітинних містків, опосередкуючи агрегацію тромбоцитів. Було висунуто припущення, що тромбоцити можуть взаємодіяти з плазміногеном за  $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -залежним механізмом [252, 253]. Показано, що антитіла до сайту зв'язування фібриногену на молекулі інтегрину та етилендіамінотетраоцтова кислота (ЕДТО), хелатор іонів двовалентних металів (які необхідні для стабілізації структури  $\alpha\text{IIb}\beta 3$ ), ефективно блокують зв'язування як фібриногену так і плазміногену з тромбоцитами. RGD-вмісний пептид також запобігає зв'язуванню обох лігандів, хоча плазміноген не має такої послідовності у своєму складі. Проте слід зазначити, що в кровотоці комплекс плазміноген-фібриноген не утворюється. Прямі взаємодії плазміногену з субодиницями інтегрину  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  також не показано. Тому окреслюючи роль  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  та фібриногену, не виключають залучення інших мембранних та секреторних протеїнів у зв'язуванні плазміногену з тромбоцитами.

Таким чином, плазміноген може чинити певний вплив на адгезивні взаємодії, що опосередковані інтегринами, але точні механізми такого впливу і функціональне значення такого явища залишаються невисвітленими.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1 Реактиви та матеріали

У роботі було використано такі реактиви та матеріали: індуктори агрегації тромбоцитів – ADP (Fluka, Швейцарія), ристоміцин та колаген (Технологія-Стандарт, РФ), тромбін людини (Sigma-Aldrich, США); хромогенний субстрат плазміну – H-D-Val-L-Leu-L-Lys-*p*-нітроанлід·HCl (S 2251) (Chromogenix AB, Швеція); інгібітори ензимів - бичачий панкреатичний інгібітор трипсину апротинін (ін'єкційний препарат «Контривен», Біофарма, Україна), соєвий інгібітор трипсину, пара-нітрофенілгуанідинбензоат (p-NPGb), *n*-хлормеркурійбензоат натрію, бензамідин, лейпептин, фенілметилсульфоніл-флуорид, ванадат натрію виробництва Sigma-Aldrich, США; панкреатична еластаза свині, пепсин свині,  $\alpha$ -казеїн, актин м'язів бика (Sigma-Aldrich, США); етиленглікольтетраоцтова кислота (Sigma-Aldrich, США); сухе знежирене молоко (Carnation, США); електрофоретичні маркери молекулярної маси (Prestained Protein Ladder SM0671, Fermentas, Литва); хроматографічні сорбенти – BrCN-сефароза 4B, лізин-сефароза, сефадекси G-75, G-150 та DEAE-сефадекс A-25 (GE-Healthcare, США), мікротитраційні планшети (SARSTEDT, США), нітроцелюлозна мембрана (Amersham, Великобританія). Антитіла – кролячі антитіла проти актину та антитіла проти IgG кроля, кон'юговані з пероксидазою хрому – виробництва Sigma-Aldrich (США). Інші органічні сполуки та неорганічні речовини – Sigma-Aldrich (США), Хеликон (РФ) та вітчизняного виробництва категорії хч.

В роботі для дослідження експресії протеїнів клітинної адгезії N-CAM1 та N-кадгерину використовували тканини щурів лінії Вістар.

Використовували тканини скелетних та серцевих м'язів, головного мозку, печінки, легенів та нирок щурів на різних етапах розвитку – на перший, десятий, сороковий, двісті сороковий та сімсот тридцятий день постнатального розвитку.

Донорську кров умовно здорових чоловіків віком 20-24 роки одержували в рамках співпраці з Центром крові Головного військового клінічного шпиталю Міністерства оборони України. Донори були проінформовані і дали згоду на використання донорського матеріалу з дослідницькою метою. Фракція  $III_{2,3}$  плазми крові за Коном була надана Київським міським центром крові. Кров бика була надана ЗВП «Хутровик» (м. Узин, Україна).

## **2.2. Методи досліджень**

### **2.2.1 Синтез олігонуклеотидних проб для проведення Нозерн-блот аналізу**

Олігонуклеотиди (нуклеотидні послідовності з 30-40 нуклеотидів) специфічні для різних матричних РНК протеїну N-CAM1 були побудовані на базі відомих послідовностей клонів кДНК протеїну N-CAM1 [33] : проба E 7 , що відповідає нуклеотидній послідовності 1187-1217, гібридизувалася з сьомим екзоном, що присутній в матричних РНК різного розміру протеїну N-CAM1; проба EVASE, що відповідає нуклеотидній послідовності 1271-1300, проба E7/8, що відповідає нуклеотидній послідовності 1257-1270 + 1301-1315, - ці проби специфічні для матричних РНК протеїну N-CAM1, що, відповідно, або мають, або позбавлені екзону VASE; проба E16, що відповідає нуклеотидній послідовності 2502-2541, гібридизувалася з частиною шістнадцятого екзону. На базі відомих послідовностей клонів кДНК протеїну N-CAM1 з організму миші [254] були побудовані олігонуклеотидні проби специфічні для екзону «а», за яким розташований екзон AAG (проба E12/a/ AAG/13, нуклеотидна послідовність 1946-

1959+a+AAG+1960-1969) та для матричних РНК, послідовність яких не містила додаткових екзонів між екзонами 12 та 13 (проби E12/13, нуклеотидна послідовність 1946-1976). На базі відомих послідовностей клонів кДНК протеїну N-CAM1 з організму людини [255] була побудована олігонуклеотидна проба E12/a/b, що впізнає послідовність в матричних РНК специфічну для екзону 12, за яким розташовані додаткові екзони а та b. Олігонуклеотиди були синтезовані на ДНК-синтезаторі Biosearch 8750 (США) та помічені радіоактивною міткою [<sup>32</sup>P] d ATP (New England Nuclear, Бостон, США), використовуючи ДНК-кіт Boehringer-Mannheim Biochemica (Мангайм, Німеччина). Специфічність олігонуклеотидних проб була описана в попередній роботі [256].

Шість олігонуклеотидів було синтезовано на базі відомих послідовностей кДНК N-кадгеринового протеїну організму миші [257]: проби N-cad I та N-cad II були розроблені на базі послідовності, що кодує регіон N-кадгерину, який відокремлюється від зрілого поліпептиду (нуклеотидні послідовності 427-455 та 457-495 відповідно). Проба N-cad III створена на базі послідовності, що кодує N-кінцеву послідовність зрілого N-кадгеринового протеїну (олігонуклеотидна послідовність 794-830), проба N-cad IV відповідала олігонуклеотидній послідовності 1889-1920. Проби N-cad V та N-cad VI синтезовані на базі послідовностей, що кодують цитоплазматичний домен молекули (нуклеотидні послідовності 2661-2700 та 2868-2897 відповідно). При проведенні аналізу виявилось, що проба N-cad II мала найменшу гомологію з E-кадгерином (44%) та P-кадгерином. Два олігонуклеотиди були синтезовані на базі кДНК E-кадгерину миші [258]. Ці проби E-cad I та E-cad II відповідали послідовностям, що кодують екстрацелюлярний та цитоплазматичний домени відповідно (нуклеотидні послідовності 876-908 та 2443-2476). Два олігонуклеотиди були синтезовані на базі кДНК P-кадгерину миші [259]. Проби P-cad I та P-cad II відповідали послідовностям, що кодують екстрацелюлярний та цитоплазматичний домени відповідно (нуклеотидні послідовності 792-823 та 2257-2286).



Відсоток гомології між олігонуклеотидними пробами N-кадгерину та кДНК послідовностями E- та P-кадгерину визначали як рекомендовано в роботі [260].

### 2.2.2 Нозерн-блот аналіз

Тканини щура після видалення відразу заморожували при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Препарат матричних РНК отримували за допомогою фенол-хлороформного методу [261] з деякими модифікаціями. Тканини гомогенізували у 10мМ натрій-ацетатному буфері рН 8,0, що містив 3М хлорид літію, 6М сечовини та 0,05% DS-Na. Проводили інкубацію протягом ночі при  $4^{\circ}\text{C}$  на льоду. Після цього препарат центрифугували при  $4^{\circ}\text{C}$  протягом 10 хв. при 9000 об/хв., ротор Sorvall SM-24. Супернатант відкидали, а осад ресуспендували в тому ж об'ємі буфера для гомогенізації без 0,05% DS-Na. Проводили інкубацію протягом 30 хв. на льоду. Препарат центрифугували при  $4^{\circ}\text{C}$  протягом 10 хв. при 9000 об/хв. Осад ресуспендували в 10мМ трис-HCl буфері, рН 8,0, що містив 2мМ ЕДТО, 200мМ хлориду натрію, 0,5% DS-Na та протеїназу К (200 мкг/мл). Проводили інкубацію протягом 20 хв. при  $37^{\circ}\text{C}$ . До препарату додавали рівний об'єм насиченого фенолу, перемішували при кімнатній температурі протягом 10 хв. Препарат центрифугували протягом 5 хв. при 13 000 об/хв. Відбирали водну фазу та додавали рівний об'єм фенолу, проводили інкубацію протягом 10 хв. Препарат центрифугували протягом 5 хв. при 13 000 об/хв., відбирали водну фазу. До водної фази додавали рівний об'єм суміші фенол-хлороформ у співвідношенні 1:1. Препарат перемішували протягом 10 хв. Проводили центрифугування за умов як вказувалося раніше (13 000 об/хв., 5хв). Відбирали водну фазу та додавали рівний об'єм хлороформу, перемішували протягом 10 хв. Проводили центрифугування за умов як вказувалося раніше (13 000 об/хв., 5хв). Відбирали водну фазу, додавали 3М ацетат натрію, рН 4,8 (десята частина від загального об'єму) та три об'єми 96% етанолу. Суміш інкубували

протягом ночі при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Після цього проводили центрифугування суміші (13 000 об/хв., 15хв). Отриманий осад промивали 70% етанолом. В такому стані препарат зберігали при  $-20^{\circ}\text{C}$  до подальшого використання для очищення хроматографією на оліго-dT-целюлозі (Pharmacia, Швеція).

За основу хроматографічного очищення препарату матричних РНК було використано методику, описану в роботі [262]. Осад, отриманий після осадження етанолом розчиняли в 0,01 М трис-HCl буфері, рН 7,5, що містив 0,5 М хлорид калію. Колонку з оліго-dT-целюлозою промивали тим самим буфером, в якому був розчинений препарат РНК. Після нанесення препарату РНК колонку промивали буфером зі зменшеною іонною силою, спочатку двома об'ємами 0,01 М трис-HCl буфера, рН 7,5, що містив 0,1 М хлорид калію, а далі – двома об'ємами вищезначеного буфера без хлориду калію. Кількість матричної РНК в пробах оцінювали спектрофотометрично ( $A_{260}/A_{280}$ ). Проби, що містили мРНК були денатуровані нагріванням ( $56^{\circ}\text{C}$ , протягом 15 хв.) в водному розчині 50% формаміду та 6 % формальдегіду. Проби мРНК розділяли електрофоретично з використанням 0,8% агарозного гелю, що містив 6,15% формальдегіду та бромистий етидій (0,3 мг/л). Електрофорез проводили в 40 мМ трис-ацетатному буфері рН 7,8, що містив 1мМ ЕДТО. В якості стандартів використовували стандарти РНК (BRL, США). Типове розділення матричних РНК тканин щура представлено на рис. 2.1.

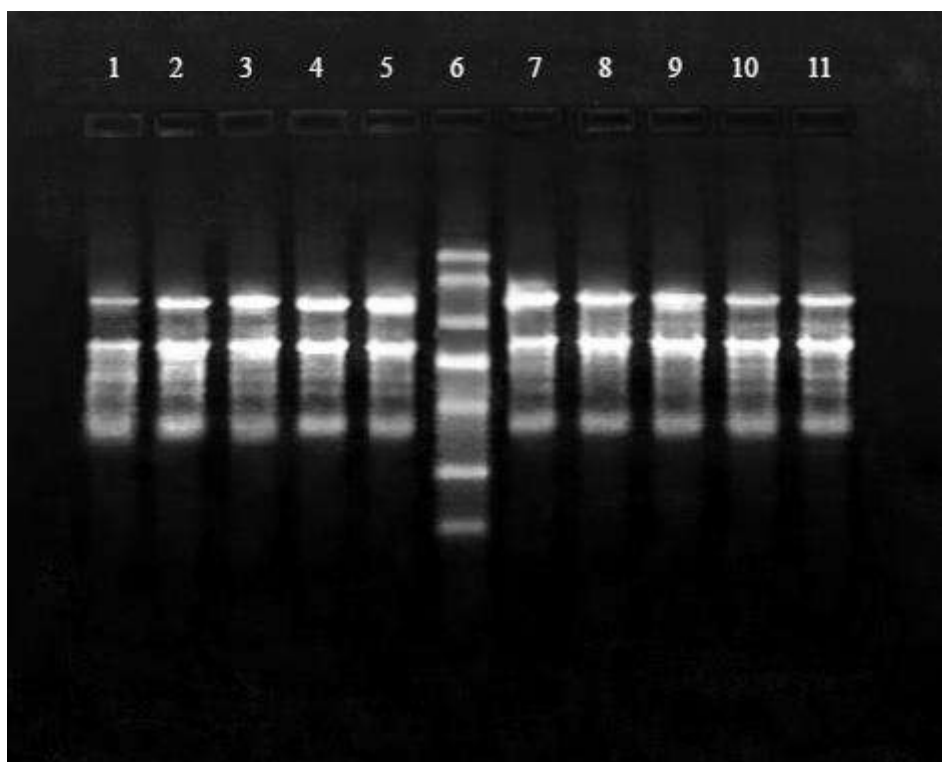


Рис.2.1 Електрофоретичне розділення мРНК тканин щура на агарозному гелі з етідіум бромідом. Центральний трек – стандарти РНК.

Фракціоновану мРНК переносили на нітроцелюлозну мембрану (Schleicher and Schuell, Німеччина) капілярним блотингом протягом 12 годин в розчині 20xSSC (1xSSC = 0,15 М хлорид натрію; 0,015 М цитрат натрію; 0,1 % DS-Na; 0,1% розчину Денхардта (2% розчин Денхардта = 2% фіколу; 2% бичачого сироваточного альбуміну; 2% полівінілпіролідону).

Прегібридизацію проводили протягом двох годин, та гібридизацію протягом 18-20 годин при температурі 60-70° С у розчині 4xSSC (1xSSC = 0,15 М хлорид натрію; 0,015 М цитрат натрію; 0,1 % DS-Na; 0,1% розчину Денхардта (2% розчин Денхардта = 2% фіколу; 2% бичачого сироваточного альбуміну; 2% полівінілпіролідону); 0,2 мМ ЕДТО; 200 мкг полі (А)/мл; 0,06% тетранатрію пірофосфата. Після завершення гібридизації нітроцелюлозні мембрани відмивали у розчині 1xSSC, який містив 0,1 % DS-Na при температурі гібридизації. Кількість препарату мРНК (10мкг), що наносили в лунки гелю оцінювали по забарвленню геля етідіум бромідом.

Для отримання результатів використовували від 3 до 5 незалежних препаратів мРНК для кожної вікової групи тварин.

### 2.2.3 Отримання антитіл до протеїнів клітинної адгезії

Поліклональні антитіла до протеїну N-CAM1 були отримані як описано в роботі [263]. Для експериментів по імуноблотінгу ці антитіла були очищені наступним чином. Протеїни мембранної фракції головного мозку дорослих щурів були перенесені на електрофоретичний гель та перенесені на нітроцелюлозну мембрану (Millipore Corporation, США) як описано нижче. Смуги, що містили ізоформи протеїну N-CAM1 з молекулярними масами 190 та 135 кДа вирізуали, блокували 2% твін 20 (Sigma) та інкубували з антитілами до протеїну N-CAM1. Нітроцелюлоза відмивалася п'ять разів протягом 10 хв. в промивному буфері, 50 мМ трис-HCl, рН 10,2, який містив 150 мМ NaCl, 0,1 мМ фенілметилсульфоніл фторид та 0,05% твін 20. Зв'язані антитіла елюювали розчином 0,1 М цитратного буфера рН 2,6, який містив 0,5 М NaCl, 1% БСА та 0,05% твін 20 протягом 2 хв. В отриманому елюаті з антитілами рН розчину доводили до значення 10,2. З тієї ж нітроцелюлозної мембрани брали інші частини, що не містили протеїн N-CAM1, інкубували з антитілами до N-CAM1 та обробляли як описано вище. Ці елюати використовували як контрольні антитіла. Моноклональні мишині антитіла OB11 були люб'язно надані доктором Harry Langbeheim, Ізраїль. Ці антитіла спрямовані проти цитоплазматичного епітопу, який був спільний у ізоформ N-CAM1 з молекулярною масою 190 та 135 кДа [264]. Всі інші антитіла, які використовували в дослідженнях з протеїном N-CAM1 були отримані від фірми Dakopatts, США.

В роботі були використані поліклональні антитіла до гібридного протеїну, який складався з  $\beta$ -галактозидози, трансмембранного та цитоплазматичного домену протеїну N-CAM-145 м'язів людини. Препарат кДНК розрізали за допомогою ензимів рестрикції AatI та Bam HI, таким

чином утворювали фрагмент, кодує послідовності трансмембранної та цитоплазматичної частин. Цей фрагмент був клонований в вектор експресії pUEX2 [265]. Індукція синтезу гібридного протеїну та його очистка виконувалися як описано в роботі [266]. Імунізацію кролей проводили за методикою Harboe та Ingliid [267]. Отримані антитіла змішували з препаратом мембранної фракції головного мозку щура. Антитіла, які не зв'язалися, видаляли промивкою, а зв'язані антитіла елюювали 0,1 М натрій-цитратним буфером pH 2,6, що містив 0,5 М NaCl. Подалі ці антитіла пропускали через протеїн-A-сефарозу (Pharmacia, Швеція); отриманий кінцевий препарат використовували для дослідження та позначали як anti-N-CAM1-cyt.

Для отримання поліклональних антитіл до N-кадгерину використовували фрагмент Rsa I (нуклеотидна послідовність 2180-2804) з кДНК N-кадгерину курчати. Цей фрагмент відповідає за синтез п'яти амінокислот екстрацелюлярного домену, повного трансмембранного домену та цитоплазматичного домену. Вказаний фрагмент був вставлений в EcoR V сайт Bluescript KS (Stratagene, США) методом лігазного зшивання по тупим кінцям. Сенс-орієнтовані конструкти були ідентифіковані за допомогою рестрикційного картування. Фрагмент Rsa I був повторно ізольований подвійним розщепленням за допомогою рестриктаз Sal I та Pst I та вставлений в рамку зчитування в експресуючий вектор pUEX I (Amersham, Велика Британія). Рекомбінантний pUEX I тестували частковою секвенцією за допомогою ДНК секвенційного набору Sequenase version 1.0 (United States Biochemical, США). Рекомбінантний N-кадгериновий антиген, що містив  $\beta$ -галактозידазу гібридизовану з послідовністю N-кадгерину, отримували за допомогою трансформованого штаму E.coli, AG-1 (Stratagene, США) та послідовно очищували за методикою [266]. Культура AG-1 (10 мл), яка містила рекомбінантну плазмиду pUEX I була інокульована в поживне середовище TYGP (500 мл) що містило 100 мкг/мл ампіциліну. Культуру інкубували при 30°C за умов інтенсивної аерації до значення OD<sub>600</sub> 1,0. Синтез протеїну був індукований додаванням 50 мл TYGP середовища, 54°C

та інкубацією при 42°C. Після 1,5 годинної індукції бактерії охолоджувались до 4°C і були концентровані центрифугуванням 7000 g, 10 хв. Осад ресуспендували в 20 мл 50 mM трис-HCl, pH 8,0, 0,25% сахарози (вага/об'єм). Далі додавали лізоцим в кінцевій концентрації 5 мг/мл і суспензію інкубували протягом 15 хв. на льоду. Після цього додавали ЕДТО в кінцевій концентрації 50 mM і після п'ятихвилинної інкубації на льоду додавали тритон X-100 в кінцевій концентрації 4% (вага/об'єм). Інкубацію продовжували ще 10 хв. на льоду з постійним перемішуванням. Суспензію центрифугували при 48000 g протягом 30 хв., 4°C. Осад ресуспендували в 15 мл 50 mM трис-HCl, pH 8,0, 1% (вага/об'єм) дезоксихолевої кислоти та інкубували протягом 15 хв. на льоду з постійним перемішуванням. Після центрифугування 48000 g протягом 30 хв., 4°C осад ресуспендували в 15 мл 50 mM трис-HCl, pH 8,0, 5% DS-Na (вага/об'єм), 3% β-меркаптоетанолу. Суспензію руйнували ультразвуком (десять 20-ти секундних сплесків) та кип'ятили протягом 5 хв. Розчин освітлювали центрифугування 48000 g протягом 20 хв., 20°C. Супернатант діалізували проти 50 mM трис-HCl, pH 8,0, 1 mM ЕДТО. Діалізований розчин концентрували сублімаційною сушкою до кінцевої концентрації протеїну 5 мг/мл. Гібридний протеїн був протестований імуноблотінгом з використанням кадгеринових антитіл R-156 та був використаний для імунізації кролів. Отримані поліклональні антитіла мали назву anti-N-cad-cyt. Поліклональні антитіла R-156 були люб'язно надані доктором Benjamin Geiger, інститут Вейсмана, Ізраїль.

#### **2.2.4 Вестерн блот аналіз**

а) препарат скелетних м'язів щура з антитілами до протеїну N-CAM1

Оскільки гомогенати скелетних м'язів містили значну кількість міозину, який ускладнював проведення електрофорезу та імуноблотінгу, була розроблена відповідна методика, щоб усунути цю проблему. Тканини м'язів

гомогенізували в 50 мМ трис-НСl, рН 7,4, що містив 15 мМ азиду натрію та центрифугували при 100 000 g протягом 1,5 години для отримання супернатанту за умов високої швидкості. Мембранна фракція була солюбілізована в тритон-солюбілізаційному буфері (ТС), який мав наступний склад: 10мМ трис-барбіталовий буфер рН 8,6, 2% тритон Х-100, 15 мМ азид натрію та 100 од/мл апротиніну. Після цього фракцію центрифугували 18 000 g протягом 15 хв. для отримання розчинної тритонової мембранної фракції. Фракція, що не розчинялася в тритоні Х-100 відмивалась тричі в ТС. Всі фракції (супернатант за умов високої швидкості, ТС-розчинна мембранна фракція, ТС-промивні фракції та ТС-нерозчинна фракція) кип'ятили в електрофоретичному буфері для зразків з DS-Na, що містив 5%  $\beta$ -меркаптоетанолу та наносили на гель 7,5% за стандартною методикою [268]. Розділені електрофорезом протеїни були перенесені на полівініліденфторидну мембрану (Milipore Corporation, США). Неспецифічне зв'язування блокували інкубацією з 2% твін 20 в промивному буфері, який мав такий склад: 50 мМ трис-НСl, рН 10,2; 150 мМ NaCl, 0,1 мМ фенілметилсульфоніл фторид, 0,05% твін 20. Первинні антитіла розчиняли у вищезгаданому промивному буфері. В якості вторинних антитіл використовували кон'югований з лужною фосфатазою антикролячий імуноглобулін свині (Dako A/S, Данія). В якості маркерів молекулярної маси використовували три головні ізоформи протеїну N-CAM1 з головного мозку щурів 190, 135 та 115 кДа. При інкубації з антитілами OB11 було необхідно провести доочищення N-CAM1 до проведення електрофорезу. Поліклональні кролячі антищурові антитіла до N-CAM1 приєднували до гранул CNBr активованої сефарози 4В. Солюбілізовані протеїни інкубували з модифікованими гранулами протягом 30 хв. при 4°C. Гранули послідовно промивали: двічі в фосфатно-сольовому буфері (PBS), один раз в PBS з 0,1М NaCl, та остаточно – в 10мМ трис-барбіталовому буфері рН 8,6. Гранули, що містили зв'язаний протеїн N-CAM1 кип'ятили в електрофоретичному буфері для зразків з DS-Na та після центрифугування при 18 000 g протягом 5 хв.

отриманий супернатант з протеїном N-CAM1 наносили на гель для електрофорезу. Після проведення електроблотингу на полівініліденторидну мембрану неспецифічне зв'язування блокували розчином PBS, що містив 10 мМ NaCl та 2 % БСА. Промивний буфер для антитіл OB11 – PBS з 0,1 % БСА; антитіла розчиняли в розчині PBS, що містив 2 % БСА та 15мМ NaN<sub>3</sub>. В якості вторинних антитіл використовували кон'югований з лужною фосфатазою кролячий анти-мишиний імуноглобулін (Dako A/S, Данія).

б) препарата серцевих м'язів щура з антитілами до протеїну N-CAM1

Серцеві м'язи щура гомогенізували в 50 мМ трис-HCl, рН 7,4; 15 мМ NaN<sub>3</sub>, 0,1 мМ фенілметилсульфоніл фторид, 100 од./мл апротиніну (Бауер, Данія) у співвідношенні 1:10. Проби центрифугували при 18 000 g протягом 15 хв. Отриманий осад солюбілізували за допомогою ультразвуку в буфері для гомогенізації, що містив 2% тритон X-100. Після цього проводили інкубацію протягом однієї години при 4°C та центрифугування при 18 000 g протягом 15 хв. Для отримання супернатанта за умов високої швидкості гомогенати центрифугували при 100 000 g протягом 1 години. Зразки кип'ятили в електрофоретичному буфері для зразків з DS-Na, що містив 5% β-меркаптоетанолу та наносили на гель 7,5% за стандартною методикою [268]. Далі послідовність процедур була такою як описано вище. Для препаратів скелетних м'язів. Представлені результати базуються на даних, отриманих на декількох щурах (від двох до шести) кожної вікової групи.

в) препаратів тканин щура з антитілами до протеїну N-кадгерин

Свіжі або заморожені тканини щура гомогенізували в буфері для гомогенізації такого складу: 10 мМ трис-HCl, рН 7,4; 0,1 М NaCl, 10 мМ NaN<sub>3</sub>, 0,1 мМ фенілметилсульфоніл фторид. Гомогенати центрифугували при 13 000 g протягом 20-40 хв. Осади промивали, ресуспендували в буфері для солюбілізації (10 мМ трис-HCl, рН 7,4; 0,1 мМ фенілметилсульфоніл фторид, 2% тритон X-100) та солюбілізували за допомогою ультразвуку (2хв). Далі проби центрифугували при 13 000 g протягом 15 хв. при 4°C. За



альтернативною схемою тканини гомогенізували безпосередньо в буфері для солюбілізації, піддавали впливу ультразвуком та центрифугували при 13 000 g протягом 15-60 хв. Всі наступні етапи проведення імуноблотингу були такими ж як описано вище для препарата скелетних м'язів щура з антитілами до протеїну N-CAM1.

#### **2.2.5 Вивчення протеолітичної деградації N-кадгеринового поліпептиду**

Тканини головного мозку щурів на 1-4 день постнатального розвитку гомогенізували в буфері для гомогенізації такого складу: 10 mM трис-HCl, pH 7,4; 0,1 M NaCl, 10 mM NaN<sub>3</sub>, 0,1 mM фенілметилсульфоніл фторид. Гомогенати центрифугували при 13 000 g протягом 20-40 хв. Осади промивали, ресуспендували в буфері для солюбілізації (10 mM трис-HCl, pH 7,4; 0,1 mM фенілметилсульфоніл фторид, 2% тритон X-100) та солюбілізували за допомогою ультразвуку (2хв). Далі проби центрифугували при 13 000 g протягом 15 хв. при 4°C. За альтернативною схемою тканини гомогенізували безпосередньо в буфері для солюбілізації, піддавали впливу ультразвуком та центрифугували при 13 000 g протягом 15-60 хв. В буфер для гомогенізації або в буфер для солюбілізації додавали 10 mM хлориду кальцію або 10 mM ЕДТО. Ефекти кальцію на стабільність N-кадгеринового поліпептиду досліджували за допомогою імуноблотінгу, використовуючи поліклональні антитіла anti-N-cad-*cyt.* або поліклональні антитіла R-156.

#### **2.2.6 Імуногістохімічне дослідження експресії N-кадгерину під час ембріонального розвитку підшлункової залози людини**

Тканину ембріональної підшлункової залози людини було взято з абортівного матеріалу (Дніпропетровська обласна лікарня). Збір матеріалу проводився згідно Гельсінській декларації Всесвітньої медичної асоціації «Етичні принципи медичних досліджень за участю людини у якості об'єкта досліджень», 1996р. Вік ембріонів визначався згідно морфологічним ознакам по Munsick [269]. Препарати ембріональної підшлункової залози були зафіксовані у фіксаторі Боуена (пикринова кислота, формальдегід, оцтова кислота у співвідношенні 15:5:1) або у 4% водному розчині формаліну протягом 24 годин. Зразки підлягали дегідратації в етанольному градієнті (70-95%), далі проводили промивку хлороформом та укладення в парапласт. Блокування ендогенної пероксидази здійснювали у 3% розчині пероксиду водню протягом 10хв. Зрізи товщиною від 3 до 5 мкм тричі промивали протягом п'яти хвилин кожного разу в PBS, рН 7,4, що містив 0,01% Tween 20. Зрізи інкубували з первинними антитілами, розчиненими в PBS, що містив 1% БСА, у вологій камері при 4°C протягом 14-24 годин. Після цього зрізи інкубували з біотинільованим анти кролячим IgG (Dako, Копенгаген, Данія) розчиненим у співвідношенні 1:100 протягом 60 хв. при кімнатній температурі. Продукти реакції були візуалізовані авідин-біотин-пероксидазним комплексом (Vectastain-Elite, Vector, Burlingame, США). В якості хромогенного субстрату був використаний діамінобензидин. Для заключення імуногістохімічних препаратів використовували реактив DPX (Sigma-Aldrich, США).

Були поставлені імуногістохімічні контролю: препарати, при підготовці яких виключалися стадії обробки або специфічними кролячими антитілами, або анти-кролячим Ig G, в якості негативного контролю використовували препарат, при підготовці якого інкубація з первинними антитілами була замінена інкубацією з неімунною кролячою сироваткою.

#### **2.2.7. Обробка препаратів протеїну N-CAM1 ендосіалідазою N**

Препарат ендосіалідази N був люб'язно наданий доктором Jurgen Roth, Цюріхський університет, Швейцарія. Для обробки ендосіалідазою N препарат мембранної фракції скелетних або серцевих м'язів щура змішували з ензимом ( $4 \times 10^9$  од / мл зразка) та проводили інкубацію протягом 30 хв. при  $37^\circ\text{C}$ . В контрольних зразках інкубацію проводили за тих же умов, але без додавання ензиму. Для контролю ензиматичної активності препарати головного мозку щурів першого дня постнатального розвитку, які містили високосіальовані форми протеїну N-CAM1, обробляли ендосіалідазою N та аналізували за допомогою імуноблотингу, при цьому дифузні зони полісіальованого протеїну перетворювалися на чіткі смуги.

#### **2.2.8 Визначення кількості протеїну N-CAM1 методом імуноферментного аналізу**

Кількість протеїну N-CAM1 визначали методом імуноферментного аналізу як описано в роботі [ 270]. Тканини гомогенізували в 70мМ трис-барбіталовому буфері рН 8,6, що містив 2% тритон X-100, 15 мМ  $\text{NaN}_3$ , 0,1 мМ фенілметилсульфоніл фторид. Кількість протеїну N-CAM1 в гомогенатах визначали у чотирьох тварин з кожної вікової групи. Статистичну обробку результатів проводили із використанням *t*-тесту Ст'юдента, різницю між середніми значеннями у різних групах вважали вірогідною при  $P < 0,05$ .

#### **2.2.9 Одержання Glu- та Lys-плазміногену**

Одержання Lys-плазміногену з фракції  $\text{III}_{2,3}$  плазми крові за Коном. Фракцію  $\text{III}_{2,3}$  за Коном суспендували в 0,01М натрій-фосфатному буфері рН 7,4, що містив 0,15 М NaCl. Суспендування проводили на холоду ( $4^\circ\text{C}$ ) при

перемішуванні на магнітній мешалці протягом 4 годин до утворення гомогенної субстанції. Отриману суспензію центрифугували при 4000 об/хв протягом 30 хв. при 4°C. Супернатант фільтрували через фільтр змочений у 0,01М натрій-фосфатному буфері, рН 7,4. Екстракт залишали на 12 годин на льоду. Далі проводили повторне центрифугування екстракту (4000 об/хв протягом 40 хв. при 4°C). Отриманий супернатант фільтрували як вказувалося раніше. Фільтрат наносили на колонку з Lys-сефарозою (швидкість нанесення 40 мл/год.), врівноваженою 0,05М натрій-фосфатним буфером, рН 7,4. Промивку колонки проводили 0,1М натрій-фосфатним буфером, рН 7,4. Елюцію з колонки проводили 0,1 М 6-аміногексановою кислотою в 0,05М натрій-фосфатному буфері, рН 7,4. Концентрацію протеїну у препаратах плазміногену визначали спектрофотометрично («СФ-2000», РФ). Проби, що містили плазміноген об'єднували для проведення висолювання сульфатом амонію. Сульфат амонію додавали із розрахунку 0,4г на 1мл при постійному перемішуванні. До висолу додавали р-NPGV у кінцевій концентрації  $10^{-4}$  М. Висол залишали на 12 годин на льоду. Після цього проводили центрифугування, 12 000 об/хв, 4°C протягом години. Супернатант відкидали, а осад розчиняли в суміші 0,05 М трис-лізинового буфера рН 9,0 , що містив 0,02 М лізин, 0,15 М NaCl та 0,001М ЕДТО та 0,05 М трис-HCl буфера рН 7,4, що містив 0,15 М NaCl. Після 30-хвилинної інкубації проби підлягали діалізу. Діаліз проводили проти 0,05М трис-HCl буфера рН 7,4, що містив 0,15 М NaCl. В отриманому препараті визначали концентрацію протеїну. Для ідентифікації Lys- та Glu-форми плазміногену застосовували електрофорез за низьких значень рН (Рис. 2.2)

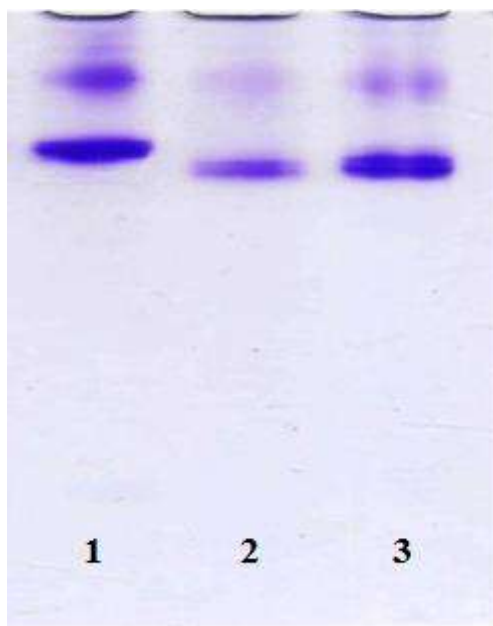


Рис. 2.2. Електрофореграма препаратів плазміногену та плазміну.  
1 — контрольний зразок Glu-плазміногену, 2 – контрольний зразок Lys-плазміногену; 3 – контрольний зразок плазміну.

Glu-плазміноген людини одержували із свіжоотриманої цитратної плазми крові умовно здорових донорів методом афінної хроматографії на Lys-сефарозі за присутності інгібітора серинових протеїназ апротиніну (10 мг/мл) [271]. Для інактивації можливих домішок плазміну в одержані препарати плазміногену вносили р-NPGB у кінцевій концентрації  $10^{-4}$  М, витримували протягом 30 хв за  $20^{\circ}\text{C}$ , після чого препарати плазміногену діалізували протягом 6 год проти 50 мМ трис-НСl буфера (рН 7,4), що містив 0,15 М NaCl. Концентрацію протеїну у препаратах плазміногену визначали спектрофотометрично («СФ-2000», РФ).

Чистоту одержаних препаратів плазміногену контролювали методом електрофорезу в 7,5% поліакриламідному гелі (ПААГ) за присутності додецилсульфату натрію (DS-Na) та в 11,5% ПААГ з оцтовою кислотою та сечовиною при рН 3,2, як описано в [272]. Потенційну казеїнолітичну та амідолітичну активності одержаних препаратів плазміногену визначали за класичними методами [273]. Активність плазміну в препаратах плазміногену не виявлялася. Препарати плазміногену зберігали при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.10 Одержання плазміну

Плазмін одержували шляхом активації плазміногену урокіназою, що іммобілізована на BrCN-сефарозі 4В [274]. Ковалентне приєднання урокінази (15000 МО/мл гелю) до BrCN-сефарози 4В проводили згідно з рекомендаціями [275]. Плазміноген інкубували з урокіназ-сефарозою 4В протягом 3,5 год за 25°C в 50 мМ Na-фосфатному буфері (рН 7,4), що містив 25% гліцерол (із розрахунку – 1 мг плазміногену / 1500 МО урокінази (0,25 мл гелю)). За таких умов ступінь перетворення проензиму в ензим складав не менше 95%. Ефективність активації оцінювали за швидкістю гідролізу хромогенного субстрату S 2251 та даними електрофорезу в ПААГ з DS-Na за присутності 2%  $\beta$ -меркаптоетанолу. Препарати плазміну зберігали при –20°C в 0,05 М Na-фосфатному буфері (рН 7,4), що містив 50% гліцерол для запобігання автолізу.

Амідолітичну активність плазміну визначали за швидкістю вивільнення *n*-нітроаніліну з хромогенного субстрату S 2251 (H-D-Val-L-Leu-L-Lys-*p*-нітроанілід·HCl). Реакцію гідролізу S 2251 проводили в 0,05 М трис-HCl буфері (рН 7,4), що містив 0,15 М NaCl в термостатованій при 37°C кюветі спектрофотометру СФ-26 («ЛОМО», РФ). Об'єм реакційної суміші – 1 мл. Вивільнення *n*-нітроаніліну реєстрували при довжині хвилі 405 нм.

Протеолітичну активність плазміну визначали за гідролізом  $\alpha$ -казеїну [273]. Розчин казеїну (кінцева концентрація 2%) у 0,067 М фосфатному буфері (рН 7,4) підлягав протеолізу плазміном (25 мкг/мл) протягом 30 хв. при 37°C. Об'єм реакційного середовища становив 0,5 мл. Реакцію зупиняли додаванням 0,75 мл 15% трихлороцтової кислоти. Ферментативну активність визначали спектрофотометрично при 280 нм за кількістю тирозину у складі пептидів, що утворилися в процесі гідролізу казеїну плазміном. 1 СУ відповідає такій кількості плазміну, який в умовах дослідів звільняє 450 мкг тирозину. Питому активність ензиму визначали як кількістю СУ/мг протеїну.

### 2.2.11 Одержання фрагментів плазміногену

Фрагменти плазміногену K1-3, K4 та Val 442-плазміноген (мініплазміноген) отримували шляхом обмеженого протеолізу плазміногену панкреатичною еластазою та очищували комбінацією методів гель-проникаючої хроматографії та афінної хроматографії, як описано в роботах [276, 277] з деякими модифікаціями. Для цього плазміноген в концентрації 10 мг/мл інкубували з панкреатичною еластазою (із розрахунку вагового співвідношення еластаза : плазміноген як 1:50) в 0,05 М трис-НСІ буфері (рН 8,5), що містив 0,1 М NaCl, протягом 5 год при 25°C. Реакцію зупиняли додаванням р-NPGВ до кінцевої концентрації 0,1 мМ. Гель-хроматографію гідролізату проводили на колонці (2,5\*70 см) з сефадексом G-75, що попередньо була врівноважена 50 мМ трис-НСІ буфером (рН 8,5) із додаванням 0,1 мМ NaCl. Швидкість елюції – 30 мл/год, об'єм фракцій – 3 мл. Таким чином, K4 відокремили від K1-3 та мініплазміногену, а також позбавилися домішок інгібітора.

Суміш фрагментів K1-3 та мініплазміногену розділяли методом афінної хроматографії на колонці з лізин-сефарозою, що була урівноважена 50 мМ Na-фосфатним буфером (рН 7,4). Мініплазміноген не взаємодіє з афінним сорбентом, тоді як K1-3, що містить високоафінний LBS, зв'язується з ним. Мініплазміноген елюювали 50 мМ Na-фосфатним буфером (рН 7,4), а K1-3 – 20 мМ 6-АГК у 50 мМ Na-фосфатному буфері (рН 7,4). Швидкість елюції – 40 мл/год, об'єм фракцій – 3 мл. Отримані фрагменти плазміногену були електрофоретично гомогенними (Рис. 2.3).

Фрагмент K5 отримували шляхом обмеженого протеолізу мініплазміногену пепсином. Для цього мініплазміноген в концентрації 9 мг/мл інкубували з пепсином (із розрахунку вагового співвідношення пепсин : плазміноген як 1:200) в 0,05 М гліциновому буфері (рН 2,5) протягом 2 год при 22°C. Реакцію зупиняли шляхом залуження середовища

інкубації в ході діалізу гідролізату проти 50 мМ трис-НСl буфера (рН 8,5). Очистку К5 проводили комбінацією методів гель-хроматографії на сефадексі G-75 та іонообмінної хроматографії на DEAE-сефадексі А-25 [278, 279]. Очищений фрагмент плазміногену К5 був електрофоретично гомогенним (Рис. 2.4). Препарати К1-3, К4, К5 та мініплазміногену зберігали при -20°C.

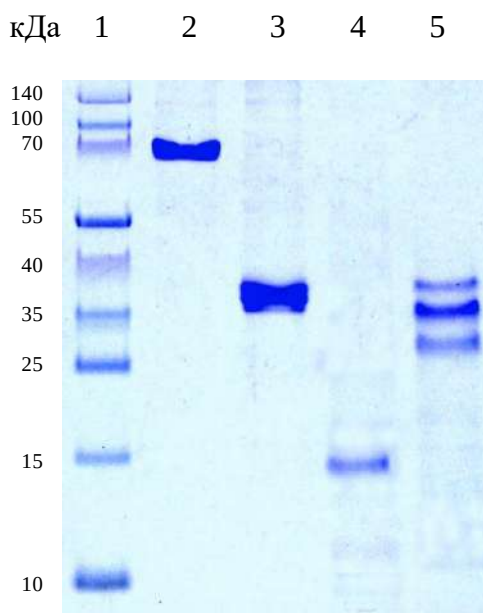


Рис. 2.3. Електрофореграма плазміногена людини та його протеолітичних крингл-вмісних фрагментів: К1-3, К4 та мініплазміногена (міні-Pg) (10% ПААГ, забарвлення Coomassie R-250): 1 – маркери молекулярної маси; 2 – плазміноген; 3 – міні-Pg; 4 – крингл К4; 5 – крингл К1-3.



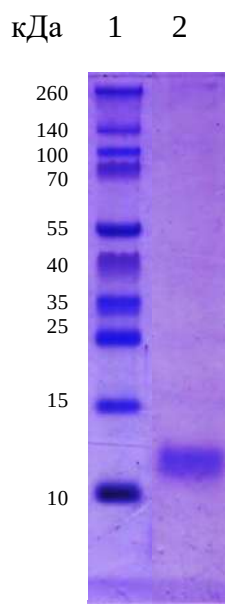


Рис. 2.4. Електрофореграма фрагмента плазміногена людини К5 (10% ПААГ, забарвлення Coomassie R-250): 1 – маркери молекулярної маси; 2 – крингл К5.

#### 2.2.12 Одержання DD-фрагменту фібрину

Фібриноген одержували із плазми крові людини методом фракційного висолювання сульфатом натрія [280] з деякими модифікаціями. Водний розчин антикоагулянту містив 3,8 % цитрату натрію, 0,25 % 6-аміногексанової кислоти та 0,01 % соєвого інгібітору трипсину. Кров з антикоагулянтом центрифугували при 910 g протягом 60 хв. при охолодженні. Супернатант зливали та проводили повторне центрифугування за тих самих умов (910 g, 60 хв.), супернатант охолоджували до 4°C. До охолодженої плазми додавали водну суспензію BaSO<sub>4</sub> (60 г BaSO<sub>4</sub> на літр плазми). Суміш перемішували протягом 25 хв. Після цього проводили центрифугування - 910 g, 10 хв. Процедуру осадження повторювали. До отриманого препарату безтромбінової плазми додавали 1М гліциновий буфер рН 9,5, що містив 0,1 М хлорид натрію (десята частина за об'ємом). Суміш

перемішували та проводили інкубацію при 22°C протягом 15хв. До суміші додавали 16% розчин  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (із розрахунку 558 мл 16% розчину  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  на 1 л плазми) до кінцевої концентрації сульфату натрію 5,7%. Отриману суміш центрифугували при 910 g, 15 хв. Далі супернатант відбирали та додавали краплинами 16% розчин  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (із розрахунку 373 мл 16% розчину  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  на 1 л суміші) до його кінцевої концентрації 8,5%. Проводили центрифугування за умов описаних вище - 910 g, 15 хв. Отриманий осад розчиняли у водному розчині 0,2 М хлориду натрію (для осаду, отриманого з літру плазми брали 200 мл 0,2 М  $\text{NaCl}$ ). Далі краплинами додавали рівний об'єм 16 % розчину сульфату натрію та проводили центрифугування - 910 g, 15 хв. Отриманий осад розчиняли у водному розчині 0,2 М хлориду натрію (для осаду, отриманого з літру плазми брали 200 мл 0,2 М  $\text{NaCl}$ ). До отриманої суміші додавали 0,5 М калій-фосфатний буфер рН 6,5 (п'ята частина за об'ємом). Далі додавали рівний об'єм 16 % розчину сульфату натрію та проводили центрифугування - 910 g, 15 хв. Отриманий осад розчиняли у водному розчині 0,15 М хлориду натрію (для осаду, отриманого з літру плазми брали 75 мл 0,15 М  $\text{NaCl}$ ). Визначали концентрацію протеїну у отриманій суміші. Проводили інкубацію при 4°C протягом 36 годин. Далі проводили центрифугування - 910 g, 15 хв. Відбирали супернатант і додавали рівний об'єм 16 % розчину сульфату натрію. Проводили центрифугування - 910 g, 15 хв. Отриманий осад розчиняли у водному розчині 0,15 М хлориду натрію (до кінцевої концентрації фібриногену приблизно 30 мг/мл). Розчин фібриногену заморожували в суміші ацетону та рідкого азоту. Препарат фібриногену зберігався до використання при -20°C. Чистоту препарату фібриногену визначали за допомогою електрофорезу у ПААГ з DS-Na.

D-фрагмент фібриногену виділяли з плазмінового гідролізату методом іонообмінної хроматографії на CM-Sephadex G-50. Гідроліз фібриногену плазміном проводили в 0,05 М Трис- $\text{HCl}$  рН 7,4, 0,15 М  $\text{NaCl}$  буферному розчині. Концентрація фібриногену у реакційному середовищі становила 10 мг/мл, іонів кальцію – 5 мМ, плазміну – 0,2 К.О/мл. Гідроліз тривав 6 год за

37°C. Плазмін інгібували, додаючи контрикал 1000 МО, 6-аміногексанову кислоту та EDTA до кінцевої концентрації 20 мМ. Після цього проводили діаліз гідролізату проти 0,01 М фосфатного буфера рН 6,0, що містив 10 МО/мл контрикалу, 20 мМ 6-АГК, 20 мМ EDTA, при температурі від 2 до 8° С. Гідролізат наносили на колонку CM-Sephadex G-50, врівноважену 0,01 М фосфатним буфером, рН 6,0. Після виходу матеріалу, який не зв'язався (Е-фрагмент), D-фрагмент елюювали 0,02 М фосфатним буфером рН 7,3, 0,3 М NaCl. D-фрагмент концентрували за допомогою системи фірми MILLIPORE 50K і відокремлювали від високомолекулярних домішок на Sephadex G-100. Чистоту фрагменту визначали за допомогою електрофорезу у ПААГ з ДС-Na.

Також D-фрагмент фібриногену отримували за умов описаних вище, але реакційну суміш інгібували тільки контрикалом та виділяли фрагмент на Сефадексі G-100 в 0,05 М Трис-HCl рН 7,4, що містив 0,15 М NaCl.

DD-фрагмент із прошитого фібрину виділяли з плазмінового гідролізату методом іонообмінної хроматографії на CM-Sephadex G-50 з наступною гель-фільтрацією на Sephadex G-100. Фібрин отримували в 0,05 М Трис-HCl рН 7,4, 0,15 М NaCl буферному розчині при концентрації фібриногену 10 мг/мл, йонів кальцію – 0,025 М та 4,0 МО тромбіну на мг фібриногену при температурі 25° С протягом 4 год. Лізис фібрину проводили 18 год при кімнатній температурі, додаючи плазмін із розрахунку 0,2 К.О./мл вихідного розчину реакційної суміші. Інгібування ферменту, діаліз та хроматографія реакційної суміші були такими, як при одержанні D-фрагмента фібриногену за першим варіантом. Чистоту одержаного препарату оцінювали електрофоретично (Рис. 2.5).

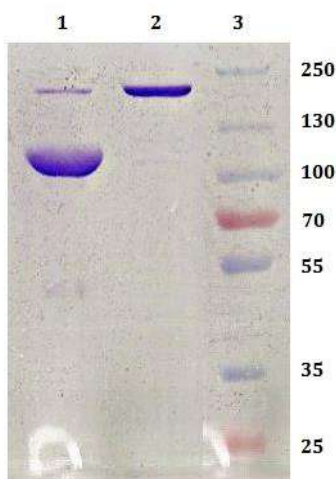


Рис. 2.5. Електрофореграма DD-фрагменту фібрину

1 – D-фрагмент фібриногену; 2 – DD-фрагмент фібрину; 3 – маркери молекулярної маси.

### 2.2.13 Метод визначення рівня ПАІ-1 з використанням хромогенного субстрату

Визначення активності ПАІ-1 в плазмі крові за стандартною процедурою COATEST PAI (Chromogenix) включає наступні етапи: ПАІ-1, що міститься в плазмі крові, взаємодіє з екзогенним тканинним активатором, взятим у надлишкових кількості; на наступному етапі плазміноген активують до плазміну тканинним активатором, що не заінгібувався, стимулятором реакції активації виступають фрагменти бромціанового розщеплення фібриногену людини; надалі спектрофотометрично ( $\lambda=405$  нм) визначають кількість пара-нітроаніліну, що вивільняється з хромогенного субстрату S-2251 внаслідок дії плазміну. Значення  $A_{405}$  прямо пропорційне активності ТАП і обернено пропорційне активності ПАІ-1 [281]. Враховуючи високу ціну комерційних тест-наборів та доведену нами можливість застосування desAABV-фібрину бика як кофактора реакції активації плазміногену тканинним активатором замість фрагментів бромціанового розщеплення

фібриногену людини [282], ми пропонуємо модифікацію тест-системи COATEST PAI (Chromogenix) для визначення активності ПАІ-1 в плазмі крові.

Запропонована нами модифікація стандартної процедури COATEST PAI полягає у використанні desAABВ-фібрину бика замість фрагментів бромціанового розщеплення фібриногену та рекомбінантного тканинного активатора альтеплази замість природного ТАП, застосуванні хромогенного субстрату плазміну S-2251 замість S2403, внесенні в інкубаційне середовище плазми крові без попереднього її розведення, зменшення загального об'єму реакційного середовища, що дозволяє проводити визначення в мікротитраційних планшетах. Схематично процес визначення ПАІ-1 з урахуванням наших модифікацій зображено на рис. 2.6.

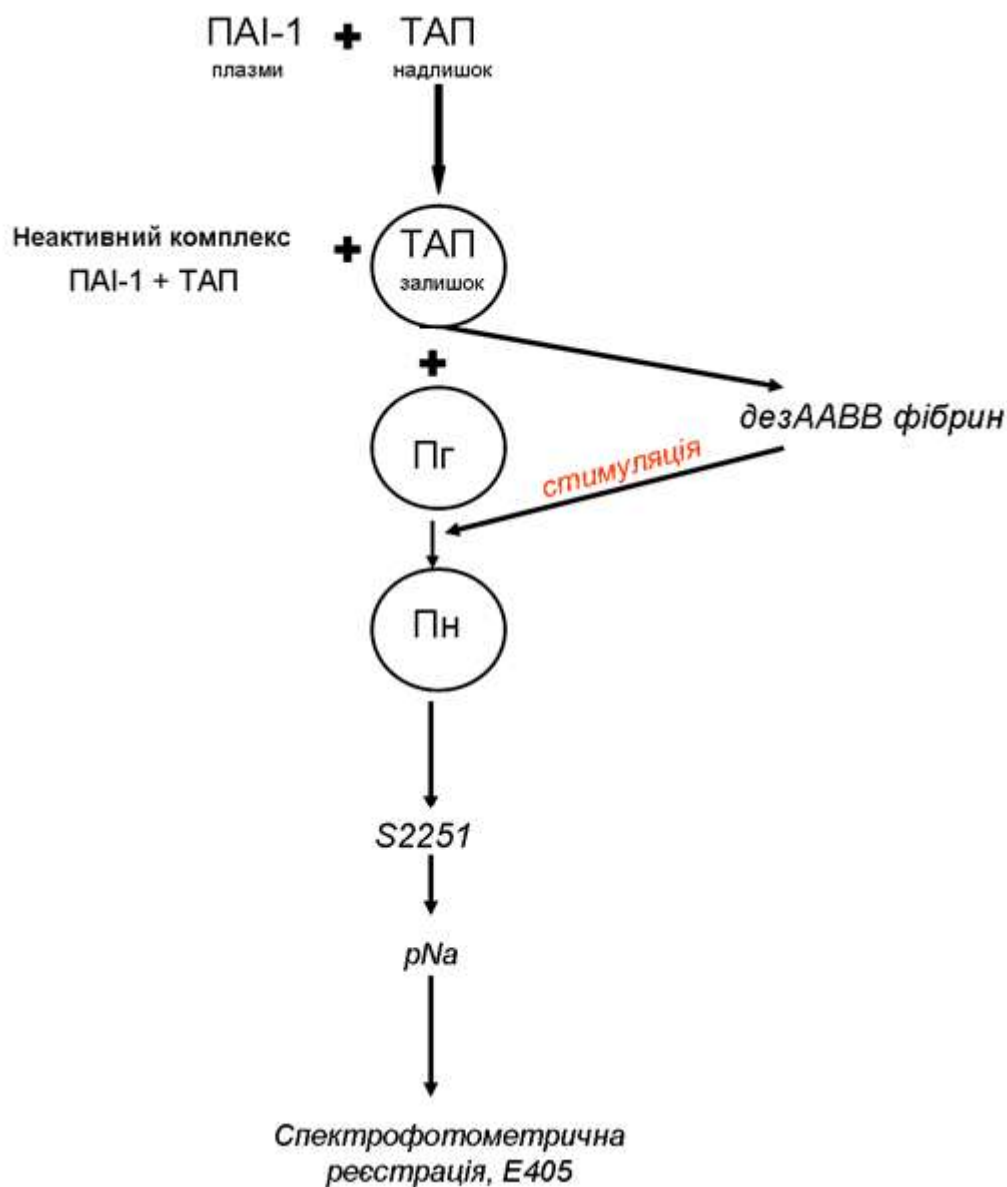


Рис. 2.6. Принцип методу визначення активності ПАІ-1 з використанням фібринових плівок та хромогенного субстрату:

**ТАП** – тканинний активатор плазміногену, **Пг** – плазміноген, **Пн** – плазмін, **НАс** – оцтова кислота, **pNa** – пара-нітроанілін.

Згідно запропонованої модифікації, процедура визначення активності PAI-1 в плазмі крові передбачає наступні етапи:

1) в лунку мікротитраційного планшета вносять 25 мкл розчину тканинного активатора плазміногену (20 IU/мл) та 5 мкл плазми крові, інкубують протягом 10 хв. при кімнатній температурі;

2) точно по завершенню попередньої інкубації вносять 10 мкл розчину desAABB-фібрину та 10 мкл плазміногену з концентраціями 3 мг/мл та 1 мг/мл відповідно, здійснюють внесення таким чином, щоб розчини не контактували один з одним;

3) реакцію активації плазміногену незаінгібованим тканинним активатором ініціюють внесенням 0,05 М трис-НСІ буферу (рН 7,4), що містить таку кількість хромогенного субстрату S-2251, яка відповідає його кінцевій концентрації в реакційній суміші 0,3 мМ;

4) протягом 1 год проводять інкубацію реакційної суміші при +37°C;

5) зупинку реакції здійснюють внесенням 25 мкл 50% оцтової кислоти, рівень поглинання пара-нітроаніліну вимірюють за двох довжин хвилі 405 і 495 нм та розраховують  $\Delta A = A_{405} - A_{492}$ .

Для визначення інгібіторної активності ПАІ-1 в плазмі крові будували калібрувальну криву з застосуванням рекомбінантного тканинного активатора плазміногену та desAABB-фібрину бика. Реакційне середовище містило рекомбінантний ТАП в кількості 0,02-0,2 IU/мл, плазміноген – 0,04 мг/мл, desAABB-фібрин – 0,12 мг/мл, 0,3 мМ хромогенний субстрат S-2251 та трис-НСІ буфер (рН 7,4). Оскільки одна одиниця активності ПАІ-1 відповідає такій кількості інгібітору, яка повністю заінгібує 1 IU тканинного активатора плазміногену, залежність значення  $\Delta A$  від кількості одиниць тканинного активатора плазміногену є обернено пропорційною кількості одиниць ПАІ-1, графік залежності представлений на Рис. 2.7.

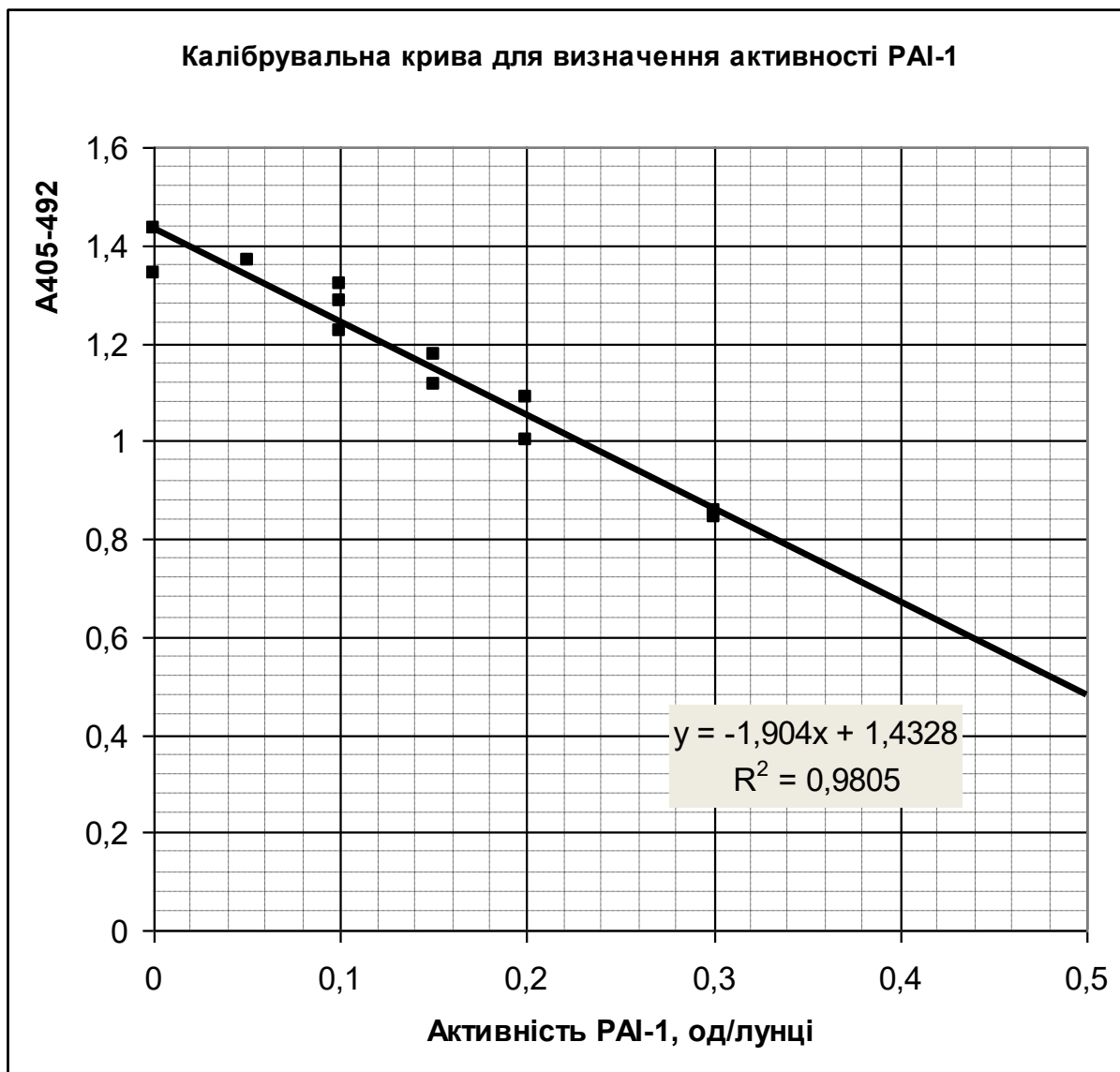


Рис. 2.7. Калібрувальна крива для визначення ПАІ-1 із застосуванням хромогенного субстрату.

Для запропонованої модифікації методу визначення активності ПАІ-1 в плазмі крові були визначені типові валідаційні характеристики, а саме: специфічність, відтворюваність, межа виявлення, діапазон застосування.

Діапазон застосування для запропонованої модифікації методу лежить в межах 2-40 IU ПАІ-1 в 1 мл плазми крові. Межа виявлення активності ПАІ-1 становить 2 IU /1 мл плазми. Запропонована модифікація методу простіша та доступніша за оригінальний метод, вона має високий рівень відтворюваності, що доведено трьома незалежними кривими, кожен з яких



отримували з використанням нових робочих розчинів. Стандартне відхилення кривих складає менше 7,5%.

Використання в методі desAABB-фібрину, одержаного з фібриногену плазми крові крупної рогатої худоби, замість бромціанових фрагментів фібриногену людини має певні переваги. По-перше, не треба використовувати високотоксичну речовину для одержання фрагментів. По-друге, у разі використання desAABB-фібрину вихідна сировина (плазма великої рогатої худоби) є значно дешевшою. До того ж, слід зауважити, що молекули фібриногену людини і бика виявляють високий ступінь гомології, а за ефективністю дії desAABB-фібрин бика не поступається бромціановим фрагментам [282].

#### **2.2.14 Отримання збагаченої тромбоцитами плазми та відмитих тромбоцитів плазми крові людини**

Збагачену тромбоцитами плазму (ЗТП) крові отримували із цільної крові умовно здорових донорів, що була антикоагульована 3,8% розчином лимоннокислого натрію у співвідношенні кров : антикоагулянт – 9 : 1. Для осадження еритроцитів та лейкоцитів кров центрифугували протягом 20 хв при 1000 об/хв (240 g) за 20°C. ЗТП (супернатант) переносили в іншу пластикову пробірку і зберігали на водяній бані при 37°C протягом 2 год.

Для осадження тромбоцитів залишок центрифугату повторно центрифугували протягом 20 хв при 2000 об/хв (480 g) за 20°C (центрифуга «К-23», Німеччина). Отриману таким чином бідну тромбоцитами плазму (БТП) використовували для стандартизації кількості тромбоцитів у зразках ЗТП при агрегатометрії [283].

Нативні тромбоцити отримували із цільної крові умовно здорових донорів, що була антикоагульована цитрат-декстрозним розчином (100 мМ лимоннокислий натрій, 80 мМ лимонна кислота, 110 мМ глюкоза) у співвідношенні кров : антикоагулянт – 9 : 1, шляхом поетапного

центрифугування за модифікованою методикою [284]. Так, для осадження еритроцитів та лейкоцитів кров центрифугували протягом 20 хв при 1000 об/хв (240 g) за 20°C. Супернатант (ЗТП) переносили в іншу пластикову пробірку і повторно центрифугували протягом 20 хв при 1500 об/хв (360 g) за 20°C, осад тромбоцитів ресуспендували у HEPES-буфері для відмивання тромбоцитів (20 мМ HEPES (pH 6,8) із додаванням 137 мМ NaCl, 4 мМ KCl, 0,2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2% глюкози та 0,2% бичачого сироваткового альбуміну). Суспензію клітин вдруге центрифугували за тих самих умов і ресуспендували у буфері, об'єм якого становив ½ об'єму ЗТП. Кількість клітин оцінювали за допомогою агрегометра «SOLAR AT-02» (Білорусь). Суспензію відмитих нативних тромбоцитів зберігали на водяній бані при 37°C протягом 3 год.

#### **2.2.15 Дослідження впливу компонентів плазміноген/плазмінової системи на агрегацію тромбоцитів методом агрегометрії**

Агрегацію вивчали у препаратах ЗТП крові та відмитих тромбоцитів людини. Агрегометрію виконували в перші дві-три години після забору крові на оптичному агрегометрі «SOLAR AT-02» (Білорусь) за протоколом [285]. Для реєстрації контрольних параметрів агрегації в термостатовану кювету агрегометра (загальний об'єм зразка – 400 мкл) вносили 360 мкл ЗТП та 40 мкл HEPES-буферу. Кількість тромбоцитів в середовищі стандартизували до значення, близького до фізіологічного (300-350 тис/мкл). Процес агрегації стимулювали внесенням ADP, кінцева концентрація агоніста складала 5 мкМ. Процес агрегації реєстрували в кінетичному режимі протягом 5 хв за 37°C при перемішуванні. Аналіз даних агрегометрії проводили за допомогою пакету програм «Агрегометр 2.01». Так, оцінювали ступінь агрегації – максимальний рівень світлопропускання ( $T_{max}$ ,  $\lambda = 540$  нм) реакційної суміші через 5 хв після додавання індуктора агрегації; швидкість агрегації – тангенс кута нахилу заданої ділянки агрегаційної кривої до осі абсцис.

Для дослідження ефектів Glu-/Lys-плазміногену на агрегацію тромбоцитів в середовищі плазми крові, безпосередньо перед внесенням стимулятора агрегації зразки ЗТП передінкубували з вказаними агентами протягом 3 хв для забезпечення їх взаємодії з клітинною поверхнею. Концентрація Glu- та Lys-плазміногену в середовищі агрегації становила 7,65 мкМ. Агрегацію тромбоцитів стимулювали внесенням ADP (5 мкМ).

Агрегацію відмитих тромбоцитів стимулювали внесенням тромбіну (1 од. NIH/мл), колагену (1,25 мг/мл) або ристоміцину (1,5 мг/мл). Концентрації агоністів були взяті згідно рекомендацій [286]. Кількість тромбоцитів в середовищі агрегації стандартизували до 300-350 тис./мкл. Процес агрегації реєстрували протягом 5 хв. Перелік подальших процедур був аналогічним до описаного вище.

В експериментах по вивченню впливу компонентів плазміноген/плазмінової системи на агрегацію відмитих тромбоцитів, перед внесенням стимулятора агрегації тромбоцити передінкубували з протеїнами плазміноген/плазмінової системи за 37°C протягом 3 хв для забезпечення зв'язування реагентів з поверхнею тромбоцитів [287]. Так, вивчали вплив екзогенних Glu-, Lys-плазміногену, плазміну та фрагментів плазміногену (K1-3, K4 та їх комбінація, K5, мініплазміноген), 6-АГК на агрегацію тромбоцитів. Для інгібування можливої плазмінової активності в середовищі агрегації вносили інгібітор серинових протеїназ аprotинін (5,5 МО/мл). Кількість плазміну у реакційній суміші визначали за амідолітичною активністю ензиму, як описано вище.

#### **2.2.16 Дослідження впливу різних форм плазміногену на актиновий цитоскелет тромбоцитів**

Для дослідження ефектів Glu- і Lys-форм плазміногену на перебудови актинового цитоскелета тромбоцитів, що знаходяться у різних фізіологічних станах, використовували такі групи клітин: 1 – інтактні тромбоцити (контроль); 2 – тромбоцити, активовані тромбіном (1 одиниця NIH/мл); 3 – тромбоцити, активовані колагеном (1,25 мг/мл); 4 – тромбоцити, інкубовані з Glu- або Lys-плазміногеном (1,2 мкМ/л); 5 – тромбоцити, преінкубовані з Glu- або Lys-плазміногеном та активовані колагеном. Препарат відмитих тромбоцитів людини отримували як описано в попередньому розділі.

Отримання протеїнових фракцій тромбоцитів, що містять різні пули актину, проводили руйнуванням клітин за допомогою Triton X-100-вмісного буфера та наступного диференціального центрифугування [288]. Відразу після проведення агрегометрії до суспензії тромбоцитів вносили рівний об'єм лізуючого буфера такого складу: 100 мМ/л тріс-HCl (pH 7,4), 2% Triton X-100, 10 мМ/л ЕДТО, 2мкг/мл лейпептину, 100мМ/л бензамідину, 2 мМ/л RMSF, 2 мМ/л ванадату натрію. Після обережного ре суспендування клітин при 4°C лізати тромбоцитів центрифугували при 15000 g протягом 4 хв. Отриманий осад, нерозчинний у буфері з Triton X-100, містить фракцію філаментного F-актину. Для відділення пулів глобулярного актину (G) та актину мембранного кортексу (MC), що залишилися у надосадовій рідині, супернатант центрифугували при 100 000 g протягом 2 год. Осад містив фракцію MC-актину. Пул G-актину, солюбілізований у Triton X-100-вмісному буфері, залишався у супернатанті. Всі етапи центрифугування проводили при 4°C.

До осадів, отриманих після низькошвидкісного та високошвидкісного центрифугувань, вносили 62,5 мМ тріс-HCl буфер (pH 6,8), що містив 0,1% DS-Na, 1%  $\beta$ -меркаптоетанол, 10% гліцерол та 0,001% бромфеноловий синій, в об'ємі 100 мкл/осад і кип'ятили на водяній бані протягом 15 хв для солюбілізації протеїнів. Зразки, що містять G-актин, змішували із зазначеним буфером у співвідношенні зразок : буфер як 2:1 і кип'ятили в такому самому режимі. Електрофоретичне розділення протеїнів у зразках проводили у

пластині 10% ПААГ за присутності 0,1% DS-Na за стандартною методикою [268] з урахуванням рекомендацій Brunso та співавт. [289]. Детекцію актину здійснювали за допомогою імуноблотингу [290]. Для цього протеїни з ПААГ переносили на нітроцелюлозну мембрану («GE Healthcare Amersham», Велика Британія), яку після блокування у 5%-му розчині знежиреного сухого молока («Carnation», США), обробляли кролячими антитілами проти актину («Sigma Aldrich», США), у розведенні 1:400. Далі нітроцелюлозну мембрану інкубували зі вторинними антитілами проти імуноглобуліну G кроля, кон'югованими з пероксидазою хрому («Sigma Aldrich», США), взятими у розведенні 1:1500. Візуалізацію комплексу антиген-антитіло (поліпептидна зона 42 кДа) проводили з використанням субстрату пероксидази (0,02%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) і хромогену (0,01% діамінобензидин). Після проведення реакції мембрани промивали, ретельно висушували і сканували для отримання цифрового зображення. Відносний вміст різних пулів актину у тромбоцитах кожної групи оцінювали денситометрично і виражали у відсотках від кількості F-актину у тій самій групі клітин. Розраховані середні значення представлено на гістограмі у вигляді медіан, для оцінки вірогідності міжгрупової різниці використовували непараметричний U-критерій Манна-Уїтні [291]. Різницю вважали вірогідною при  $P < 0,05$ .

#### **2.2.17 Дослідження впливу різних форм плазміногену на експонування вітронектину на поверхні тромбоцитів методом протокової цитофлуориметрії**

Плазму крові отримували з ліктьової вени здорових донорів ( $n = 5$ ), як було раніше нами описано [9]. Дослідницькі протоколи були узгоджені з комісією з

біоетики і біобезпеки інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (від 3<sup>го</sup> листопада 2014р., протокол №10).

Агрегометрія була використана для перевірки життєздатності тромбоцитів та клітинну відповідь до тромбіну. Агрегація тромбоцитів вимірювалася на агрегометрі (“SolarAT-02”, Білорусь). Всі аналізи проводилися протягом 60-180 хвилин після отримання тромбоцитів. Експериментальні дані були статистично проаналізовані із використанням програм “MSExcel” та “Agregometr 2.01”. Тромбін (SigmaAldrich, США) у кінцевій концентрації 1 NIH од/мл був використаний для стимуляції тромбоцитів. Препарат Glu-плазміногену отримували із свіжої донорської плазми і Lys-плазміноген був виділений із фракції II-III по Кону із застосуванням відповідних методик [271]. Всі препарати плазміногену не містили домішок плазміну. Для оцінки впливу різних форм плазміногену на експонування вітронектину тромбоцитами було використано метод протокової цитофлуориметрії з використанням антитіл до вітронектину (SigmaAldrich, США). Відмиті тромбоцити ( $10^6$  клітин) були перенесені у 100 мкл 20 mM HEPES буферу, pH 6.8, що містив 137 mM NaCl, 4 mM KCl, 0,2 mM  $MgCl_2$ , 0,2% глюкози та 0,2% бичачого сироваткового альбуміну (BSA). Для проведення дослідження було використано наступні групи клітин: інтактні тромбоцити (контроль); тромбоцити, інкубовані із Glu- чи Lys-плазміногеном (час експозиції 3 хвилини); тромбоцити, оброблені тромбіном (5 хв), і тромбоцити, оброблені тромбіном після їх попередньої інкубації з Lys-плазміногеном (3 хв). Всі процедури із тромбоцитами були проведені при 22-25°C для запобігання активації тромбоцитів. Тромбоцити найближчим часом після інкубації з плазміногеном чи інтактні тромбоцити (контрольна група) були оброблені антитілами до вітронектину. Для проведення імунохімічного визначення вітронектину ми приготували препарат антитіл у 0,05 M Na-фосфатному буфері (PBS), pH 7,4 з 0,13 M NaCl і 1% BSA. Антитіла до вітронектину (2мкг) були перемішані із 100мкл PBS та вторинними FITC-кон'югованими антитілами (SigmaAldrich, США) (кінцеве розведення 1:100). Суміш була інкубована у темряві при 4°C протягом 15 хвилин. Тромбоцити

були інкубовані із отриманою сумішшю в темряві при кімнатній температурі протягом 30 хв. У якості контролю неспецифічного зв'язування антитіл ми використали тромбоцити, які були інкубовані виключно із FITC-кон'югованими антитілами. Незв'язані антитіла були видалені подвійним промиванням PBS шляхом центрифугуванням при 3000g протягом 3 хвилин при 20°C. Отримана суспензія відмитих тромбоцитів була ресуспендована у 1 мл PBS і використана для дослідження експонування вітронектину на приладі COULTER EPICS XL (Beckman Coulter, США). Оцінка експозиції вітронектину на поверхні тромбоцитів проводилася за двома параметрами: 1) відсоток вітронектин-позитивних тромбоцитів від всієї кількості досліджуваних клітин у зразку; 2) інтенсивність флуоресценції, детекція була проведена за каналом FL1 (515-535 nm). Для сортування тромбоцитів були встановлені відповідні ворота. Зміни у сигналі флуоресценції, які спостерігалися у випадку впливу досліджуваних молекул, були визначені відповідно до зміщення кривих флуоресценції порівняно з маркером (M), який лімітує криву флуоресценції інтактних тромбоцитів. Кількісні зміни флуоресценції були виражені у умовних одиницях (у.о.), які представляли собою десятковий логарифм величин за шкалою Log FL1. Для отримання статистично вірогідних результатів було проаналізовано не менше 10 тисяч подій у кожному зразку. Вимірювання цитометричних параметрів у кожній групі клітин проводили у двох паралелях, розраховуючи потім середнє значення для відповідних величин, отриманих від усіх донорів. Графічне зображення результатів отримували за допомогою програми FCS Express V3 (De Novo Software, США), числові характеристики представлені як середні величини  $\pm$  стандартна похибка середньої. Статистичну обробку результатів проводили із використанням *t*-тесту Ст'юдента, різницю між середніми значеннями у різних групах вважали вірогідною при  $P < 0,05$ .

### **2.2.18 Дослідження впливу різних форм плазміногену на експонування Р-селектину на поверхні тромбоцитів методом протокової цитофлуориметрії**

Для проведення дослідження використовували відмиті тромбоцити людини, отримані як описано в попередніх розділах. Відмиті клітини у кількості 2,5 млн. переносили до 100 мкл 20 мМ HEPES буферу, рН 6.8, що містив 137 мМ NaCl, 4 мМ KCl, 0,2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2% глюкози та 0,2% бичачого сироваткового альбуміну (BSA). Було сформовано експериментальну модель, що складалася з таких груп тромбоцитів: 1 – інтактні тромбоцити (контроль); 2 – тромбоцити, активовані тромбіном (1 одиниця NIH/мл); 3 – тромбоцити, інкубовані з Glu- або Lys-плазміногеном (1,2 мкМ/л); 5 – тромбоцити, преінкубовані з Glu- або Lys-плазміногеном та активовані тромбіном. Окремо досліджували ефекти Lys-плазміногену на експонування Р-селектину за наявності інгібітора сери нових протеїназ аprotиніну (Контривен, «Біофарма», Україна). Для цього його додавали до інкубаційного середовища у концентраціях 5 IU/мл або 50 IU/мл, як рекомендовано у роботі [293] та витримували 1хв. перед внесенням протеїну до суспензії клітин. Усі процедури, пов'язані з інкубацією тромбоцитів, виконували при 22-25 °С для уникнення їх спонтанної активації. Після завершення часу інкубації тромбоцитів з досліджуваними молекулами до суспензій клітин додавали 20 мкл антитіл до Р-селектину, кон'югованих з фікоеритрином (PE) («Acris Antibodies, Inc.», Сан-Дієго, США). Інкубацію з антитілами проводили протягом 30 хв. за кімнатної температури у темряві. Реакцію зупиняли розведенням суміші, додаючи 0,9 мл 50 мМ натрій-фосфатного буфера (рН 7,4), що містив 0,13 М хлориду натрію. Усі процедури з використанням антитіл виконувалися згідно з рекомендаціями виробника. Проведення цитометричного вимірювання Р-селектину здійснювали на приладі COULTER EPICS XL («Beckman Coulter», США), який оснащено аргоновим



лазером ( $\lambda_{\text{збудж.}} = 488 \text{ нм}$ ). Оцінку експресії Р-селектину проводили з використанням двох параметрів: 1) кількість Р-селектинпозитивних клітин, 2) інтенсивність флуоресценції, детекцію котрої здійснювали за каналом FL3 (620-630 нм). Неактивовані тромбоцити, що не обробляли антитілами, використовували для встановлення гейтів, за якими проводили сортування Р-селектинпозитивних клітин. Зміни сигналу флуоресценції визначали за зсувом її кривих відносно маркера ( $M$ ), який встановлено за цим показником для контрольної групи, та виражали в умовних одиницях (ум.од.), які являли собою десятковий логарифм величин за шкалою Log FL3. Для отримання статистично вірогідних результатів аналізували 100 тис. подій у кожному зразку. Показники у кожній групі клітин вимірювали у трьох паралелях, розраховуючи потім середні для відповідних величин. Графічне зображення результатів отримували за допомогою програми FCS Express V3 («De Novo Software», США), числові характеристики на гістограмах представлені як середні значення  $\pm$  стандартні похибки середніх. Статистичну обробку результатів проводили із використанням критерію  $t$  Стюдента, різницю між середніми значеннями у різних групах вважали вірогідною при  $P < 0,05$ .

#### **2.2.19 Дослідження впливу різних форм плазміногену на експонування фосфатидилсерину на поверхні тромбоцитів**

Дослідження проводили методом протокової цитометрії із використанням анексину А5, кон'югованого з фенілізотіюціанатом (FITC) (Sigma Aldrich, США), за раніше описаним алгоритмом [294].

Для проведення дослідження зв'язування анексину було взято наступні групи клітин: інтактні тромбоцити (контроль); тромбоцити, інкубовані із 1,2 мкМ Glu- або Lys-плазміногену (час експозиції 3 хв); тромбоцити, оброблені агоністом (5 хв), і тромбоцити, оброблені агоністом після їх попередньої інкубації з плазміногеном (3 хв). Всі процедури із тромбоцитами

були проведені при 22-25°C для запобігання їх спонтанної активації. Після завершення часу інкубації тромбоцитів з досліджуваними молекулами до суспензій клітин додавали 400 мкл 20 мМ HEPES буферу, рН 6.8, що містив 2,5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 137 мМ NaCl, 4 мМ KCl, 0,2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2% глюкози та 0,2% бичачого сироваткового альбуміну, а також 10 мкл анексину 5 (0,2 мг/мл). Інкубацію з анексином 5 проводили протягом 30 хвилин при кімнатній температурі у темряві. Незв'язаний анексин видаляли подвійним промиванням тромбоцитів HEPES-буфером шляхом центрифугування при 1000g протягом 5 хв. при 20 °C. Отриманий осад клітин ресуспендували у 0,5 мл HEPES-буферу і використовували для цитометричного аналізу.

Проведення цитометричного вимірювання здійснювали на приладі COULTER EPICS XL («Beckman Coulter», США), який оснащено аргонним лазером ( $\lambda_{\text{будж.}} = 488 \text{ нм}$ ). Експонування анексину А5 на поверхні тромбоцитів оцінювали за двома параметрами: 1) відсоток анексин-позитивних тромбоцитів від загальної кількості досліджуваних клітин у зразку; 2) інтенсивність флуоресценції, що детектували за каналом FL1 (515-535 nm). Для сортування тромбоцитів були встановлені відповідні ворота (гейти). Зміни у сигналі флуоресценції, які спостерігалися у випадку впливу досліджуваних молекул, були визначені відповідно до зміщення кривих флуоресценції порівняно з маркерами (M1 та M2), які лімітують криву флуоресценції інтактних тромбоцитів. Кількісні зміни флуоресценції були виражені у умовних одиницях (у.о.), які представляли собою десятковий логарифм величин за шкалою LOG FL1. Для отримання статистично вірогідних результатів було проаналізовано не менше 15000 подій у кожному зразку. Вимірювання цитометричних параметрів у кожній групі клітин проводили у двох паралелях, розраховуючи потім середнє значення для відповідних величин, отриманих від усіх донорів. Графічне зображення результатів отримували за допомогою програми FCS Express V3 (De Novo Software, США), числові характеристики представлені на діаграмах як середні значення  $\pm$  стандартна похибка середнього. Статистичну обробку

результатів проводили із використанням *t*-тесту Ст'юдента, різницю між середніми значеннями у різних групах вважали вірогідною при  $P < 0,05$ .

## **2.2.20 Методи електрофорезу в поліакріламідному гелі.**

### **2.2.20.1 Електрофорез в ПААГ за присутності додецилсульфату натрію**

Чистоту одержаних протеїнових препаратів перевіряли методом електрофорезу в 10% ПААГ за присутності 0,1% DS-Na за методом Laemli [268]. Електрофорез проводили на приладі для вертикального гелі-електрофорезу (BioRad, США) в пластинах з 1 мм спейсером протягом 1-3 год за 20°C. Сила струму – 20 - 40 мА. Протеїнові зони ідентифікували після фарбування гелю розчином 0,01% Coomassie R-250 в 25% ізопропанолі й 10% оцтовій кислоті протягом 10 хв та наступного видаленням барвника 2% розчином оцтової кислоти.

### **2.2.20.2 Електрофорез за кислих значень рН**

Для ідентифікації Glu- та Lys-форм плазміногену застосовували електрофорез за низьких значень рН, в основі якого лежить поділ протеїнів за різницею заряду [272]. Як маркер молекулярних мас використовували плазмін. Зразки для електрофорезу готували наступним чином: до розчину протеїну додавали рівний об'єм розчину 10 М сечовини, що містив 1,8 М оцтову кислоту, та розчин барвника піроніну. Електрофоретичне розділення проводили в 11,5% ПААГ, що містив 6,25 М сечовину та оцтову кислоту (рН 3,2). В якості електродного буферу використовували 0,9 М оцтову кислоту. Умови проведення електрофорезу аналогічні викладеним вище.

### **2.2.21 Визначення концентрації протеїнів**

Концентрацію протеїнів в розчинах визначали спектрофотометрично, вимірюючи величину оптичного поглинання при довжині хвилі 280 нм та віднімаючи значення поглинання при 320 нм. Для розрахунку концентрацій використовували значення молярних коефіцієнтів абсорбції (1%, 1см) і молекулярної маси досліджуваних протеїнів, що наведені в табл. 2.1.

Таблиця 2.1.

### Молярний коефіцієнт абсорбції та молекулярна маса протеїнів

| Протеїни                              | Показники            | Молекулярна маса, кДа |
|---------------------------------------|----------------------|-----------------------|
|                                       | $E_{1\%,1\text{см}}$ |                       |
| Glu-плазміноген                       | 17,0                 | 92                    |
| Lys-плазміноген                       | 17,0                 | 84                    |
| Плазмін                               | 17,0                 | 84                    |
| Мініплазміноген                       | 1,4                  | 38                    |
| Крингл 1-3                            | 2,25                 | 36                    |
| Крингл 4                              | 2,5                  | 10                    |
| Крингл 5                              | 1,2                  | 14                    |
| Фібриноген (рН 7,4)                   | 15,06                | 340                   |
| Фібрин-мономер (за кислих значень рН) | 14,84                | 300                   |
| tPA                                   | 20,0                 | 70                    |

### 2.2.22 Математична обробка та статистичний аналіз результатів

Математичну обробку, кінетичний та статистичний аналіз отриманих експериментальних даних виконували за допомогою пакетів програм

«MS Excel», «Ascent Software», «СФ-2000», «Агрегометр АТ-02» та «Total Lab - 120» (США). До роботи включено результати експериментів, допустима похибка яких не перевищувала 5 відсотків ( $p < 0,05$ ). Представлені на рисунках дані є типовим для серій повторюваних дослідів (не менше трьох у кожній серії).

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

#### **3.1. Нейрональний протеїн клітинної адгезії N-CAM1 під час постнатального розвитку та старіння скелетних м'язів щура**

Як визначалося в попередніх розділах, протеїн N-CAM1 – є представником адгезивних молекул Ig родини. Вперше його було визначено в нервовій тканині, але за думкою Fidzianska A et al [295] протеїн N-CAM1 може бути використаний як маркер змін, що відбуваються у м'язовій тканині. У м'язах дорослих ссавців N-CAM1 сконцентрований в регіоні нервово-м'язових з'єднань та сателітних клітин, проте він майже не визначається в несинаптичних утвореннях [296]. З іншого боку, при денервації або регенерації м'язів методами імуногістохімії визначають високий рівень цього протеїну в міофібрилярних структурах. Автори роботи пропонують застосування N-CAM1 в якості маркера при діагностиці нервово-м'язових захворювань. Інші автори вважають, що N-CAM1 може залучатись до механізмів, які підтримують синаптичну цілісність нервово-м'язових з'єднань [297]. У N-CAM1-негативних щурів при регенерації ушкоджених м'язів було зафіксовано зниження кількості міофібрил порівняно з групою нормальних тварин. До того ж було показано, що у N-CAM1-негативних тварин нервово-м'язові з'єднання відрізнялися за формою та розміром від відповідних структур у нормальних щурів [298]. Було зроблено висновок, що цей протеїн є необхідним для підтримки нормальної синаптичної функції в реіннервованих нервово-м'язових з'єднаннях. Нами проведено дослідження експресії певних екзонів в мРНК протеїну N-CAM1 в скелетних та серцевих м'язах під час постнатального розвитку та старіння щурів, а також визначення поліпептидних ізоформ цього протеїну в м'язовій тканині.

Визначення особливостей експресії N-CAM1 в м'язовій тканині під час постнатального розвитку тварин може бути корисним при з'ясуванні компенсаторних механізмів, які мають місце у старих тварин, а також передбачити наслідки дисфункції протеїну N-CAM1 при мотонейронних захворюваннях.

Експресію мРНК протеїну N-CAM1 в скелетних м'язах під час постнатального розвитку та старіння щурів визначали за допомогою нозерн-блоттінгу та відповідних олігонуклеотидних проб. Відповідність між мРНК та в ізоформами протеїну N-CAM1 наведена на рис. 3.1.

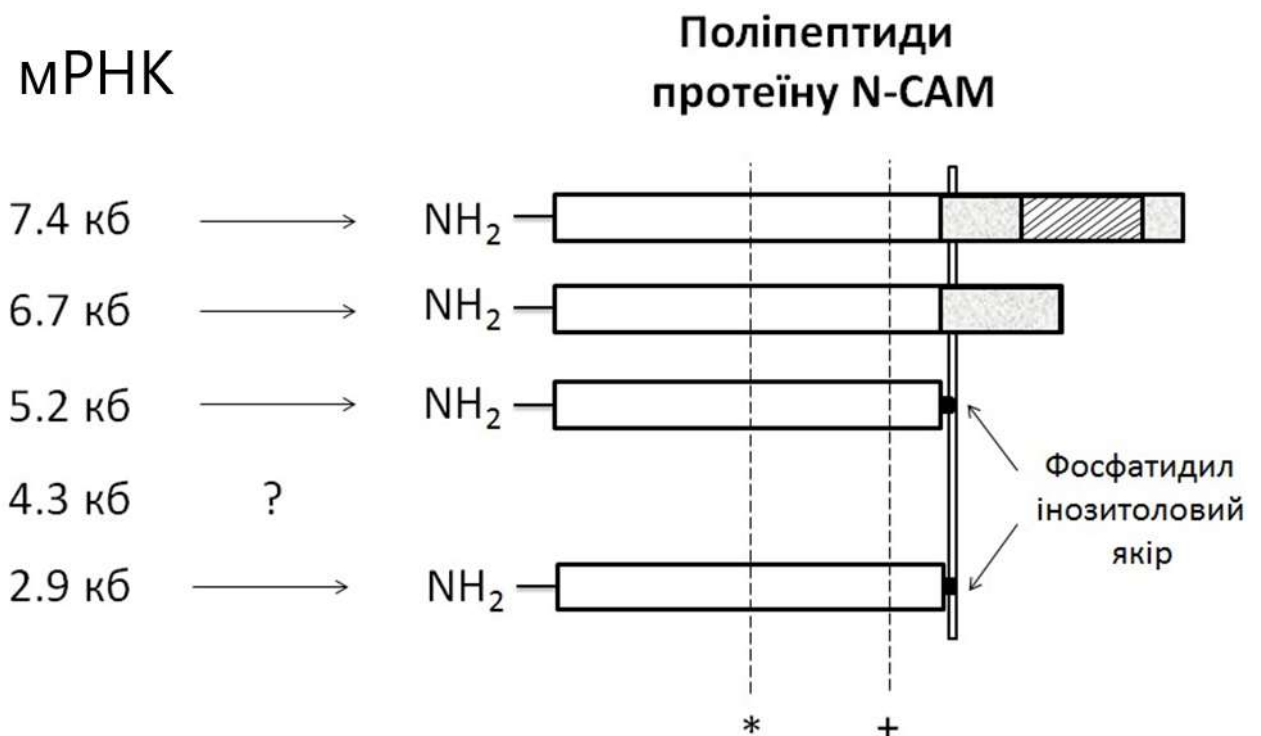


Рис. 3.1. Схематичне зображення відповідності мРНК та ізоформ поліпептиду N-CAM1.

\* позначає сайт екзонів 7/8;

+ позначає сайт екзонів 12/13

Синтезовані проби призначені впізнавати відповідні екзони та комбінації екзонів у складі мРНК. Проба E7 впізнавала сьомий екзон, який експресується в усіх ізоформах протеїну N-CAM1. мРНК розміром 6,7; 5,2 та 2,9 кб гібридизувалися з цією пробою в скелетних м'язах щура (Рис. 3.2.). В

препаратах скелетних м'язів щура під час раннього постнатального розвитку (перший та десятий день) виявлялися мРНК розміром 6,7; 5,2 та 2,9 кб в приблизно однаковій кількості (Рис. 3.2, треки 2 та 3). В препаратах скелетних м'язів дорослих тварин (40-й день постнатального розвитку) загальна кількість мРНК знижалася і мРНК розміром 5,2 та 2,9 кб були більш виражені ніж клас 6,7 кб (трек 4). В скелетних м'язах дев'ятимісячних щурів мРНК протеїну N-CAM1 були дуже слабо виражені, в той час як на 730-й день в скелетних м'язах спостерігалася чітко виражена експресія мРНК розміром 5,2 та 2,9 кб (Рис.3.2, треки 5 та 6). Слід сказати, що мРНК 6,7 кб не мали вираженості у м'язах старих щурів. Таким чином, під час старіння щурів у м'язів відбуваються зміни не тільки в кількості мРНК, але й змінюється експресія певних сплайс-варіантів.

Гібридизацію мРНК з пробой E16 проводили, щоб визначити, який клас мРНК протеїну N-CAM1 відповідає за синтез трансмембранної форми, оскільки, як вказувалося раніше, 16-й екзон експресується тільки в ізоформі N-CAM1, яка має трансмембранний та цитоплазматичний домени. Проба E16 гібридизувалась з мРНК 6,7 кб (Рис. 3.2, б, трек 2).



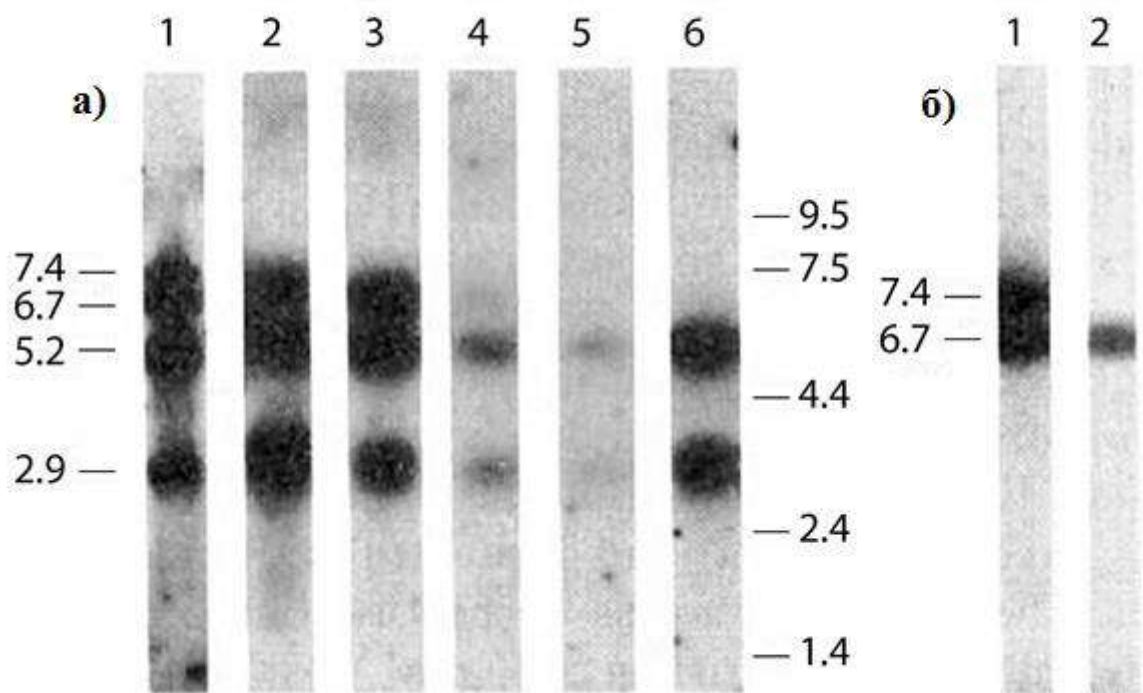


Рис. 3.2. Експресія мРНК протеїну N-CAM1 в скелетних м'язах щура під час нормального розвитку та старіння тварин (гібридизація з пробами E7 та E16).

а – проба E7, що гібридизується з мРНК препаратів головного мозку дорослого щура (1) та скелетних м'язів в різні періоди постнатального розвитку щура (2-6):

2 – 1-й день, 3 – 10-й день, 4 – 40-й день, 5 – 270-й день, 6 – 730-й день;

б – проба E16, яка специфічна для мРНК, що забезпечують синтез трансмембранних ізоформ протеїну N-CAM1.

1 – препарат головного мозку дорослого щура, 2 – препарат скелетних м'язів на 10-й день постнатального розвитку щура. В треках 1а та 1б міститься по 10 мкг мРНК, всі інші треки містять по 15 мкг мРНК. Розміри мРНК вказано зліва.

Альтернативний сплайсинг екзонів 7/8 та екзону VASE в мРНК протеїну N-CAM1 скелетних м'язів вивчали за допомогою відповідних олігонуклеотидних проб, а саме: E 7/8 та E VASE. Проба E 7/8 гібридизується з мРНК, що не має послідовності альтернативно сплайсуемого екзону VASE.

Як видно з даних нозерн-блотінгу (рис. 3.3), більшість мРНК протеїну N-CAM1 не мають у своєму складі послідовності VASE. Тільки слабка експресія цього екзону спостерігалася у препаратах скелетних м'язів на 1-й день постнатального розвитку та у м'язах старих тварин. Гібридизація з цим екзоном була характерна для мРНК розміром 5, 2 та 2,9 кб. Порівняно з експресією VASE у головному мозку щура, експресію цього екзону у скелетних м'язах можна вважати незначною.

Відомо, що існує декілька комбінацій альтернативно сплайсуємих додаткових екзонів, що розташовані між 12 та 13 екзонами [254, 255, 256, 299]. Сумісна експресія екзонів a, b, c та AAG обмежена мРНК 5,2 та 2,9 кб. Однак, мало що відомо про можливі інші комбінації цих екзонів серед сплайс-варіантів мРНК протеїну N-CAM1. Представлені дані на рис. 3.4. вказують на те, що всі розглянуті варіанти альтернативного сплайсингу між 12 та 13 екзонами мають місце серед мРНК протеїну N-CAM1. Матричні РНК протеїну N-CAM1, які не підлягали альтернативному сплайсингу між 12-м та 13-м екзонами, належали до мРНК розміром 6,7 кб. Як видно з представлених даних, проби, що відповідали альтернативно сплайсуємих мінорним екзонам гібридизувалися головним чином, з мРНК 5,2 та 2,9 кб. Гібридизація з пробой E12/a/AAG/13 виявила, що експресія комбінації екзонів 12-a-AAG-13, яка була показана для препаратів головного мозку та серцевих м'язів щура [256, 299], має місце і у разі постнатальних скелетних м'язів (рис.3.5, б). Це вказує на те, що експресія мінорного екзону «a» в скелетних м'язах відбувається незалежно від екзонів «b» та «c». Ця екзонна комбінація присутня в мРНК, що забезпечують синтез ізоформ протеїну, які прикріплюються до мембрани завдяки фосфатидилінозитоловому якорю. З іншого боку, як видно з рис. 3.4. в, фосфатидилінозитолові ізоформи протеїну N-CAM1 можуть містити послідовності, що кодуються екзонною комбінацією 12-a-b. Результати гібридизації представлено в Табл. 3.1.

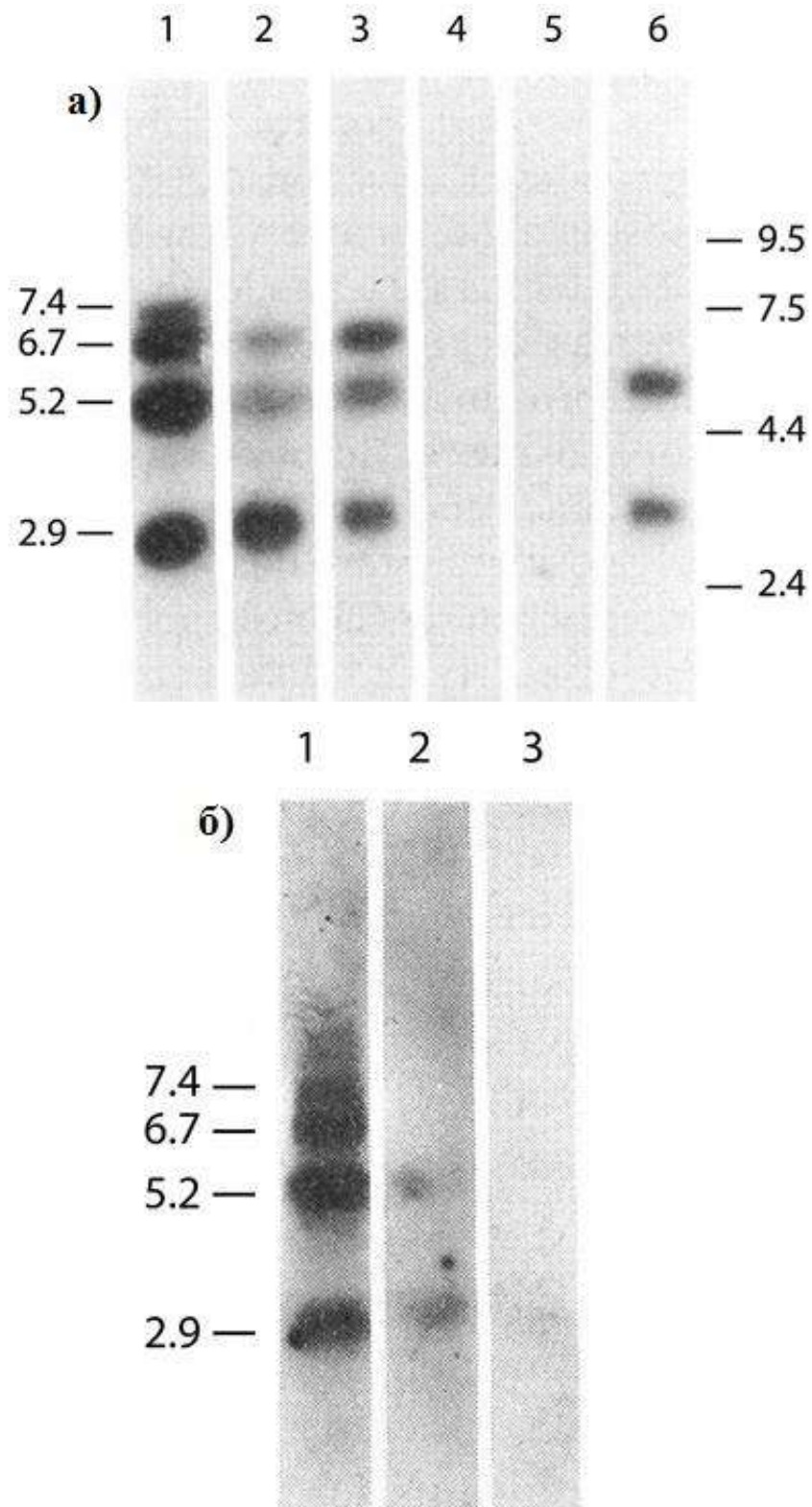


Рис. 3.3. Експресія мРНК протеїну N-CAM1 в скелетних м'язах щура під час нормального розвитку та старіння тварин (гібридизація з пробами E7/8 та EVASE).

а – проба E7/8, що гібридизується з мРНК препаратів головного мозку дорослого щура (1) та скелетних м'язів щурів різного періода постнатального розвитку (2-6):

2 – 1-й день, 3 – 10-й день, 4 – 40-й день, 5 – 279-й день, 6 – 730-й день;

б – проба EVASE, яка впізнає мРНК, що мають у своєму складі альтернативно експресуємий екзон VASE:

1 – препарат головного мозку дорослого щура, 2 – препарат скелетних м'язів, отриманий в 1-й день постнатального розвитку щура, 3 – 730-й день постнатального розвитку щура.

В треках 1а та 1б міститься по 10 мкг мРНК, всі інші треки містять по 15 мкг мРНК. Розміри мРНК вказано по боках.

Таблиця 3.1.

Експресія екзонів та їх комбінацій в мРНК, що виявляється в препаратах скелетних м'язів дорослих та старих щурів за допомогою Нозерн-блот аналізу

| Розміри мРНК | 7 | 7/8 | VASE | 12/13 | 12/a/AAG/13 | 12/a/b | 16 |
|--------------|---|-----|------|-------|-------------|--------|----|
| 6,7 кб       | + | +   | –    | +     | (+)         | (+)    | +  |
| 5,2 кб       | + | +   | (+)  | +     | +           | +      | –  |
| 2,9 кб       | + | +   | (+)  | +     | +           | +      | –  |

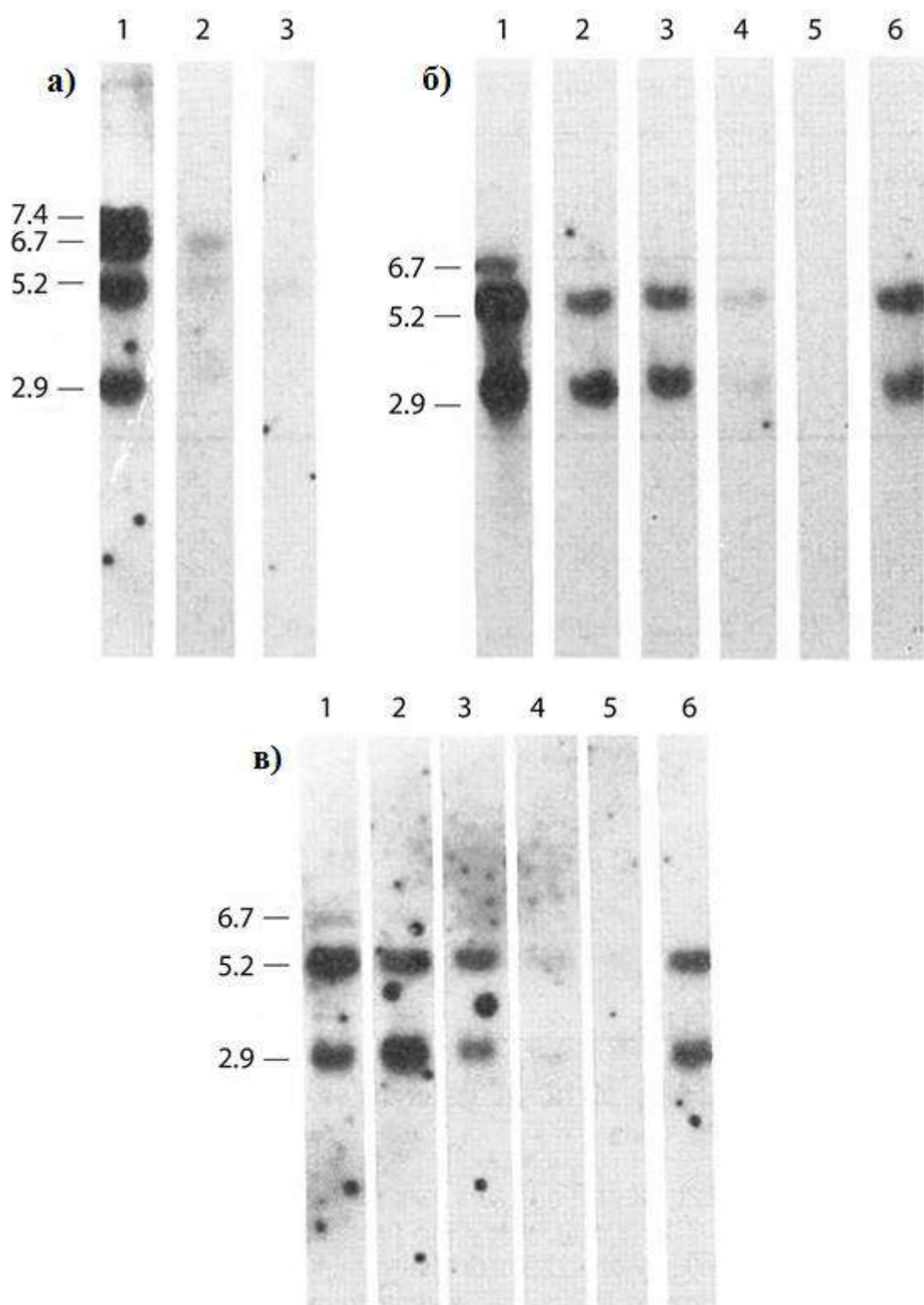


Рис. 3.4. Експресія мРНК протеїну N-CAM1 в скелетних м'язах щура під час нормального розвитку та старіння щура (гібридизація з пробамі E12/13, E12/a/AAG/13 та E12/a/b).

а – проба E12/13, що гібридизується з мРНК препаратів головного мозку дорослих тварин (1) та скелетних м'язів в різні періоди постнатального розвитку щура (2-3): 2 – 10-й день, 3 – 730-й день;

б – проба E12/a/AAG/13, яка впізнає мРНК, що мають у своєму складі відповідний альтернативно експресуємий екзон:

1 – препарат головного мозку дорослого щура, 2-6 – препарати скелетних м'язів в різні періоди постнатального розвитку щура:

2 – 1-й день, 3 – 10-й день, 4 – 40-й день, 5 – 279-й день, 6 – 730-й день;

в – проба E12/a/b, яка впізнає матричні РНК, що мають у своєму складі відповідний альтернативно експресуємий екзон: 1 – препарат головного мозку дорослого щура, 2-6 – препарати скелетних м'язів в різні періоди постнатального розвитку щура: 2 – 1-й день, 3 – 10-й день, 4 – 40-й день, 5 – 279-й день, 6 – 730-й день;

В треках 1а, 1б та 1в міститься по 10 мкг мРНК, всі інші треки містять по 15 мкг мРНК. Розміри мРНК вказано по боках.

Аналізуючи отримані дані, можна відзначити, що експресія мРНК протеїну N-CAM1 в скелетних м'язах характеризується певними змінами під час постнатального розвитку та при старінні тварин. мРНК розміром 6,7, 5,2 та 2,9 кб мали чітку вираженість в скелетних м'язах в період раннього постнатального розвитку, але в препаратах м'язів дорослих тварин їх експресія була знижена. У м'язах старих щурів спостерігається реекспресія мРНК розміром 5,2 та 2,9 кб, експресія мРНК 6,7кб залишається на невисокому рівні. Екзон VASE, який мав вираженість в мРНК при постнатальному розвитку головного мозку щура [33], в препаратах мРНК скелетних м'язів майже не виявлявся. Можна сказати, що в ізоформах протеїну N-CAM1 експресія екзону VASE має тканинно-специфічний характер. Дещо інша картина спостерігається для додаткових екзонів, що мають розташування між основними екзонами 12 та 13. Експресія різних варіантів додаткових екзонів була характерна для мРНК розміром 5,2 та 2,9

кб, в той час як в мРНК 6,7 кб вираженість була значно меншою. На сьогоднішній день не існує пояснення щодо експресії різних комбінацій додаткових екзонів групи *msd* (muscle specific domains) протеїну N-CAM1. Деякі автори отримують суперечливі дані стосовно навіть їх експресії у скелетних м'язах. Так, наприклад, Hamshire et al [300] взагалі не виявили експресії екзонної комбінації 12-a-AAG-13 в препаратах м'язів. Така розбіжність результатів може бути пояснена різною технікою експериментів та видовими особливостями тварин.

Визначення ізоформ протеїну N-CAM1 в скелетних м'язах проводили з використанням поліклональних антитіл, що впізнавали всі ізоформи цього протеїну (подробно див. Матеріали і методи). Результати дослідження приведено на рис. 3.5. Оскільки відомо, що гомогенати скелетних м'язів містять значну кількість міозину, який заважає електрофоретичному розділенню цільових протеїнів і здатен давати неспецифічну реакцію зв'язування з антитілами, для експериментів було використано фракцію супернатанта, отриманого при високих обертах (100 000 g, 1,5 години) та тритоновий солюбілізат (подробно у розділі Матеріали і методи). В тритонових солюбілізатах скелетних м'язів спостерігали присутність чотирьох поліпептидів N-CAM1 з молекулярними масами 200, 145, 125 та 120 кДа. Ізоформа N-CAM1-145 була домінуючою у всіх препаратах незалежно від віку тварини (рис. 3.5., треки 4-8). Слід зазначити, що вираженість поліпептидних зон змінювалась залежно від віку: чітка експресія під час раннього постнатального розвитку м'язів, далі – мінімальна вираженість у препаратах м'язів дорослого щура (40-й день постнатального розвитку), і реекспресія протеїну N-CAM1 в препаратах м'язів старих тварин (треки 6-8). Слід зауважити, що кількість загального протеїну в треці 6 була більш ніж в 4,5 рази вище чим в інших треках. В препаратах м'язів на ранніх стадіях постнатального розвитку спостерігається дифузне забарвлення поблизу поліпептидних зон 200 та 145 кДа та вище області 120-125 кДа. Відомо, що в головному мозку в цей період таке явище може бути викликано

присутністю полісіалюваних поліпептидів N-CAM1 [301, 302]. Щоб визначити причину дифузного забарвлення у препаратах скелетних м'язів, проби були оброблені ендосіалідазою N, яка видаляла залишки сialової кислоти. Така обробка дозволила залишити тільки чітко визначені поліпептидні зони (треки 1-3). В препаратах м'язів старих тварин дифузне забарвлення було відсутнє, що вказувало на те, що в скелетних м'язах дорослих та старих тварин ізоформи N-CAM1 або мають мінорне полісіалювання, або позбавлені його взагалі. Спостерігаємі зміни у співвідношенні сплайс-варіантів мРНК протеїну N-CAM1 під час постнатального розвитку та старіння скелетних м'язів не мають кореляції з вираженістю поліпептидних зон цього протеїну. Згідно отриманим даним, ізоформа N-CAM-145 була більш виражена у скелетних м'язах старих тварин ніж у м'язах дорослого щура. Проте спостерігаємі ефект не супроводжується підвищеною експресією мРНК розміром 6,7 кб. Це може бути пояснено двома причинами: або у м'язах старих тварин знижений катаболізм ізоформи N-CAM-145, або, навпаки, трансляційна швидкість мРНК 6,7 кб підвищена порівняно зі сплайс-варіантами мРНК 5,2 та 2,9 кб.

Трансmemбранні поліпептиди N-CAM1 скелетних м'язів визначали за допомогою моноклональних антитіл OV11, які реагували з цитоплазматичним епітопом, що мав спільність з трансmemбранними ізоформами N-CAM-190 та N-CAM-135 з головного мозку щурів (рис. 3.5, трек 11). Як свідчать наведені дані, в скелетних м'язах щура ізоформи N-CAM1 з молекулярними масами 200 та 145 кДа мали у своєму складі цитоплазматичний епітоп.

Дані іммуноблоттінгу виявили наявність «розчинних» ізоформ протеїну N-CAM1 у скелетних м'язах. Це поліпептиди з молекулярною масою 200, 145, 125 та 120 кДа (рис. 3.5, трек 9). Природа появи «розчинних» ізоформ протеїну N-CAM1 з молекулярними масами 200 та 145 кДа залишається й досі невиясненою. Є дані, що свідчать про наявність таких ізоформ з близькими значеннями молекулярних мас у головному мозку та



цереброспинальній рідині щура [303]. «Розчинні» ізоформи з молекулярною масою 120-125 кДа є ізоформами, що кріпляться до мембрани завдяки фосфатидилінозитоловому якорю. За певних умов вони легко відокремлюються від мембрани та переходять у розчинний стан. Так, було показано, що ізоформа N-CAM-125 відокремлювалась від поверхні міотубів в первинній культурі м'язових клітин після обробки цієї культури фосфатидил інозитол-специфічною фосфоліпазою C [304, 305]. Деякі автори спостерігали спонтанне відокремлення заякорених ізоформ протеїну N-CAM1 в культурі клітинних м'язів [305, 306]. Попередні дослідження стосовно визначення ізоформ протеїну N-CAM1 в скелетних м'язах дали суперечливі результати. За даними деяких авторів, в нормальних постнатальних скелетних м'язах визначається основна поліпептидна ізоформа цього протеїну з молекулярною масою 140-145 кДа [307, 308]. В той же час, в культурі постфузійних м'язів та в первинних культурах міотубів домінантна ізоформа протеїну N-CAM1 представлена поліпептидом з молекулярною масою 125кДа [304, 307]. Слід зазначити, що клітини м'язів, які знаходяться в культурі не мають нейрональної стимуляції. Попередні дослідження проведені на денервованих м'язах показали, що нейрональна стимуляція впливає на рівень експресії протеїну N-CAM1 в скелетних м'язах [309, 310].

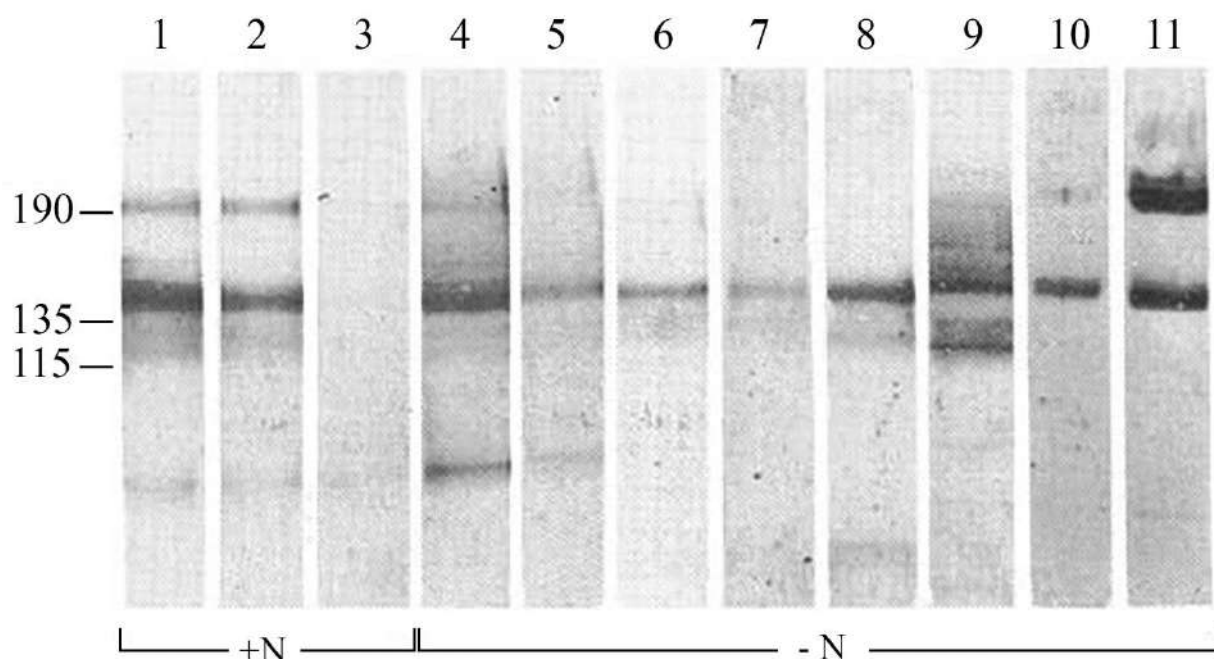


Рис. 3.5. Результати імуноблотінгу ізоформ протеїну N-CAM1, що спостерігаються в скелетних м'язах щура під час розвитку та старіння.

Зразки в треках 1-3 були оброблені ендосіалідазою N (+N), в треках 4-11 обробки не було (-N). Препарати мембран скелетних м'язів на перший день постнатального розвитку (треки 1 та 4), на 10-й день – треки 2 та 5, на 40-й день – треки 3 та 6, на 270-й день – трек 7, на 730-й день – трек 8. Супернатант з скелетних м'язів щурів першого дня постнатального розвитку – трек 9, очищений препарат протеїну N-CAM1 з скелетних м'язів щурів першого дня постнатального розвитку – трек 10, препарат мембранної фракції головного мозку щура на 40-й день постнатального розвитку – трек 11. Треки 1-9 були проінкубовані з поліклональними антитілами проти протеїну N-CAM1, треки 10-11 були проінкубовані з монклональними антитілами проти протеїну N-CAM1, OB11, що реагують з епітопами цитоплазматичного домену протеїну. Треки 1-5 з одного гелю, 7-9 та 10-11 – з інших, електрофорез був проведений за однакових умов. Загальна кількість протеїну в треках складала 13 мкг (трек 1-5, 7 та 8), 60 мкг в треку 6 та 110 мкг в треку 9. Молекулярні маси ізоформ протеїну N-CAM1 з головного мозку дорослого щура (Р 40) позначені зліва.

Можна припустити, що нейрональна стимуляція здатна здійснювати регулюючий ефект на експресію окремих ізоформ протеїну N-CAM1.

Визначення кількості протеїну N-CAM в препаратах скелетних м'язів проводили з використанням імуноферментного аналізу (Рис. 3.6). Як свідчать приведені дані, кількість протеїну N-CAM знижувалась протягом постнатального розвитку м'язів, досягаючи мінімального значення у препаратах скелетних м'язів дорослих щурів. На перший день постнатального розвитку щура кількість протеїну N-CAM в скелетних м'язах складала  $1,21 \pm 0,44$  мкг/мг загального протеїну, на сороковий день –  $0,063 \pm 0,008$  мкг/мг загального протеїну. В м'язах старих щурів кількість протеїну N-CAM була підвищена, і складала  $0,37 \pm 0,011$  мкг/мг загального протеїну на 730 день постнатального розвитку тварин.

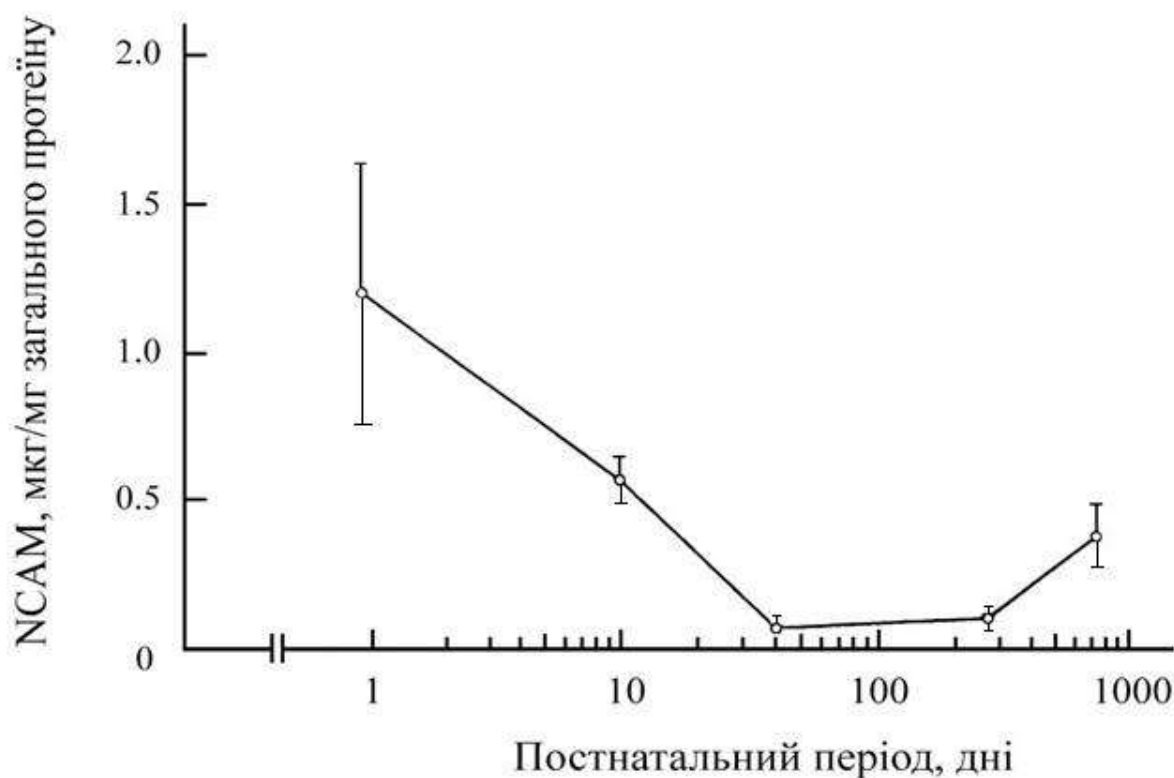


Рис. 3.6. Кількість протеїну N-CAM1 в скелетних м'язах щура в різні періоди постнатального розвитку. Результати імуноферментного аналізу виражені в мкг/мг загального протеїну.

Отримані дані узгоджуються з попередніми результатами авторів, що вивчали кількість протеїну N-CAM1 в період постнатального розвитку скелетних м'язів [309, 311]. Концентрація протеїну N-CAM1 в старих м'язах близька до значення, що отримали Covault та спів. для денервованих м'язів [309]. Вважають, що повільні процеси денервації-реінервації відбуваються протягом всього періоду функціонування скелетних м'язів [312]. В попередніх дослідженнях було показано, що денервовані м'язи та старі м'язи характеризуються схожими змінами стосовно властивостей міофібрил [313]. Під час старіння м'язів спостерігають зниження кількості м'язових фібрил та моторних одиниць у людей та гризунів [314, 315]. Припускають, що зниження кількості м'язових фібрил виникає внаслідок втрати цілих моторних одиниць та неповної реіннервації денервованих м'язових фібрил моторними нейронами, які залишилися. Це викликано порушенням аксональної регенерації у старих щурів [316]. Підвищений рівень протеїну N-CAM1 у скелетних м'язах старих тварин повністю відповідає такому припущенню.

#### Висновки:

1. Визначено мРНК, що відповідають за синтез ізоформ протеїну N-CAM1 у скелетних м'язах.
2. Під час постнатального розвитку скелетних м'язів експресія мРНК, що кодують протеїн N-CAM1 знижується, а під час старіння – підвищується.
3. Додатковий екзон VASE, для якого показана експресія в мРНК головного мозку та серцевих м'язах, у скелетних м'язах практично не визначався.
4. Додаткові м'язево-специфічні екзони та їх комбінації мали виражену експресію у скелетних м'язах, експресія цих екзонів пов'язана головним чином з мРНК 5,2 та 2,9 кб.

5. Не показано відповідності між ступенем експресії мРНК та вираженістю відповідних поліпептидних ізоформ протеїну N-CAM1 у скелетних м'язах.

6. Кількість протеїну N-CAM1 у скелетних м'язах знижувалась під час постнатального розвитку та підвищувалась під час старіння, що свідчить про залучення цього протеїну до компенсаторних механізмів, які мають місце у м'язах під час старіння ссавців.

### **3.2. Нейрональний протеїн клітинної адгезії N-CAM1 під час постнатального розвитку та старіння серцевих м'язів щура**

Серцеві м'язи заслуговують окремої уваги оскільки, як було показано в попередніх дослідженнях, структурні, механічні та біохімічні зміни, які відбуваються в м'язах при старінні мають свої особливості [317]. Для серцевих м'язів старих ссавців є характерними втрата міоцитів та міоцитна гіпертрофія [318]. За думкою деяких авторів [319], гіпертрофія міокарду характеризується змінами в експресії протеїну N-CAM1. В розділі представлено дані стосовно експресії різних сплайс-варіантів мРНК в серцевій тканині, проведено аналіз поліпептидних ізоформ в препаратах серцевих м'язів в різні періоди постнатального розвитку та при старінні щурів, та зроблено визначення кількості протеїну N-CAM1 за цих умов.

Особливості експресії мРНК в серцевих м'язах визначали з пробами, які були використані для аналізу скелетних м'язів (див. попередній розділ). Як видно з рис. 3.7, проба E7 гібридизувалася з трьома сплайс-варіантами мРНК в серцевих м'язах – 6,7; 5,2 та 2,9 кб. В деяких треках спостерігається дуже слабка експресія мРНК 4,3 кб. У препаратах серцевих м'язів на відміну від препаратів з головного мозку щура гібридизації проби E7 з мРНК розміром 7,4 кб не зареєстровано. В перший день постнатального розвитку мРНК розміром 6,7; 5,2 та 2,9 протеїну N-CAM1 присутні в приблизно однаковій кількості (трек 2). Подалі, під час постнатального розвитку та

старіння м'язів мРНК 5,2 та 2,9 кб мають значно більшу вираженість порівняно з мРНК 6,7 кб (треки 3-6).

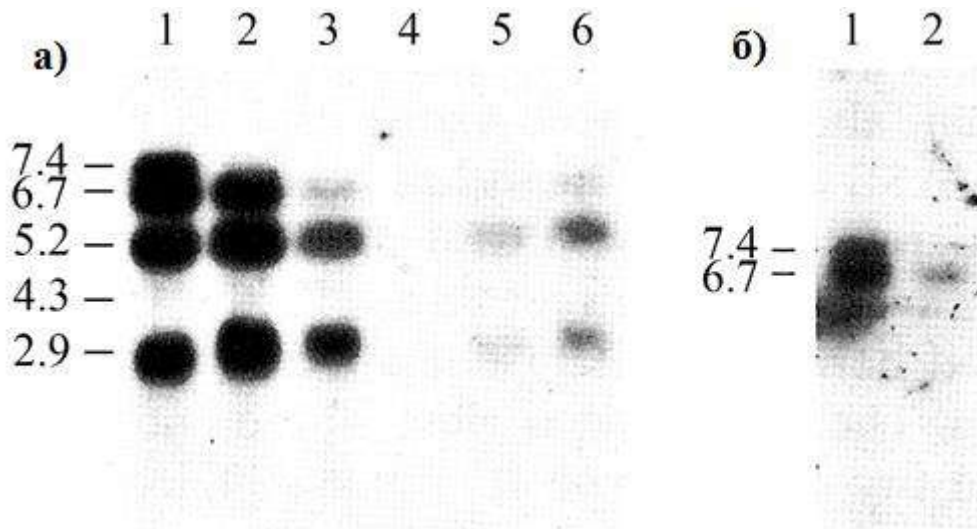


Рис. 3.7. Експресія мРНК протеїну N-CAM1 в серцевих м'язах щура під час нормального розвитку та старіння щура (гібридизація з пробами E7 та E16). а – проба E7, що гібридизується з мРНК препаратів головного мозку дорослих щурів (1) та серцевих м'язів в різні періоди постнатального розвитку щура (2-6): 2 – 1-й день, 3 – 10-й день, 4 – 40-й день, 5 – 270-й день, 6 – 730-й день; б – проба E16, яка специфічна для мРНК, що забезпечують синтез трансмембранних ізоформ протеїну N-CAM1. 1 – препарат головного мозку дорослого щура, 2 – препарат серцевих м'язів на 1-й день постнатального розвитку тварини. Всі треки містили однакову кількість мРНК. Розміри мРНК вказано зліва.

Загальна кількість мРНК, що кодують протеїн N-CAM1, знижувалась під час постнатального розвитку, досягаючи мінімального значення у серцевих м'язах дорослих тварин на 40-й день постнатального розвитку. В серцевих м'язах старих щурів, як це було нами показано в разі скелетних м'язів, спостерігається реекспресія мРНК протеїну N-CAM1, причому,

виражена експресія для всіх трьох варіантів. Як видно з рис. 3.7 б, проба E16 гібридизувалась з мРНК 6,7 кб, що свідчить про те, що саме цей клас матричних РНК відповідає за синтез трансмембранної ізоформи протеїну N-CAM1. На відміну від скелетних м'язів, в серцевих м'язах спостерігалася виражена гібридизація EVASE з відповідними мРНК протеїну N-CAM1, а саме – 6,7; 5,2 та 2,9 кб (рис. 3.8).

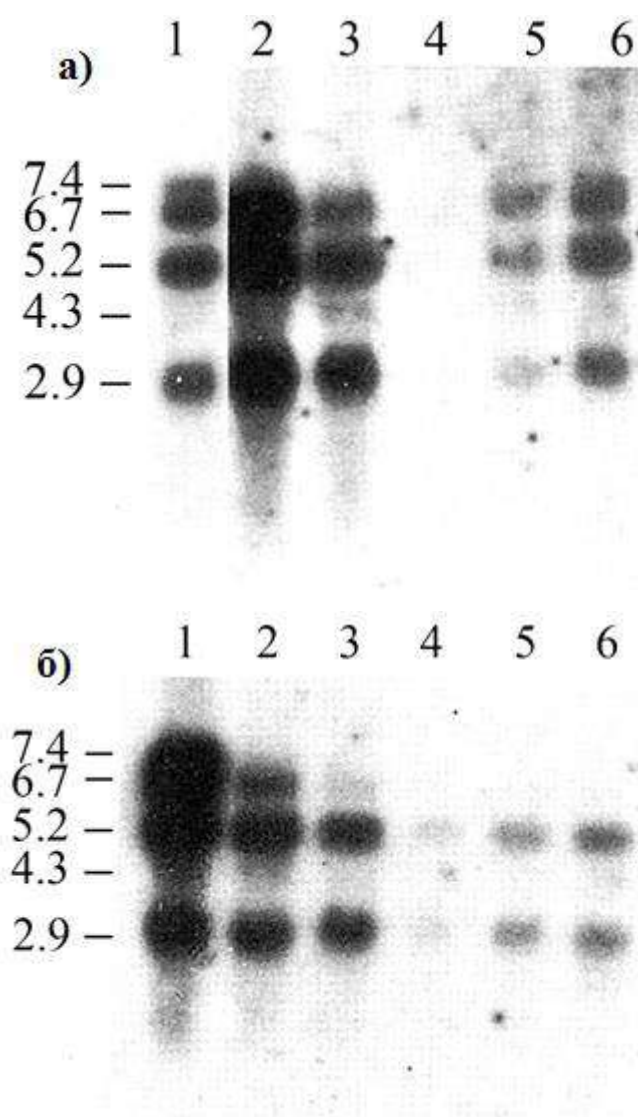


Рис. 3.8. Експресія мРНК протеїну N-CAM1 в серцевих м'язах щура під час нормального розвитку та старіння щура (гібридизація з пробами E7/8 та EVASE).

а – проба E7/8, що гібридизується з мРНК препаратів головного мозку дорослого щура (1) та серцевих м'язів в різні періоди постнатального розвитку щура (2-6):

2 – 1-й день, 3 – 10-й день, 4 – 40-й день, 5 – 270-й день, 6 – 730-й день;

б – проба EVASE, яка специфічна для мРНК, що містять в своєму складі альтернативно експресуємий екзон.

1 – препарат головного мозку дорослого щура, 2-6 – препарати серцевих м'язів щура в різні періоди постнатального розвитку: 2 – 1-й день, 3 – 10-й день, 4 – 40-й день, 5 – 270-й день, 6 – 730-й день.

Всі треки містили однакову кількість мРНК. Розміри мРНК вказано зліва.

Кількість мРНК 6,7 кб з екзоном VASE знижувалась під час постнатального розвитку серцевих м'язів, в той час як кількість мРНК 5,2 та 2,9 кб зберігалася на досить високому рівні і під час постнатального розвитку, і при старінні. Для дослідження альтернативного сплайсингу додаткових м'язево-специфічних екзонів в препаратах серцевих м'язів було використано проби E12/13 та E12/a/AAG/13. Як видно з наведених даних (рис. 3.9), проба E12/13 впізнавала три мРНК розміром 6,7, 5,2 та 2,9 кб в препаратах серцевих м'язів як під час постнатального розвитку, так і при старінні. Слід зазначити, що експресія додаткових м'язевих екзонів знижувалась в мРНК 6,7 кб під час постнатального розвитку, в мРНК розміром 5,2 та 2,9 кб таких виражених змін не зареєстровано (рис. 3.9.б).

Аналізуючи отримані дані, можна сказати, що за допомогою нозерн-блоттінгу в скелетних та серцевих м'язах, на відміну від головного мозку, практично не визначається мРНК розміром 7,4 кб. Однак, відповідна ізоформа протеїну N-CAM1 визначається методом імуноблоттінгу і проведена авторами роботи [299] ПЛР ампліфікація мРНК серцевих м'язів щура виявляє присутність мРНК цього розміру. Можна зробити висновок, що мРНК 7,4 кб знаходиться в невеликій кількості в скелетних та серцевих м'язах і тому не реєструється методом нозерн-блоттінгу. Експресія екзону



VASE була найбільш вираженою в серцевих м'язах раннього постнатального періоду, що узгоджувалось з попередніми даними отриманими [299].

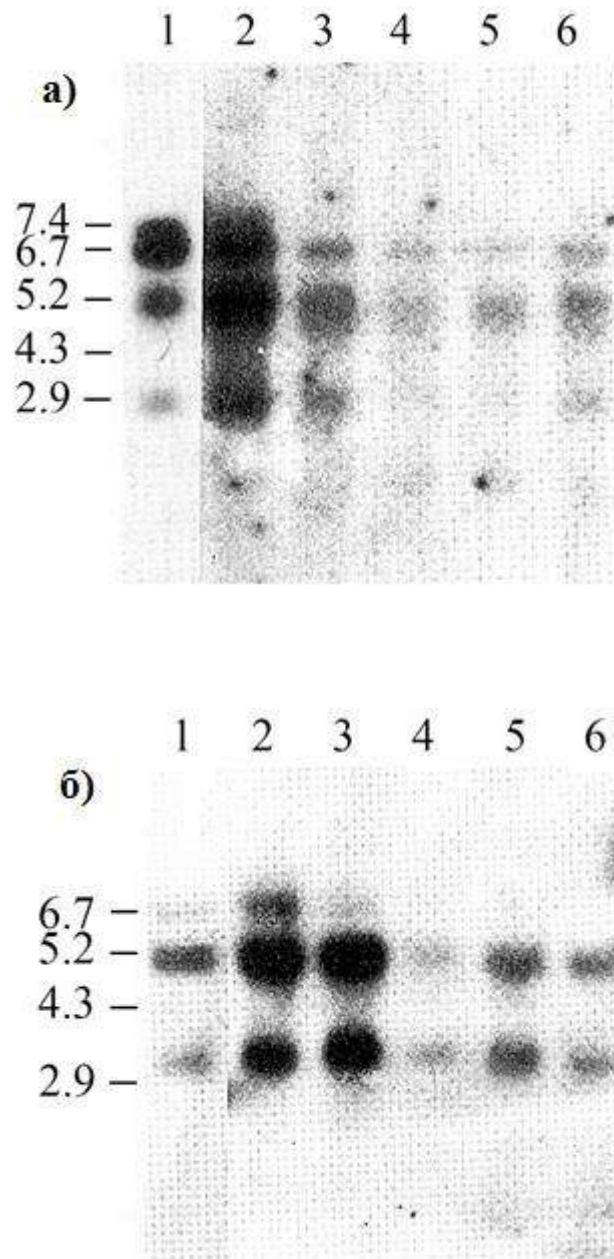


Рис. 3.9. Експресія мРНК протеїну N-CAM1 в серцевих м'язах щура під час нормального розвитку та старіння щура (гібридизація з пробами E12/13 та E12/a/AAG/13).

а – проба E12/13, що гібридизується з мРНК препаратів головного мозку дорослого щура (1) та серцевих м'язів щура в різні періоди постнатального розвитку (2-6):

2 – 1-й день, 3 – 10-й день, 4 – 40-й день, 5 – 270-й день, 6 – 730-й день;

б – проба E12/a/AAG/13, яка специфічна для мРНК, що містять в своєму складі альтернативно експресуємий екзон.

1 – препарат головного мозку дорослого щура, 2-6 – препарати серцевих м'язів щура в різні періоди постнатального розвитку: 2 – 1-й день, 3 – 10-й день, 4 – 40-й день, 5 – 270-й день, 6 – 730-й день;

Всі треки містили однакову кількість мРНК. Розміри мРНК вказано зліва.

Під час постнатального розвитку експресія VASE помітно знижувалася в мРНК 6,7 кб, але залишалася на високому рівні в мРНК 5,2 та 2, 9 кб. Слід сказати, що для головного мозку щура характерна вираженість для мРНК, що кодують трансмембранні ізоформи [302]. Було показано, що трансмембранні ізоформи протеїну [320] N-CAM1 не відрізняються від фосфатидилінозитолових ізоформ за адгезивними властивостями, тому значення експресії VASE для старих серцевих м'язів залишається невизначеним. Завдяки ПЛР аналізу в серцевих м'язах гризунів було знайдено такі комбінації додаткових м'язевих екзонів: 12/13, 12/AAG/13, 12/a/AAG/13, 12/a/b/AAG/13 та 12/a/b/AAG/13 [299]. В представленій роботі нами було показано, що експресія додаткових екзонів а та ААГ є більш вираженою в класах мРНК 5,2 та 2,9 кб, ніж у класі 6,7 кб. Схожий розподіл виявлено у головному мозку та скелетних м'язах щура [40, 256, 321]. Вважають, що експресія екзону а забезпечує появу чотирьох пролинових залишків, які в свою чергу, сприяють гнучкості молекули протеїну і, таким чином, впливають на його адгезивні властивості [35, 322]. Представлені нами дані дозволяють припустити, що альтернативний сплайсинг між 12-м та 13-м екзонами має особливості регуляції в різних класах мРНК протеїну N-CAM1.

Результати дослідження молекулярних ізоформ протеїну N-CAM1 в серцевих м'язах щура приведено на рис. 3.10. Як свідчать результати іммуноблоттингу з поліклональними антитілами до протеїну N-CAM1, в препаратах серцевих м'язів, отриманих на різних стадіях постнатального розвитку, спостерігали три головні ізоформи з молекулярними масами 190,

145 та 120 кДа. Причому, ізоформа ізоформою N-CAM-145 мала найкращу вираженість (треки 2-6). В деяких пробах спостерігається ізоформа з молекулярною масою 165 кДа.

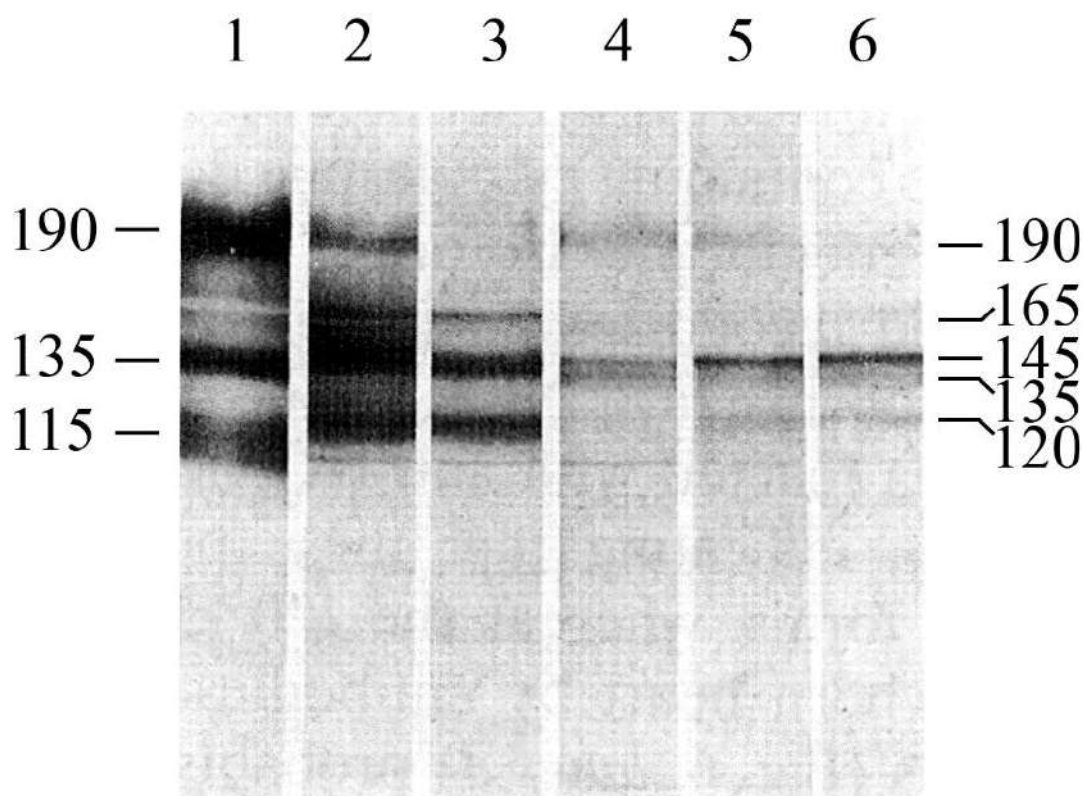


Рис.3.10. Результати імуноблотінгу ізоформ протеїну N-CAM1, що спостерігаються в серцевих м'язах щура під час розвитку та старіння.

1 – препарат мембранної фракції головного мозку щура на 40-й день постнатального розвитку, 2-6 – препарати серцевих м'язів щура в різні періоди постнатального розвитку: 2 – 1-й день, 3 – 10-й день, 4 – 40-й день, 5 – 270-й день, 6 – 730-й день; Блот був проінкубован з поліклональними антитілами проти протеїну N-CAM1. Молекулярні маси ізоформ протеїну N-CAM1 з головного мозку дорослого щура (Р 40) позначені зліва, а молекулярні маси ізоформ з серцевих м'язів – справа.

В препаратах серцевих м'язів дорослих та старих щурів зона, що відповідає протеїну N-CAM1 з молекулярною масою 145 кДа, з'являється у вигляді подвійної смуги з молекулярними масами 145 та 135 кДа. В препаратах серцевих м'язів старих щурів поліпептиди N-CAM-145 та N-CAM-120 мають підвищену вираженість. В препаратах серцевих м'язів в перший день постнатального розвитку спостерігається дифузне забарвлення, що викликано присутністю полісіалюваних поліпептидів N-CAM1. В препаратах м'язів старих щурів дифузне забарвлення було відсутнє, що вказувало на те, що в м'язах дорослих та старих тварин ізоформи N-CAM1 або мають мінорне полісіалювання, або позбавлені його взагалі. Трансмембранні поліпептиди N-CAM1 в серцевих м'язах визначали за допомогою антитіл anti-N-CAM1-сyt, що впізнавали ізоформи протеїну N-CAM1 з цитоплазматичними доменами. Як видно з рис. 3.11. в препаратах головного мозку дорослих щурів ці антитіла розпізнавали ізоформи з молекулярною масою 180 та 140 кДа (трек 2). В препаратах серцевих м'язів щура на перший день постнатального розвитку визначалися три трансмембранні ізоформи протеїну N-CAM1: N-CAM-190, N-CAM-165 та N-CAM-145 (трек 4). Ізоформа N-CAM-120, що визначалася за допомогою антитіл, реагуючих з усіма ізоформами протеїну, відповідала протеїну, який закріплений до мембрани завдяки фосфатидилінозитоловому якорю (трек 3). Спостережуванні зміни у співвідношенні мРНК протеїну N-CAM1 в серцевих м'язах, отриманих в різні періоди постнатального розвитку тварин, як і в разі скелетних м'язів, не мають кореляції з вираженістю поліпептидних зон цього протеїну. Згідно отриманим даним, ізоформа N-CAM-145 була домінантною у серцевих м'язах, проте це не супроводжувалось підвищеною експресією мРНК розміром 6,7 кб. Навпаки, експресія мРНК 6,7 кб знижувалась під час постнатального розвитку щура. Це може бути пояснено двома причинами: зниженим катаболізмом ізоформи N-CAM-145 у м'язах старих щурів, або підвищеною трансляційною швидкістю мРНК 6,7 кб.

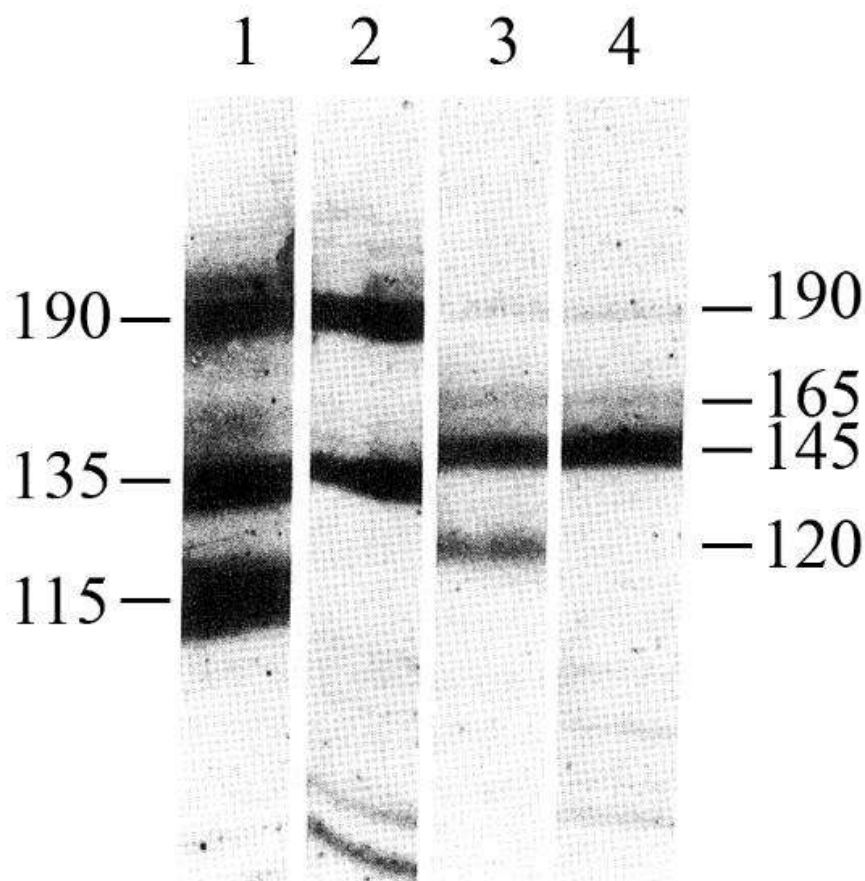


Рис. 3.11. Результати імуноблотінгу ізоформ протеїну N-CAM1, що містять у своєму складі трансмембранний та цитоплазматичний домени (мембранні фракції головному мозку та серцевих м'язів щура).

Мембранні фракції головного мозку дорослого щура на 40-й день постнатального розвитку (треки 1 та 2), і мембранні фракції серцевих м'язів щура в перший день постнатального розвитку (треки 3 та 4), інкубували з поліклональними антитілами до протеїну N-CAM1, що впізнавали всі ізоформи N-CAM1 (треки 1 та 3) або з поліклональними антитілами anti-N-CAM1-cyt, що впізнавали ізоформи, які містили у своєму складі трансмембранний та цитоплазматичний домени (треки 2 та 4).

Молекулярні маси ізоформ протеїну N-CAM1 з головного мозку дорослого щура (40-й день постнатального розвитку) позначені зліва, а молекулярні маси ізоформ з серцевих м'язів – справа.

Визначення кількості протеїну N-CAM в препаратах серцевих м'язів проводили з використанням імуноферментного аналізу (рис. 3.12). Згідно приведених даних, кількість протеїну N-CAM знижувалась протягом постнатального розвитку м'язів, досягаючи мінімального значення у препаратах скелетних м'язів дорослих щурів. На перший день постнатального розвитку щура кількість протеїну N-CAM в скелетних м'язах складала  $0,93 \pm 0,14$  мкг/мг загального протеїну, на сороковий день –  $0,21 \pm 0,01$  мкг/мг загального протеїну. В м'язах старих щурів кількість протеїну N-CAM була підвищена, і складала  $0,34 \pm 0,05$  мкг/мг загального протеїну на 730 день постнатального розвитку тварин.

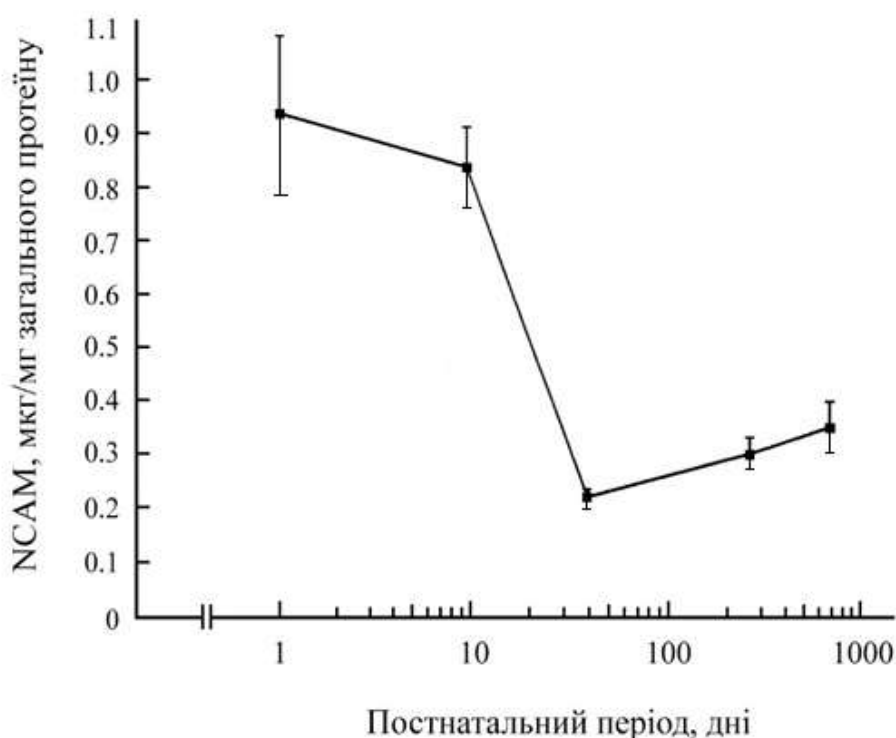


Рис. 3.12. Кількість протеїну N-CAM1 в серцевих м'язах в різні періоди постнатального розвитку щура.

Результати імуноферментного аналізу виражені в мкг/мг загального протеїну.

Отримані результати стосовно експресії N-CAM1 в серцевих м'язах показали високий рівень експресії цього протеїну в період раннього постнатального розвитку, мінімальний рівень в період дорослого стану тварини і підвищений вміст при старінні. Підвищений вміст N-CAM1 було зафіксовано в попередніх дослідженнях при гіпертрофічних змінах в міокарді щурів під час експериментальної гіпоксії [319]. Структурно-функціональні зміни, що відбуваються при старінні щурів нагадують ті, що спостерігаються при гіпертрофії серцевого м'язу [323]. Можна припустити, що підвищений вміст протеїну N-CAM1 в серцевих м'язах старих щурів може бути наслідком гіпертрофічних змін і являє собою компенсаторну відповідь на втрату м'язових фібрил [317].

#### Висновки:

1. Визначено мРНК, що відповідають за синтез ізоформ протеїну N-CAM1 у серцевих м'язах.
2. Додатковий екзон VASE мав виражену експресію в мРНК серцевих м'язів, в період старіння тварин, його експресія була пов'язана з мРНК 5,2 та 2,9 кб.
3. Додаткові м'язево-специфічні екзони розташовані між 12-м та 13-м екзонами мали виражену експресію у серцевих м'язах, експресія цих екзонів пов'язана головним чином з мРНК 5,2 та 2,9 кб.
4. Не показано відповідності між ступенем експресії мРНК та вираженістю відповідних поліпептидних ізоформ протеїну N-CAM1 у серцевих м'язах.
5. Виявлено ізоформи протеїну N-CAM1 з молекулярними масами 190, 165, 145 та 125 кДа. Ізоформа N-CAM-145 була домінуючою під час постнатального розвитку тварин.
6. Кількість протеїну N-CAM1 у серцевих м'язах знижувалась під час постнатального розвитку та підвищувалась під час старіння, що свідчить про

функціональні зміни пов'язані з компенсаторними змінами, що відбуваються у м'язах старих тварин.

### **3.3. Визначення аутоантитіл до нейронального протеїну клітинної адгезії N-CAM1 в сироватці хворих з гострою формою шизофренії**

Шизофренія – хронічне захворювання, від якого страждає приблизно 1% від загальної кількості населення світу. На жаль, незважаючи на велику кількість досліджень в цій області, етіологія та патофізіологія цього захворювання залишаються нез'ясованими. Було визначено, що шизофренія – це мультифакторне порушення головного мозку, що викликано генетичними та соціальними факторами [324]. При цьому захворюванні були зафіксовані зміни в розмірі нейронів та порушення нормального розгалуження нервових клітин. Встановлено, що ці зміни можуть розвиватися протягом життя, а не тільки пов'язані з пре- або перинатальним періодом, як вважалося раніше [325]. Оскільки молекули клітинної адгезії (зокрема протеїни імуноглобулінового родини та кадгерини) залучені до процесів міграції нейронів, формування синапсів, диференціювання сірої речовини та ін., цілком природно, що нервово-психічні захворювання, такі як епілепсія, аутизм та шизофренія пов'язані з порушенням роботи генів адгезивних нейрональних протеїнів. Так, наприклад, було визначено, що делеція між двома кадгериновими генами CDH12 та CDH18, що розташовані на 5 хромосомі, є фактором ризику для розвитку шизофренічної хвороби [326]. CDH12 та CDH18 кодують нейрональні кадгеринові протеїни другого типу – на відміну від класичних кадгеринів в них відсутня впізнавальна послідовність HAV. Стосовно адгезивних протеїнів імуноглобулінового родини було показано, що у хворих на шизофренію в гіпокампі, корових структурах мозку та в спино-мозковій рідині визначається підвищений рівень деградованої форми протеїну N-CAM1 [6]. Автори роботи вважають, що поява цієї форми протеїну пов'язана з протеолітичним розщепленням



ізоформи N-CAM-180. У зв'язку з актуальністю своєчасної діагностики та лікування тяжких нервово-психічних розладів набуває значення розробка діагностичних тест-систем. Важливим етапом в цьому напрямку слід вважати експерименти, в результаті яких були виявлені аутоантитіла до певних адгезивних протеїнів у сироватці людей з нервово-психічними розладами [327]. Відповідно до цього нами було запропоновано серію досліджень з метою визначення наявності аутоантитіл до протеїну N-CAM1 у сироватці хворих з гострою формою шизофренії [328, 329]. Кров хворих з гострою формою шизофренії центрифугували при 3000 об./хв протягом 5 хвилин. Отримані супернатанти подалі використовували для імуноблотингу. Фракції мембранних та цитоскелетних протеїнів з мозку людини отримували як описано в роботі [330]. Подалі ці фракції розділяли за допомогою електрофорезу в ПААГ (градієнт 7,5-17,5, з додаванням ДСН). Після закінчення електрофорезу фракції відмивали (0,025 М трис-гліциновий буфер рН 8,3), та переносили поліпептидні зони на нітроцелюлозну мембрану за допомогою блоттера (0,2 М трис-гліциновий буфер рН 8,3 з 20% метанолу, струм 100 мА, 120 хвилин). Нітроцелюлозну мембрану було розділено на 2 частини, першу використовували для виявлення аутоантитіл, що реагують з антигенами нервової тканини, другу – для ідентифікації відповідних протеїнів за допомогою моноспецифічних антисироваток. В обох випадках на першому етапі мембрану блокували розчином бичачого сироваточного альбуміну (1%) в забуференому фізрозчині (37°C, 60 хвилин). Далі першу частину інкубували з сироваткою хворих з гострою формою шизофренії (розведення 1:250, 12 годин, 4°C). Після цього цю частину мембрани інкубували з антитілами до імуноглобулінів людини, які конюговані з пероксидазою (37°C, 60 хвилин). Другу частину мембрани після блокування інкубували з моноспецифічною кролячою антисироваткою проти нейроспецифічного протеїну N-CAM1 (розведення 1:1000) та протеїнів нейрофіламентів (розведення 1:500). Наступний шар антикролячих антитіл мічених пероксидазою наносили як і в попередньому випадку. Виявлення зон

проводили у 0,05 М трис-буфері рН 7,4, що містив 0,01% діамінобензидин та 0,05% пероксид гідрогену. Типові результати експериментів наведено на рис. 3.13.

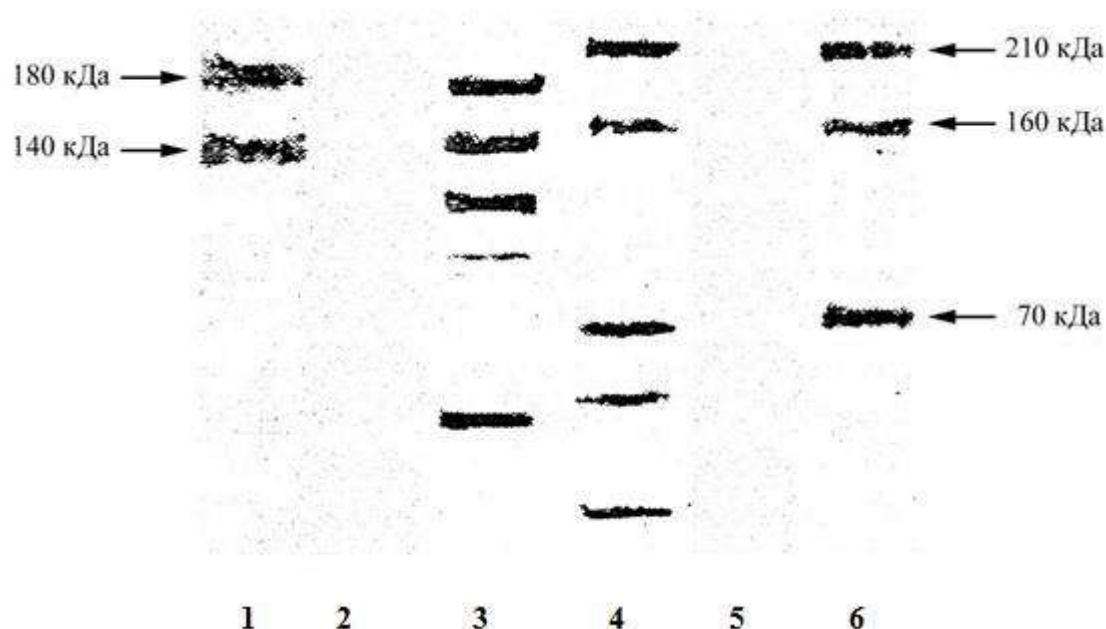


Рис. 3.13. Імуноблотинг мембранних (1,2,3) та цитоскелетних (4,5,6) фракцій протеїнів мозку людини з антисироватками до нейроспецифічних протеїнів (1 – до протеїну N-CAM1, 6 – до протеїнів нейрофіламентів) та з сироваткою хворого з гострою формою шизофренії (3,4); 2,5 – сироватка здорового донору (контроль).

Імуноблотинг мембранної фракції протеїнів мозку людини з антисироваткою проти N-CAM1 (1), з сироваткою хворого з гострою формою шизофренії (2), імуноблотинг цитоскелетної фракції протеїнів мозку людини з сироваткою хворого з гострою формою шизофренії (3), імуноблотинг цитоскелетної фракції протеїнів мозку людини з антисироваткою проти нейрофіламентів (4).

Як видно з наведених даних, в сироватці крові хворих з гострою формою шизофренії присутні аутоантитіла, що реагують з поліпептидами мембранної та цитоскелетної фракції протеїнів головного мозку людини. В мембранній фракції було виявлено поліпептиди N-CAM1 з молекулярними

масами 140 та 180 кДа, в цитоскелетній фракції – поліпептидні зони, що відповідають нейрофіламентним протеїнам з молекулярними масами 70, 160 та 210 кДа. Слід зауважити, що в сироватці здорових донорів аутоантитіла до нейрональних адгезивних протеїнів не визначаються.

Про наявність в сироватці хворих з нервово-психічними розладами нейрональних протеїнів та аутоантитіл до них повідомлялося і раніше. Так, у сироватці хворих з сенільною хворобою Альцгеймера було виявлено імуноглобуліни, що реагують з нейроспецифічним протеїном S-100 [331]. При хворобі Альцгеймера спостерігають також підвищення рівня протеїну N-CAM1 у сироватці пацієнтів [332]. Крім того, було заявлено про наявність аутоантитіл до рецепторів NMDA, AMPA та GABA у спинномозковій рідині хворих з психічними порушеннями [333].

Отримані дані вказують, що порушення у нервовій системі корелюють зі змінами в імунній системі. Наразі проведені нами експерименти щодо виявлення аутоантитіл у сироватці хворих з гострою формою шизофренії можуть бути використані при розробці діагностичного тесту. До того ж, слід вказати, що видалення аутоантитіл проти протеїнів клітинної поверхні імунотерапевтичними методами призводило до покращання стану пацієнтів на певній стадії шизофренічної хвороби [334].

#### Висновки:

1. В сироватці крові хворих з гострою формою шизофренії присутні аутоантитіла, що реагують з поліпептидами мембранної та цитоскелетної фракції протеїнів головного мозку людини. В контрольних сироватках реакція не спостерігалась.

2. В мембранній фракції було виявлено поліпептиди N-CAM1 з молекулярними масами 140 та 180 кДа, в цитоскелетній фракції – поліпептидні зони, що відповідають нейрофіламентним протеїнам з молекулярними масами 70, 160 та 210 кДа.

### **3.4. Нейрональний протеїн кальцій-залежної адгезії N-кадгерин під час постнатального та ембріонального розвитку тканин ссавців**

Для дослідження тканинного розподілу протеїнів кадгеринової родини було використано специфічні олігонуклеотидні зонди. Проба N-cad II (нуклеотидна послідовність 457-495) розпізнає регіон в N-кадгеринових матричних РНК, що кодує послідовність пептида, який відокремлюється від зрілої молекули в результаті посттрансляційних змін. Ця проба має найменшу ступінь гомології з E-кадгерином (44%) та P-кадгерином (49%) і, таким чином, могла бути використана для специфічного розпізнавання N-кадгеринових мРНК. Проби E-cad I (нуклеотидна послідовність 876-908) та P-cad I (нуклеотидна послідовність 792-823) розпізнають відповідно регіони в E- та P-кадгеринових матричних РНК, що кодують послідовності екстрацелюлярних доменів. Типові результати Нозерн-блоттінгу з відповідними пробами представлено на рис. 3.14. Як свідчать результати експериментів, експресія N-кадгерину в головному мозку та скелетних м'язах щура пов'язана з мРНК розміром 5,2 та 4,4-4,3 кб (3.4.1.а, лінії 1 та 3). Для печінкової тканини характерні матричні РНК 4,4-4,3 кб та 3,5 кб (рис. 3.14а, лінія 2). В серцевих м'язах, нирках та легенях спостерігаються матричних РНК розміром 5,2 кб; 4,4-4,3 кб та 3,5 кб. (рис. 3.14 а, лінії 4-6). Оскільки для експерименту було взято приблизно однакову кількість препаратів матричних РНК, то можна стверджувати, що найбільшим рівнем експресії N-кадгерину характеризуються тканини головного мозку, печінки та серцевих м'язів. Стосовно експресії матричних РНК E-кадгерину було показано наступне. Матричні РНК 4,3 кб спостерігали в печінці, нирках та легенях, але їх не було в головному мозку, скелетних м'язах або серцевих м'язах (рис. 3.14б). Для P-кадгерину характерний інший розподіл. Матричні РНК 3,5 кб спостерігаються в тканинах нирок та легенів, слабка експресія цих РНК характерна для головного мозку та серцевих м'язів (рис. 3.14в, лінії 1 та 4), в

тканинах печінки та в скелетних м'язах експресія Р-кадгеринових матричних РНК не зафіксована (рис. 3.14в, лінії 2 та 3).

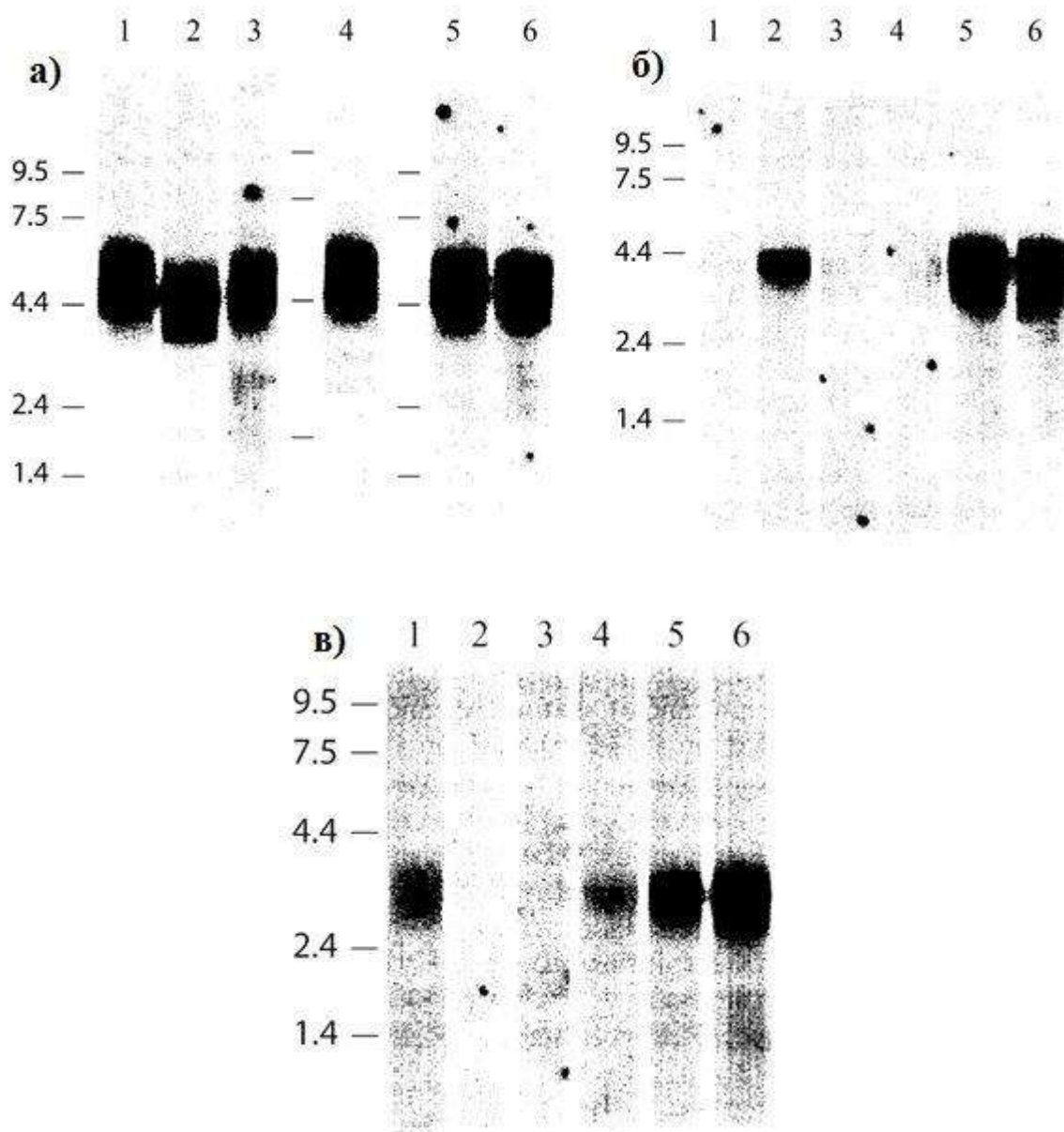


Рис. 3.14. Нозерн-блотінг препаратів мРНК тканин щура з використанням зондів N-cad II (а), E-cad I (б) та P-cad I (в).

1-препарат з головного мозку, 2 - препарат печінки, 3 – препарат скелетних м'язів, 4 – препарат серцевих м'язів, 5 – препарат ниркової тканини, 6 – препарат тканини легенів. Щури віком 4-10 днів після народження. В (а) позиції 5 та 6 отримані після тривалої експозиції. Зліва позначено розмір матричних РНК.

Високий рівень N-кадгеринових мРНК в головному мозку та серцевих м'язах був зафіксований попередніми дослідниками у мишей [335], курчат [336] та биків [337]. Дещо несподіваним виявилася висока експресія цих РНК в печінковій тканині. Виходячи з цього, буде некоректним вважати N-кадгерин нейроспецифічним протеїном.

Слід зауважити, експресія що N-кадгерину в головному мозку, серцевих м'язах та печінці забезпечується специфічним набором матричних РНК різного розміру: для головного мозку це –5,2 та 4,3-4,4 кб; для печінки це –4,3-4,4 кб та 3,5 кб; для серцевих м'язів – всі вищезначені мРНК (5,2 4,3-4,4 та 3,5 кб). Всі вищезначені N-кадгеринові мРНК знайдено у мишей [335]. За результатами дослідження можна сказати, що E-кадгеринова експресія асоціюється з мРНК розміром 4,3 кб, а P-кадгеринова експресія – з мРНК розміром 3,5 кб. Ці мРНК впізнає також N-кадгеринова проба, але на базі результатів експерименту можна стверджувати, що кожен з досліджених кадгеринів має свій специфічний тканинний розподіл. Щодо природи появи декількох мРНК, відповідних за синтез N-кадгеринового поліпептиду, можна припустити, що ці мРНК – результат різного ступеня поліаденилювання. Наявність однієї поліпептидної зони N-кадгеринового протеїну, що спостерігається за допомогою імуноблотінгу в препаратах різних тканин, свідчить на користь такого припущення. Разом з тим, автори роботи [338] не виключають можливості експресії додаткового екзону та відповідно, альтернативного сплайсінгу для кадгеринів з тканин ненейронального походження.

Для аналізу експонування N-кадгеринового поліпептиду в різних тканинах щура було використано два різновиди антитіл – поліклональні антитіла R-156, які були спрямовані проти послідовності 24 С-кінцевих амінокислот N-кадгерину курчати та поліклональні антитіла N-cad-cyt, які були вироблені проти повної послідовності N-кадгерину курчати (п'ять екстрацелюлярних доменів, трансмембранний та цитоплазматичний домени).

Перші антитіла реагували з широким спектром кадгеринів, включаючи E- та P-кадгерини [73]. Результати імуноблотінгу представлено на рис. 3.15.

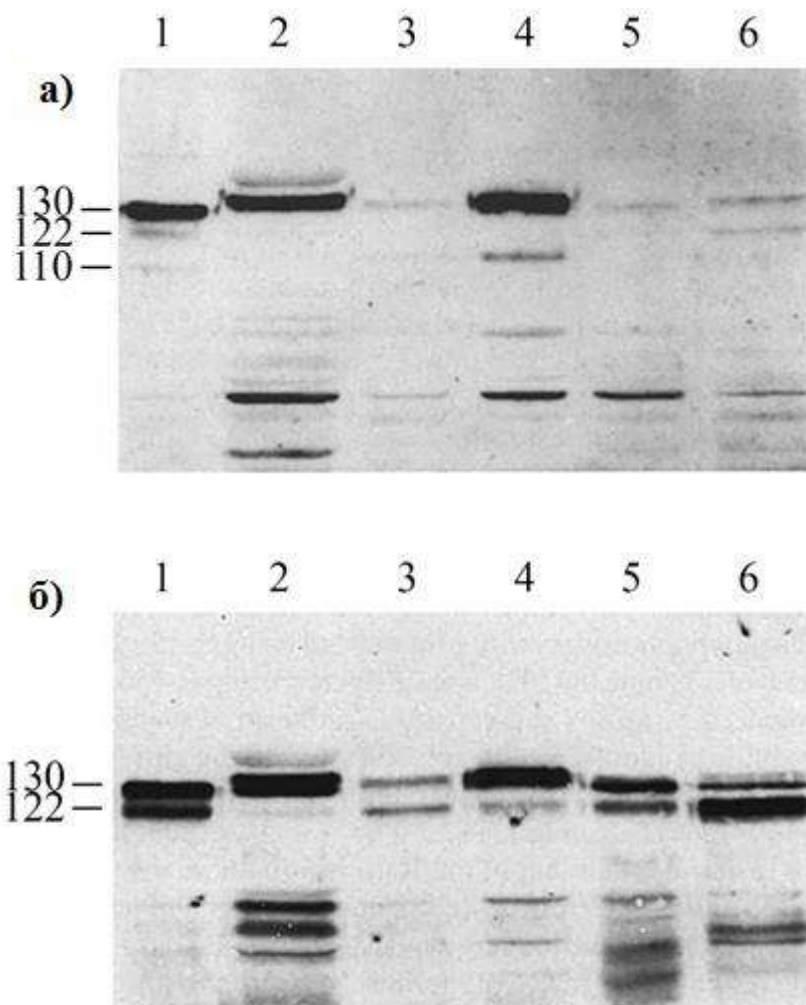


Рис. 3.15. Результати імуноблотінгу з антитілами анти-N-cad-cyt (а) та R-156 (б).

Цифрами позначені препарати з тканин: 1 – головний мозок, 2 – печінка, 3 – скелетні м'язи, 4 – серцеві м'язи, 5- нирки, 6 – легені. Молекулярні маси позначено справа. Щури віком 4 дні після народження.

За результатами імуноблотінгу з антитілами анти-N-cad-cyt в препаратах головного мозку, скелетних та серцевих м'язів, нирок та печінки спостерігаються чіткі поліпептидні зони, що відповідають молекулярній масі N-кадгерина. Причому, в препаратах печінки, скелетних та серцевих м'язів та легень спостерігається поліпептид з молекулярною масою 133 кДа, а в

головному мозку та нирках основна форма N-кадгерину представлена поліпептидом з масою 130 кДа. В головному мозку є також додаткова поліпептидна зона з молекулярною масою 122 кДа і слабка зона, що відповідає протеїну з молекулярною масою 110 кДа. Поліпептид з молекулярною масою 122 кДа впізнавався як антитілами анти-N-cad-сyt, так і антитілами R-156. Наявність цього поліпептиду можна пояснити декількома причинами: дією протеїнази, яка відокремлює фрагмент екстрацелюлярного N-кінцевого домену від поліпептиду з молекулярною масою 130 кДа; або цей поліпептид утворюється завдяки альтернативного сплайсингу або це – інший кадгерин, який має високий ступінь гомології з N-кадгерином. Оскільки немає кореляції між протеолітичною деградацією N-кадгерину з молекулярною масою 130 кДа, та появою фрагменту з молекулярною масою 122 кДа, перший варіант здається маловірогідним. Слід зауважити, що оскільки поліпептид 122 кДа виявляється головним чином за допомогою антитіл R-156, то можливо ми маємо справу з кадгерином, у якого послідовність С-кінцевої частини цитоплазматичного домену виявляє високу схожість з такою послідовністю в молекулі N-кадгерину. На роль такого кадгерину може претендувати R-кадгерин, тому що С-кінцева послідовність його цитоплазматичного домену (24 амінокислотних залишки) відрізняється від С-кінцевої послідовності в N-кадгерині лише трьома амінокислотами та молекулярна маса цього кадгерину становить близько 122 кДа [339]. Однак, не можна виключати можливість, що поліпептид з молекулярною масою 122 кДа утворений в результаті альтернативного сплайсингу. Наявність поліпептиду з молекулярною масою 110 кДа можна пояснити дією кальпаїнової протеази. Як було показано раніше, під дією кальпаїну відбувається розщеплення цитоплазматичного домену N-кадгерину з утворенням поліпептиду з масою 110 кДа [340]. Як повідомлялося раніше, цитоплазматичні домени кадгеринових протеїнів мають зв'язок з катенінами і опосередковано з цитоскелетними протеїнами. Вважають, що кальпаїнова протеаза порушує зв'язок цитоскелетних протеїнів з кадгеринами, що



призводить до втрати останніми адгезивних властивостей [341]. Особливо важливою є кальпаїнова деградація N-кадгерину. Цей процес має безпосередній вплив не тільки на міжклітинну адгезію, але й на сигналінг [342] та експресію Wnt цільового гену завдяки накопиченню ядерного бета-катеніну [343].

В попередньому розділі повідомлялося про зміни в експресії м РНК протеїну N-CAM під час постнатального розвитку та старіння. Нами був проведений аналіз експресії м РНК N-кадгеринового поліпептида під час розвитку та старіння тканин печінки, скелетних та серцевих м'язів, нирок та легенів. Для аналізу була використана проба N-cad II. Ми не помітили значних відмінностей (якісних або кількісних) в досліджуємих тканинах під час старіння. Результати імуноблоттінгу препаратів означених тканин з антитілами до N-кадгерину теж не показали будь-яких істотних змін в поліпептидному складі під час старіння.

Отримані експериментальні дані дозволяють стверджувати, що експресія нейронального протеїну N-CAM1 може виступати в якості маркера нормального постнатального розвитку серцевих та скелетних м'язів організму ссавців. Кадгеринова експресія за цих умов здається менш інформативною. Разом з цим, експонування кадгеринів на поверхні клітин під час ембріогенезу може розглядатися як маркер нормального розвитку тканини. В роботі було проведено дослідження експонування N-кадгерину під час ембріонального розвитку підшлункової залози людини з використанням імуногістохімічного методу.

Дослідження експонування нейрональних протеїнів в тканині підшлункової залози має певні підстави. В літературі є повідомлення про те, що клітини підшлункової залози мають походження від стовбурових клітин, яким притаманні деякі риси нейронального фенотипу [43]. Так, наприклад, в цих клітинах знаходять ряд нейрональних маркерів – ензими біосинтезу катехоламінів та нейроспецифічну енолазу [344, 345]. Було показано, що

тканина підшлункової залози відзначається диференційованою експресією кадгеринів та адгезивних протеїнів Ig-родини [43].

В роботах [346., 347] показано експонування N-кадгерину на певних термінах ембріонального розвитку підшлункової залози. Результати порівнювались з експонуванням нейроспецифічної енолази (NSE), котра, як вказувалося раніше, вважається одним з маркерів нормального розвитку цієї залози. Отримані результати порівняні з результатами досліджень інших авторів.

В роботі Gaidar et al. було показано, що на сьомому тижні ембріонального розвитку панкреатична паренхіма вже має секреторні протоки і NSE-позитивні клітини мають локалізацію в епітелії протоків [348].

Нами було визначено, що експонування N-кадгерину спостерігається трохи пізніше, на 8 тижні ембріонального розвитку підшлункової залози. Як видно з рис. 3.16, N-кадгеринова експресія пов'язана здебільше з протоковими клітинами і периферійними регіонами островків Лангергансу.

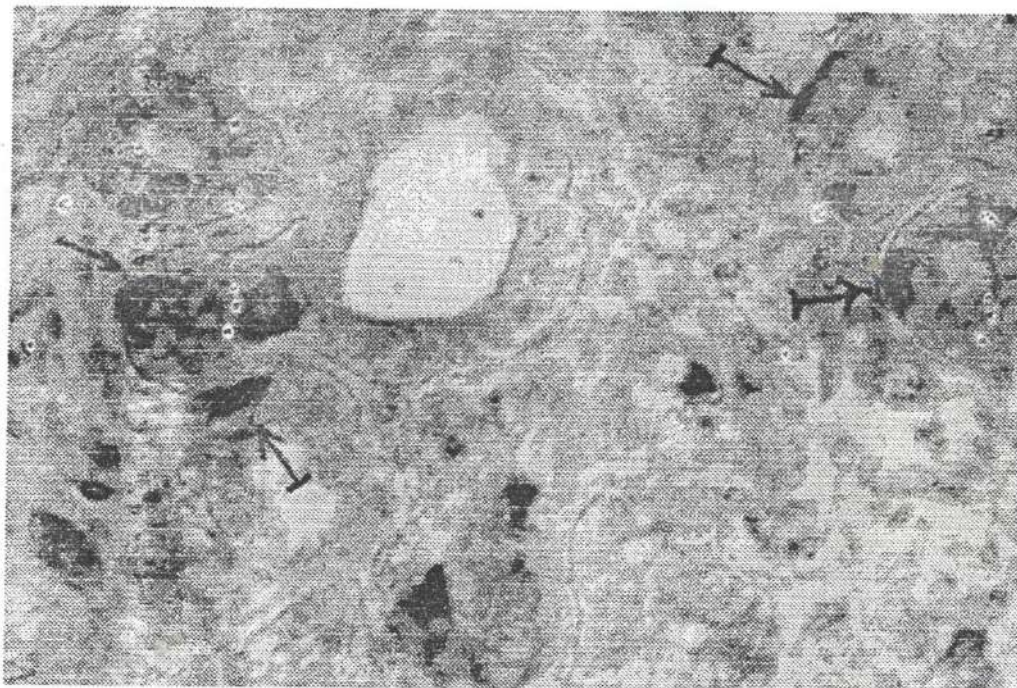




Рис. 3.16 Експонування N-кадгерину на 8 тижні ембріонального розвитку підшлункової залози людини. Островкові клітини позначено одинарними стрілками, стрілка з тупим кінцем – протокові клітини; збільшення 395.

На дванадцятому тижні ембріонального розвитку підшлункової залози, островкові клітини мають чітку локалізацію, в цей період можна спостерігати експонування N-кадгерину в островкових клітинах, в клітинах нервових гангліїв та в протокових клітинах (Рис. 3.17).

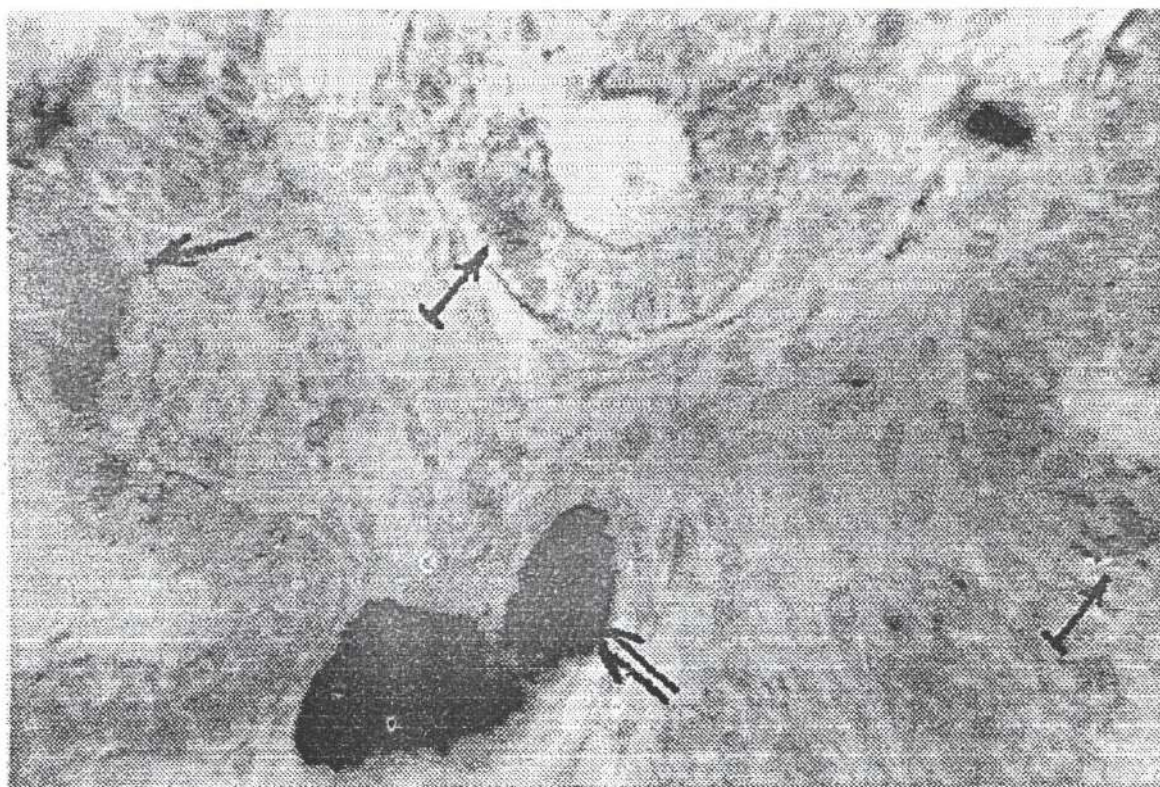


Рис. 3.17 Експонування N-кадгерину на 12 тижні ембріонального розвитку підшлункової залози людини. Островкові клітини позначено одинарними стрілками, клітини нервових гангліїв – подвійними, стрілка з тупим кінцем – протокові клітини; збільшення 395.



Всі ці компоненти визначаються і нейроспецифічною енолазою (Рис. 3.18).

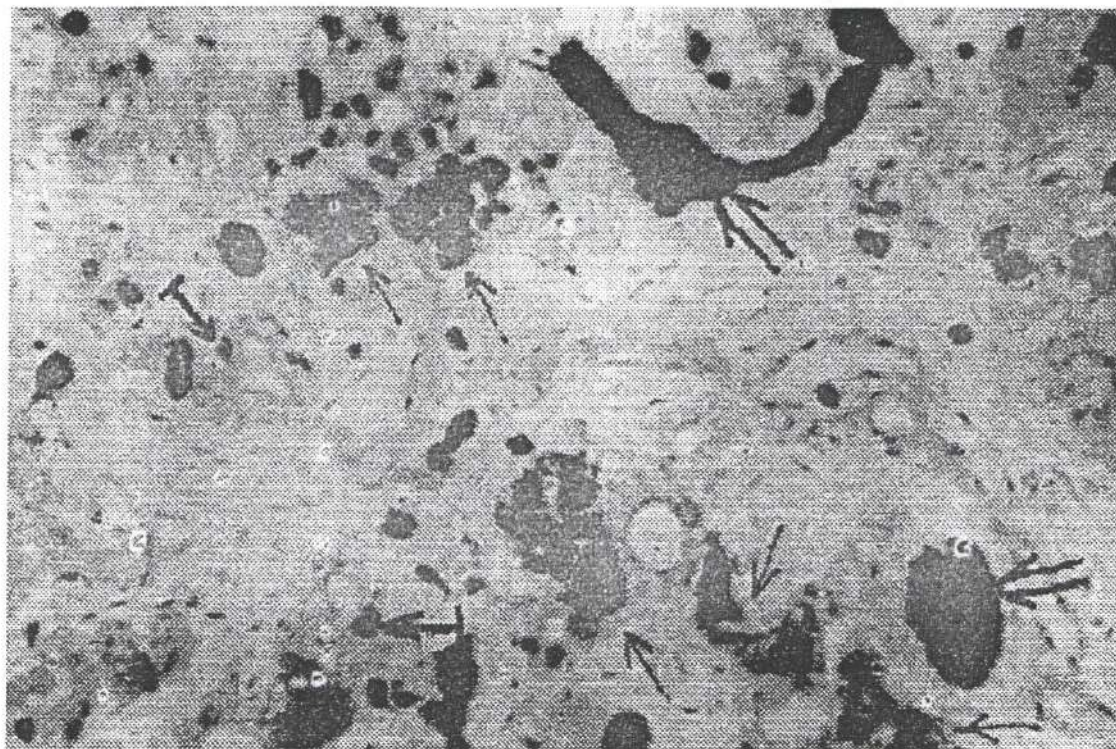


Рис. 3.18 Експонування НСЕ на 12 тижні ембріонального розвитку підшлункової залози людини. Острівкові клітини позначено одинарними стрілками, клітини нервових гангліїв – подвійними, стрілка з тупим кінцем – протокові клітини; збільшення 395.

Таким чином, експресія N-кадгерину зростає відповідно стадії розвитку підшлункової залози і може бути маркером нормального розвитку цієї тканини. Щодо специфічної локалізації N-кадгерину (периферійні регіони острівкових та протокових клітин), то це питання ще має бути висвітленим. Автори роботи [348] роблять припущення, що така локалізація може бути асоційована з міграцією гормон-продукуючих клітин і демонструє високу функціональну та морфо генетичну активність цієї частини острівкових клітин. На присутність N-кадгерину в островках Лангенгарсу вказували і інші автори [43], але не було повідомлення про його знаходження в

протокових клітинах. Поява протеїну кальцій-залежної адгезії під час ембріонального розвитку підшлункової залози вказує на залучення цього протеїну в процес формування нейрон-ендокринного комплексу.

Важливість експонування N-кадгерину в клітинах панкреатичного епітелію була розглянута авторами роботи [349]. Вони отримали лінію мишей, у яких клітини підшлункової залози були N-кадгерин-негативні. Виявилося, що експресія N-кадгерину не є критичною для нормального розвитку підшлункової залози, проте ця експресія дуже важлива нормального функціонування гранулярного апарату бета-клітин. Кількість інсулінових секреторних гранул в N-кадгерин-дефіцитних бета-клітинах була значно зменшена, і, відповідно, спостерігалось порушення інсулінової секреції.

З іншого боку, N-кадгерина експресія є важливою ознакою епітеліально-мезенхімального переходу в клітинах панкреатичної карциноми [350]. Утворення метастазів відзначається епітеліально-мезенхімальним переходом і клітини панкреатичної пухлини набувають метастатичного фенотипу, що пов'язано зі змінами в кадгериновій експресії. В цей період спостерігається зменшення E- та P-кадгеринової експресії, проте N-кадгерина експресія значно підвищена. Відомо, що N-кадгерин переважно експресується клітинами нервової системи, де він забезпечує гомо типову адгезію. Пухлинні клітини підшлункової залози з підвищеним вмістом N-кадгерину легко приєднуються до клітин нервових тяжів, що мають розташування в самій залозі. Таким чином може відбуватися поширення пухлини.

На основі отриманих даних можна зробити такі висновки:

1. Виявлена специфічна експресія мРНК кадгеринових протеїнів в тканинах різного генезу (головний мозок, печінка, нирки, легені, серцеві та скелетні м'язи).
2. Високий рівень експресії мРНК CDH2 показано для усіх досліджуваних тканин, в той час як експресія мРНК CDH1 обмежується

тканинами печінки, нирок та легенів, а експресія мРНК CDH3 характерна головним чином для тканин нирок та легенів.

3. Експресія N-кадгерину зростає відповідно стадії розвитку підшлункової залози і може бути маркером нормального розвитку цієї тканини.

### **3.5. Протеолітична деградація N-кадгеринового поліпептиду та її фізіологічна роль**

Протеолітична деградація N-кадгерину пов'язана з дією декількох ензимів. Вважають, що матриксна металопротеїназа ADAM 10 (Е.С. 3.4.24.81) відповідає за початковий процесінг цього адгезивного протеїну. Результатом такої дії є утворення С-термінального фрагменту CTF-1 з молекулярною масою приблизно 40 кДа [342]. Цей пептид в свою чергу розщеплюється під дією  $\gamma$ -секретази (Е.С. 3.4.23.46) з утворенням розчинного пептиду CTF-2 [351]. Оскільки N-кадгерин має локалізацію в сайтах синаптичних контактів гіпокампу, де він формує комплекс з пресеніліном-1 (PS-1) та бета-катеніном, автори роботи [352] вважають, що протеолітична деградація N-кадгерину створює певний вплив на адгезивні контакти в синапсах.

В літературі є повідомлення, що іони кальцію впливають на стабільність N-кадгеринового поліпептиду [340]. Це пов'язано з дією кальпаїнів (Е.С. 3.4.22.17) – кальцій-залежних цистеїнових протеаз, які активуються потоком кальцію, що входить в клітину через NMDA-рецептори. Субстратами для кальпаїнової дії слугують цитоскелетні протеїни, кінази, фосфатази та адгезивні молекули [353]. Кальпаїни залучені до багатьох важливих процесів, а саме – інтегрин-опосередкованій міграції клітин, ремоделінгу цитоскелету, клітинної диференціації та апоптозу [354]. Надмірна активація кальпаїнів, так само як і мутаційні зміни кальпаїнової активності, вносять певний вклад в розвиток таких захворювань як дистрофія

м'язів, ішемічна хвороба серця, нейродегенеративні захворювання, підвищена агрегація тромбоцитів, формування катаракти та хвороба Альцгеймера [355]. Було показано, що N-кадгерин може бути субстратом для дії нейрональних кальпаїнів [340].

Нами було досліджено ефект іонів кальцію на протеолітичну деградацію N-кадгеринового поліпептиду з використанням поліклональних антитіл anti-N-cad-cyt (отримані до послідовності, що містила п'ять амінокислот екстрацелюлярного домену, повний трансмембранний домен та цитоплазматичний домен) та поліклональних антитіл R-156 (отримані до 24 амінокислот С-кінцевої послідовності N-кадгерину). При підготовці препаратів використовували два підходи: кальцій вносили або в буфер для гомогенізації або в солюбілізаційний буфер. Результати експериментів не відрізнялися при використанні різних підходів. Типові результати експерименту представлено на Рис. 3.19.

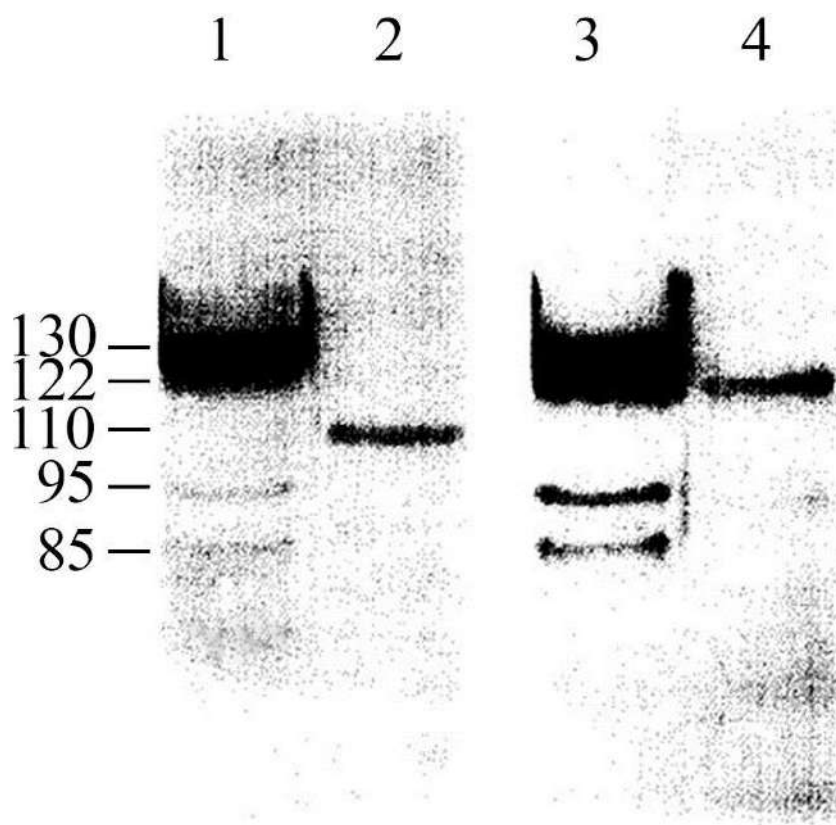


Рис. 3.19 Вплив іонів кальцію на стабільність N-кадгеринового поліпептиду.

1, 3 – препарати головного мозку щурів на базі гомогенатів в буфері, що містив 10 мМ ЕДТО.

2, 4 - препарати головного мозку щурів на базі гомогенатів в буфері, що містив 10 мМ хлорид кальцію.

1,2 – аналіз проведений з поліклональними антитілами anti-N-cad-cyt;

3, 4 – аналіз проведений з поліклональними антитілами R-156.

В присутності 10 мМ ЕДТО чотири поліпептидні зони з молекулярними масами 130, 122, 95 та 85 кДа були визначені з використанням двох видів антитіл, треки 1 та 3. Проте антитіла anti-N-cad-cyt давали слабку реакцію з поліпептидами молекулярної маси 122, 95 та 85 кДа в той час як з антитілами R-156 ці поліпептидні зони мали чітку вираженість. Це свідчить про те, що поліпептиди мають всі або майже всі амінокислотні залишки С-кінцевої послідовності N-кадгерину. В присутності 10 мМ хлориду кальцію поліклональні антитіла anti-N-cad-cyt впізнавали поліпептидну зону з молекулярною масою 110 кДа і давали слабку реакцію з поліпептидом, молекулярна маса якого була 122 кДа. Поліпептиди з молекулярними масами 130, 95 та 85 кДа за допомогою цих антитіл не визначалися (трек 2). Інша картина спостерігалася при використанні антитіл R-156. Вони не впізнавали поліпептид з молекулярною масою 110 кДа, а давали лише реакцію з поліпептидом молекулярна маса якого була 122 кДа. В попередньому розділі нами було зроблено припущення, що поліпептид з молекулярною масою 122 кДа може бути близькородинним кадгерином, наприклад R-кадгерином, який має високу гомологію з С-кінцевою послідовністю N-кадгеринового поліпептиду. Слід зауважити, що інтенсивність зони 122 кДа була меншою порівняно зі зразками, в яких додавали 10 мМ ЕДТО (трек 4). Таким чином, можна зробити висновок, що поліпептид з молекулярною масою 110 кДа не має всіх або більшості з 24 С-кінцевих амінокислотних залишків, які впізнаються антитілами R-156. В



присутності 10 мМ хлориду кальцію поліпептиди з молекулярними масами 130, 95 та 85 кДа антитілами R-156 не визначалися (трек 4).

Отримані дані дозволяють припустити, що за умов експерименту, коли в середовищі концентрація іонів кальцію становила 10 мМ, деградація N-кадгеринового поліпептиду відбувається завдяки дії кальпаїнових протеїназ, оскільки спостерігається поява поліпептидної зони з молекулярною масою 110 кДа. Це узгоджується з роботою Jang Y-N et al. [343], які визначили, що за наявності в середовищі 1мМ хлориду кальцію відбувається деградація N-кадгеринового поліпептиду з утворенням фрагменту NTF (N-terminal fragment) з молекулярною масою 110 кДа. Цілком імовірно, що в данному випадку мова йде про дію m-кальпаїнового ензиму, який, на відміну від  $\mu$ -кальпаїну, активується мілімолярними концентраціями хлориду кальцію. Фізіологічна роль фрагменту NTF не доведена, але було показано, що за наявності підвищеної концентрації іонів кальцію в клітині, головна роль в деградації N-кадгеринового поліпептиду належить кальпаїнам, а не матриксній металопротеїназі ADAM 10 чи  $\gamma$ -секретазі. Як було показано в роботі Jang Y-N et al. таке підвищення можливе мати місце в разі патологій, наприклад, ішемічної хвороби серця [343]. Загальна схема деградації N-кадгеринового поліпептиду наведена на рис. 3.20.

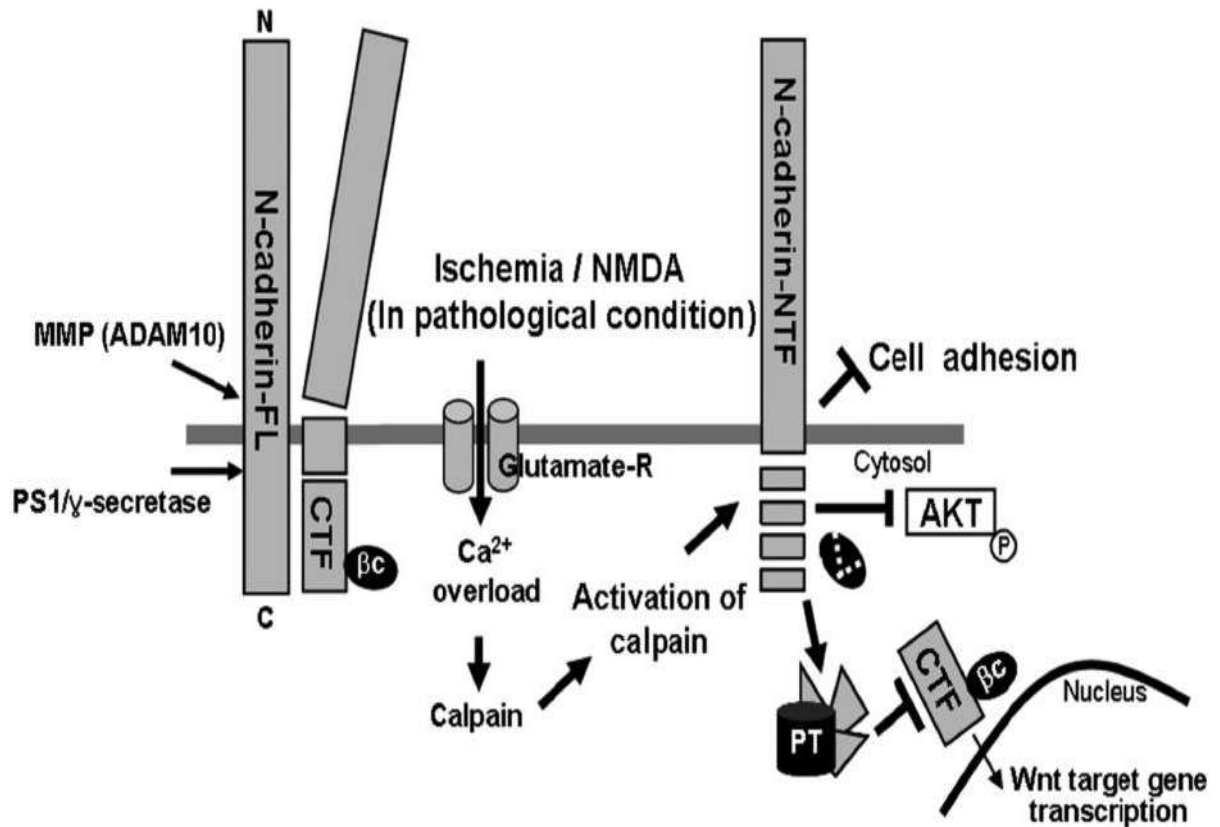


Рис. 3.20 Схема протеолітичної деградації N-кадгерину  
(Jang Y-N., Jung Y-S., Lee S.H., Moon C-H., Kim C-H., Baik E.J.  
The J. Neurosci, 2009, v 29., N 18, p. 5974-5984)

Матриксна металопротеїназа ADAM-10 та PS1/γ розщеплюють N-кадгерин з утворенням фрагменту CTF. За патологічних умов, наприклад, при ішемічній хворобі серця або при надмірній активації NMDA, потік кальцію через NMDA рецептор активує кальпаїн. Кальпаїн призводить до деградації цитоплазматичного домену N-кадгерину з утворенням фрагменту N-кадгерину-NTF та до розщеплення кадгерин-катенінового комплексу. Утворені фрагменти підлягають протеасомній деградації, внаслідок чого створюється негативний вплив на транслокацію CTF до ядра, АКТ-фосфорилування, та клітинну адгезію.

РТ-протеосома, FL-повна послідовність, βC- β-катенін, АКТ-протеїн кіназа В.

Автори роботи [343] стверджують, що активація кальпаїнів за патологічних умов (нейродегенеративні процеси) призводить до деградації N-кадгерину та відповідного зниження рівня бета-катеніну. Відповідно, зниження рівня бета-катеніну не приводить до активації Wnt-шляху, що створює негативний вплив на процес виживання нейронів, як це спостерігається під час хвороби Альцгеймера.

Таким чином, можна зробити наступні висновки:

1. В постнатальних тканинах щура N-кадгериновий протеїн представлений головним чином поліпептидом з молекулярною масою 130 кДа. Додаткові поліпептидні зони, що спостерігаються за даними імуноблотінгу, можуть бути або наслідком протеолітичної деградації (110кДа), або обумовлені наявністю близькородинного кадгерину з високим ступенем гомології (122 кДа).

2. В деградації N-кадгерину беруть участь декілька протеїназ, серед котрих важливу роль грають кальпаїнові протеази, дія яких призводить до певного впливу на сигнальні шляхи та адгезивні властивості кадгеринових протеїнів.

### **3.6. Роль протеїнів клітинної адгезії імуноглобулінової та кадгеринової родини при формуванні реакції пасивного уникання у щурів**

Як визначалося раніше, молекули клітинної адгезії грають певну роль в процесі формування пам'яті. Закріплення здобутого навика у ссавців пов'язано з підвищенням експресії адгезивних протеїнів в зоні неокортекса та гіпокампа [5, 356, 357]. Але якщо для адгезивних протеїнів Ig-родини участь у процесі формування пам'яті вважається доказаною, то роль кадгеринових протеїнів в цьому процесі тривалий час залишалася нез'ясованою [358]. Проте на користь залучення кадгеринових протеїнів, зокрема N-кадгерину, до процесу навчання свідчить такий факт, що цей

протеїн у значній кількості присутній в синаптичних мембранних фракціях мозку, а асоційований з цим кадгерином бета-катенін є необхідним для консолідації пам'яті у тварин [359, 360].

Нами була зроблена спроба висвітлити роль N-кадгерину під час вироблення умовного рефлексу пасивного уникання (УРПУ) [361]. Для вироблення УРПУ була використана модель експерименту, яка представлена на рис. 3.21. Дорослого щура розміщували в середині освітленої камери хвостом до отвору в темну камеру. Вивчаючи освітлений простір, тварина знаходила отвір у темну камеру та проникала до неї (генетично детермінована поведінка). Латентний період реакції вимірювався як час від моменту розміщення тварини в установці до повного переходу щура в темну камеру. Через 15 с на ґратчасту підлогу темної камери подавали змінний струм (50 Гц, 2-3 с), інтенсивність якого була достатньою для забезпечення ноцицептивного ефекту такої електрошкірної стимуляції. Отвір між камерами залишався відкритим. За щуром, який утік до освітленої камери, спостерігали протягом 3 хв. Якщо за цей період тварина не намагалася повернутися в темну камеру, УРПУ вважалось виробленим з першої спроби. Щурів, що повторно заходили в темну камеру протягом тест-інтервалу (3хв), виключали з експерименту. Всіх тварин було поділено на 4 групи, котра з яких складалася з двох контрольних та чотирьох експериментальних тварин. Через 6 годин після закінчення вироблення УРПУ тварини підлягали анестезії (каліпсол, 5мг/кг, внутрішньочеревне введення). Кожній експериментальній тварині з перших двох груп через трепанаційний отвір вводили антитіла до протеїнів N-CAM1 (перша група) та N-кадгерину (друга група) в соматосенсорну зону кори головного мозку. Експериментальним щурам двох інших груп вводили відповідні антитіла в дорсальну область гіпокампа (третя група – антитіла до N-CAM1, четверта група – антитіла до N-кадгерину). Введення відбувалося безперервно шприцем Гамільтона за стереотаксичними координатами ( $p=2\text{мм}$ ,  $D=1\text{мм}$ ,  $h=3,5\text{мм}$ ) [362]. Об'єм

введених антитіл складав 10 мкл на кожну тварину. Тестування придбаного навичу тестували через добу після вироблення УРПУ.

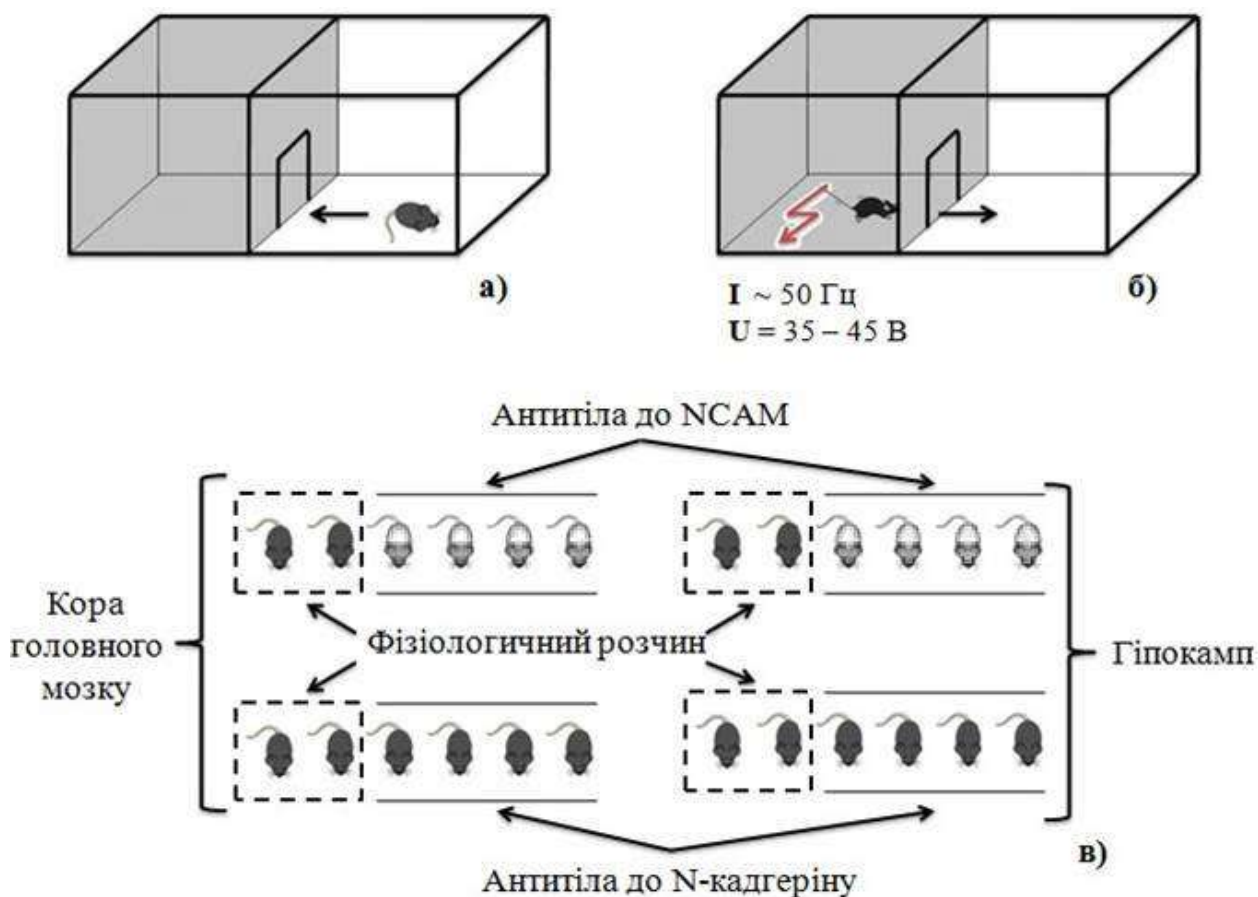


Рис. 3.21. Схема експерименту виробки УРПУ у щурів.

а - розміщення тварин в освітленій частині камери,  
б - вироблення умовної реакції пасивного уникнення, перемінний струм, 50 Гц,  
в - результати введення антитіл до адгезивних протеїнів. Чорним кольором позначені тварини, що зберігали навик уникнення, білим кольором –тварини, у яких виявлявся амнезивний ефект.

Результати експерименту показали, що введення антитіл до протеїну N-CAM1 через 6 годин після вироблення реакції пасивного уникнення викликало повну втрату навичу у експериментальних тварин першої та

третьої груп. Амнезивний ефект у цих тварин зберігався протягом трьох діб. У всіх контрольних тварин цих груп навик уникання зберігався повністю і тварини не робили спробу зайти в неосвітлену частину камери. Досить несподіваним виявилось повне зберігання навичу у всіх експериментальних тварин другої та четвертої групи, яким вводили антитіла до N-кадгерину в соматосенсорну зону кори головного мозку та в гіпокамп. При тестуванні протягом трьох діб тварини не робили жодної спроби зайти в неосвітлену частину камери. Відсутність ефекту N-кадгеринових антитіл можна пояснити двома причинами. Можливо, що експонування кадгеринових протеїнів в синаптичних структурах мозку не є критичним для формування навичу. Як було зазначено в роботі [360] зміни, що стосуються бета-катеніну та його асоціації з відповідним кадгерином є характерними для процесу консолідації пам'яті, але не є необхідними для придбання навичу. Проте можливе і інше пояснення – ефект кадгеринових антитіл може бути виявлений лише за умови специфічного блокування першого екстрацелюлярного домену кадгеринової молекули. На користь такого пояснення свідчать результати послідовних експериментів, що були зроблені в цьому напрямку. Автори роботи [363] вивчали роль N-кадгерину під час довгої фази довгострокової потенціації. Робота була виконана з використанням зрізів гіпокампу. Довгострокова потенціацію визначають як стале посилення синаптичної передачі у відповідь на високочастотне подразнення. Вважають, що такі подразнення викликають той же ефект, який відбувається в глутаматергічних синапсах гіпокампу під час виробки навичу. Було показано, що антитіла до першого екстрацелюлярного домену N-кадгерину перешкоджали утворенню контактів між кадгеринами, що розташовані на пре- та постсинаптичних мембранах синапсів, які були сформовані внаслідок довгострокової потенціації. Тобто вироблення навичу відбувається за участі N-кадгерину. Звичайно, для остаточного вирішення ролі кадгеринових протеїнів в процесі формування пам'яті потрібно проведення додаткових експериментів.

### Висновки:

1. Підтверджена ключова роль протеїну N-CAM1 при виробленні реакції пасивного уникнення.
2. Проведений експеримент показав, що блокування кадгерінових протеїнів за допомогою антитіл в структурах гіпокампу та кори головного мозку не є критичним для формування навичу у дослідних тварин.

### **3.7. Модулюючий вплив плазміногену/плазміну на формування адгезивних зв'язків між тромбоцитами під час агрегації**

Утворення адгезивних контактів між клітинами крові, зокрема між тромбоцитами, є специфічним процесом, оскільки за умови знаходження крові в рідкому стані ці клітини мають бути розділеними. Активація тромбоцитів призводить до швидкого експонування на їх поверхні специфічних АП, які або перебували на поверхні клітин в неактивному стані (інтегрини), або знаходились в секреторних гранулах (селектини, вітронектин, та ін.). Утворення міжтромбоцитарного зв'язку – складний процес, в якому міцність контакту забезпечується не лише взаємодією адгезивного рецептора на поверхні клітин зі специфічним лігандом але й впливом інших компонентів, що складають клітинне оточення. Серед таких компонентів особливу увагу привертає плазміноген, який здатний виступати в ролі адгезивного ліганду клітин крові [8]. Традиційно плазміноген розглядається як попередник плазміну – головного компоненту фібринолітичної системи. Але, як вказувалося раніше, функції плазміногену не обмежуються його участю у фібринолізі. Ми вирішили дослідити роль плазміногену у взаємодіях за типом клітина-клітина, що мають місце при агрегації тромбоцитів. Відомо, що тромбін, який є потужним агоністом тромбоцитарної агрегації, призводить до експонування на поверхні тромбоцитів додаткових сайтів зв'язування плазміногену, що за своїми характеристиками подібні до таких для неактивованих клітин (для тромбін-стимульованих тромбоцитів  $K_d = 2,6$  мкМ, тоді як для інтактних –  $1,9$  мкМ) [242].

Є декілька протеїнів, що можуть виступати рецепторами плазміногену на тромбоцитарній поверхні. За думкою авторів роботи [242] сорбція плазміногену на поверхні тромбоцитів відбувається завдяки фібриногену або його рецептору – інтегрину  $\alpha\text{IIb}\beta 3$ , а підвищення кількості плазміногену зв'язаного на поверхні тромбоцитів після їх активації пояснюється формуванням фібрину на клітинній поверхні. З іншого боку, в кровотоці комплекс плазміноген-фібриноген не утворюється, а прямої взаємодії плазміногену з інтегрином  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  також не показано. Як розглядалося раніше, роль рецепторів плазміногену на поверхні активованих тромбоцитів здатні виконувати протеїни, які вивільняючись тромбоцитами під час активації, залишаються асоційованими з їх поверхнею (серед них – фібронектин, тромбоспондин та вітронектин). За даними літератури ці секреторні протеїни тромбоцитів є необхідними для формування міжтромбоцитарних контактів під час агрегації, а також здатні зв'язувати плазміноген *in vitro*. Ми припустили, що плазміноген, зв'язуючись з адгезивними протеїнами, що секретуються під час активації та залишаються зв'язаними з тромбоцитарною поверхнею, може впливати на міжклітинні контакти, що утворюються між тромбоцитами під час агрегації. Таким чином, ми досліджували вплив Glu- та Lys-форм плазміногену на агрегацію тромбоцитів, стимульовану різними агоністами.

Ефекти плазміногену на агрегацію тромбоцитів людини досліджували методом оптичної агрегометрії із використанням 2-х модельних систем – ЗТП крові та відмитих тромбоцитів (докладно у розділі Матеріали та методи). На рис. 3.22 наведено типову агрегатограму тромбоцитарної агрегації, що індукована 5 мкМ ADP. Двохвильовий характер агрегатограми (крива зміни світлопропускання з часом після додавання агоністу) ілюструє дві стадії процесу агрегації: перша (оборотна) стадія передбачає активацію та зміну форми тромбоцитів; друга (необоротна) стадія відображає власне агрегацію тромбоцитів між собою, яка реалізується за участі протеїнів, що секретуються ADP-стимульованими тромбоцитами [364].



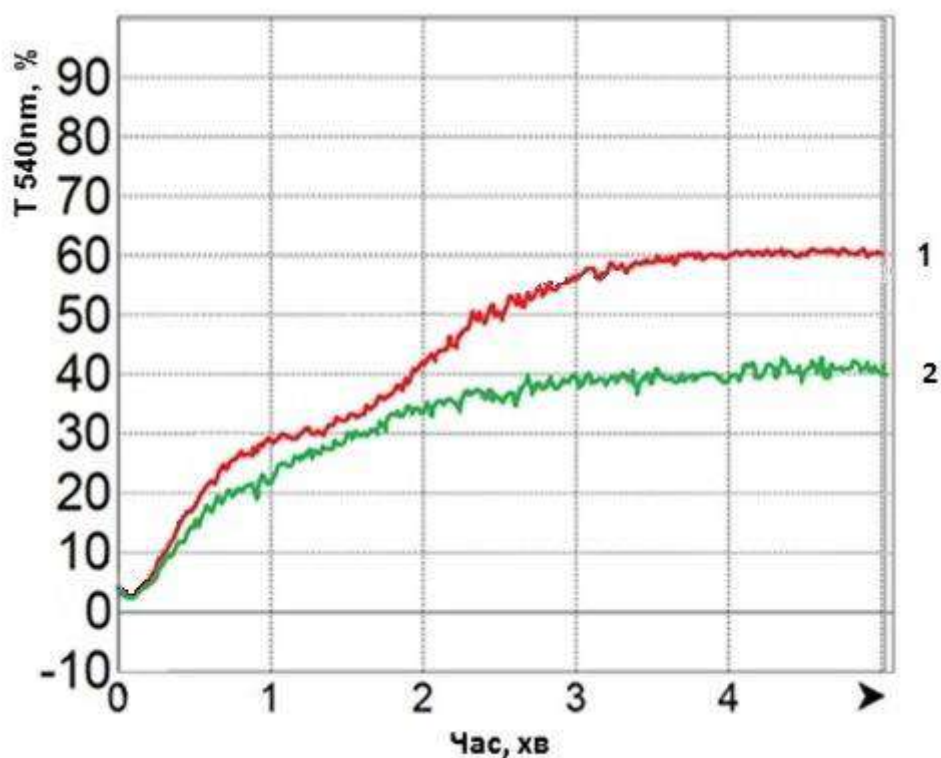


Рис. 3.22 Вплив Lys-плазміногену на агрегацію тромбоцитів плазми крові людини, індуктор – 5мкМ ADP: 1 – контрольна агрегація, 2 – 6 мкМ Lys-плазміноген.

Секреторні протеїни або безпосередньо залучаються до утворення міжтромбоцитарних контактів, або, як тромбоспондин, забезпечують стабілізацію міжтромбоцитарних зв'язків. Аналіз агрегатограм проводили за такими показниками як ступінь та швидкість агрегації, показники агрегації реєструвалися автоматично. Ступінь агрегації – це максимальне значення світлопропускання (T) реакційної суміші, що досягається через 5 хв після додавання індуктора агрегації ( $\lambda = 540$  нм); швидкість агрегації – це тангенс кута нахилу дотичної до заданої ділянки агрегаційної кривої до осі абсцис.

Як свідчать результати агрегатограм, при додаванні до реакційної суміші Lys-плазміногену у концентрації, еквімолярній до концентрації фібриногену плазми, спостерігається зниження ступеню та швидкості агрегації тромбоцитів (рис. 3.22). Цікаво, що ця форма плазміногену чинить

вплив на другій необоротній стадії ADP-індукованої агрегації, хоча зниження швидкості агрегації має місце вже на 30 с процесу. Разом з тим, при додаванні до реакційної суміші Glu-плазміногену в такій же концентрації не пригнічувало агрегацію тромбоцитів, стимульованих ADP. Отримані результати корелюють з даними Rand M.L et al., які вивчали вплив ліпопротеїну а та Glu-плазміногену на ADP-індуковану агрегацію тромбоцитів [365]. Автори роботи показали, що Glu-плазміноген в кінцевій концентрації 1,5 мкМ не спричиняв істотного впливу на агрегацію тромбоцитів, стимульованих ADP.

Подібний антиагрегаційний ефект чинить DD-фрагмент фібрину (рис. 3.23), котрий, як відомо, конкурує з фібриногеном за його рецептор  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  на тромбоцитарній поверхні і, відповідно, здатен перешкоджати утворення міжтромбоцитарних контактів. До того ж, як повідомляють автори роботи [366], плазміноген-зв'язуючий сайт знаходиться на периферії D-домену фібрин(оген)ової молекули. Ми виявили, що внесення в середовище агрегації DD-фрагменту викликає посилення інгібувального ефекту Lys-плазміногену.

Отже, отримані результати дозволяють стверджувати, що Lys-плазміноген, на відміну від Glu-форми, пригнічує ADP-індуковану агрегацію в препаратах збагаченої тромбоцитами плазмі крові. Інгібувальна дія Lys-плазміногену має місце на необоротній стадії агрегації. Цілком можливо, що антиагреаційний ефект Lys-плазміногену є наслідком його взаємодії з протеїнами, що експонуються на поверхні тромбоцитів під час активації та залучаються до процесу агрегації.

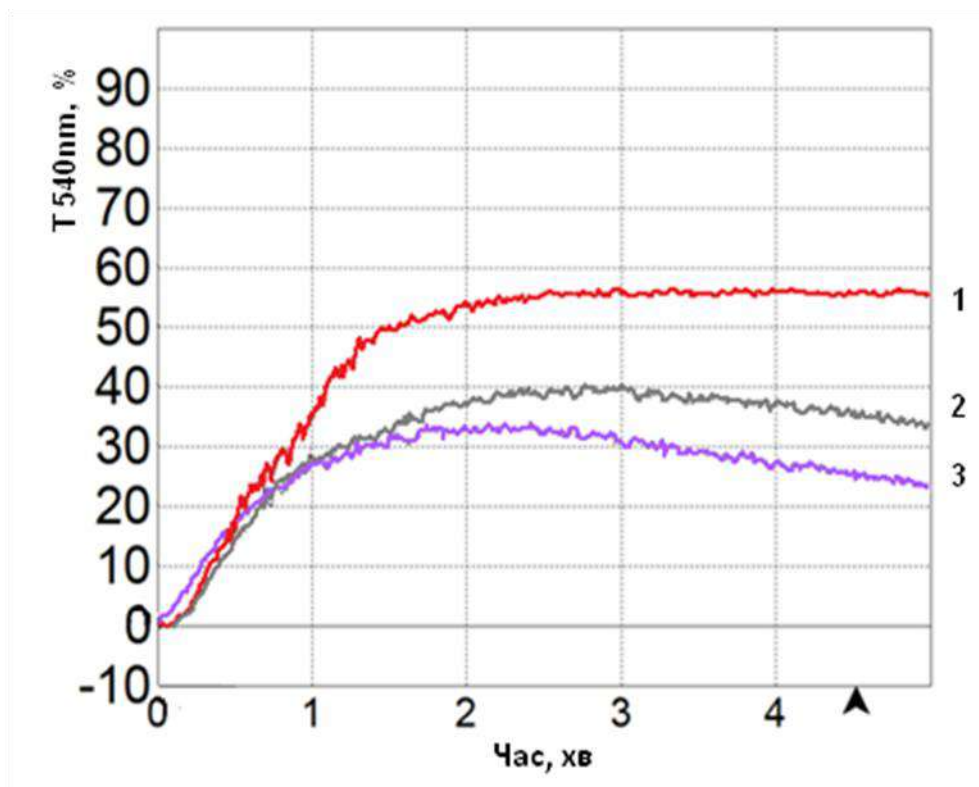


Рис. 3.23 Вплив DD-фрагменту фібрину та Lys-плазміногену на агрегацію тромбоцитів плазми крові людини, індуктор – 5мкМ ADP: 1 – контрольна агрегація, 2 – 6 мкМ DD-фрагмент фібрину; 3 – 6 мкМ DD-фрагмент фібрину та 6 мкМ Lys-плазміноген.

Надалі вивчали вплив Lys- та Glu-форм плазміногену на агрегацію відмитих тромбоцитів людини, стимульовану тромбіном та колагеном, а також на ристоміцин-індуковану аглютинацію цих клітин.

За умов стимуляції тромбоцитів тромбіном та колагеном відбувається повне вивільнення вмісту секреторних гранул і також це призводить до необоротної «активації» інтегрину  $\alpha IIb\beta 3$ . Цей інтегрин здатен зв'язувати мультивалентні протеїнові молекули фібриногену, фібронектину, vWF та вітронектину. Вважають, що така взаємодія GP  $\alpha IIb\beta 3$  з його лігандами є необхідною умовою для створення ефективних контактів між агрегуючими тромбоцитами. В разі аглютинації тромбоцитів, що індукується глікопептидним антибіотиком ристоміцином, міжклітинний контакт

відбувається за іншим механізмом, а саме - завдяки взаємодії поверхневого глікопротеїну GP Ib-IX-V з vWF плазми крові.

На рис. 3.24 та 3.25. наведено типові агрегатограми, які відображають вплив Lys-плазміногену на тромбін- та колаген-індуковану агрегацію препаратів відмитих тромбоцитів. Glu-плазміноген істотного впливу не чинив. Як і в разі експериментів з препаратами збагаченої тромбоцитами плазми ми проводили попередню інкубацію тромбоцитів з препаратами плазміногену протягом трьох хвилин. Як свідчать наведені дані додавання до інкубаційної суміші Lys-плазміногену у концентрації 1,2 мкМ, призводить до пригнічення тромбін- та колаген-індукованої агрегації препарату відмитих тромбоцитів. В обох випадках ступінь та швидкість агрегації знижується принаймні вдвічі.

Наступним етапом роботи було дослідити залежність ступеню інгібування Lys-плазміногеном від концентрації зимогену в інкубаційному середовищі. Як видно з рис. 3.26. в межах концентрацій від 0,15 мкМ до 0,6 мкМ спостерігається прямо пропорційне зниження ступеню агрегації, а подальше підвищення концентрації зимогену до 3 мкМ не супроводжується посиленням інгібування. Дозозалежний характер інгібування агрегації тромбоцитів Lys-плазміногеном може бути пояснений фактом, що для Lys-плазміногену існує обмежена кількість сайтів зв'язування на тромбоцитарній поверхні.

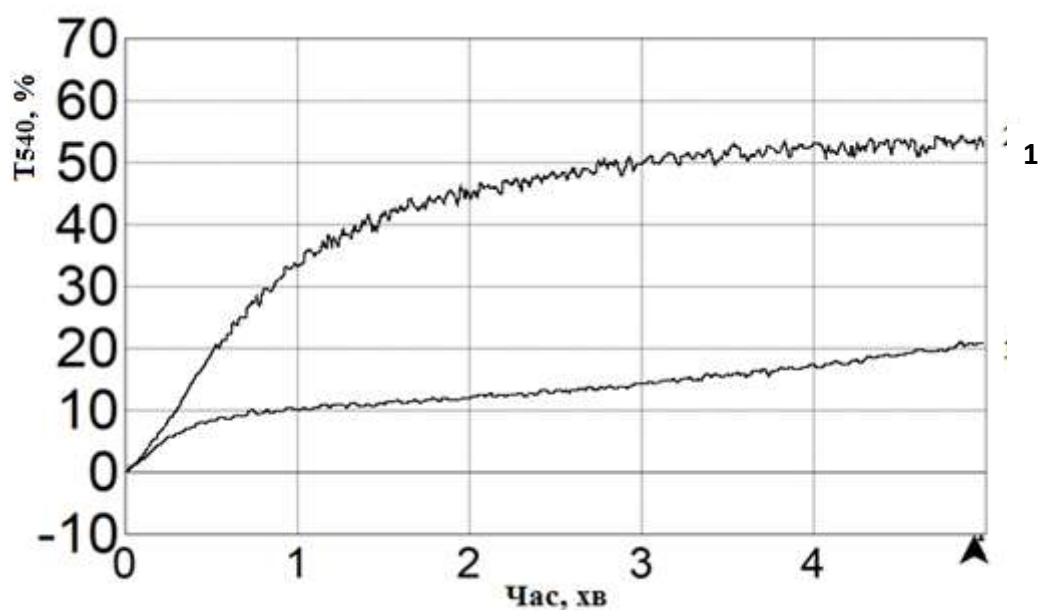


Рис. 3.24 Вплив Lys-плазміногену на агрегацію відмитих тромбоцитів людини, індуктор – 1 од. НІН/мл тромбін: 1 – контрольна агрегація, 2 – 1,2 мкМ Lys-плазміноген.

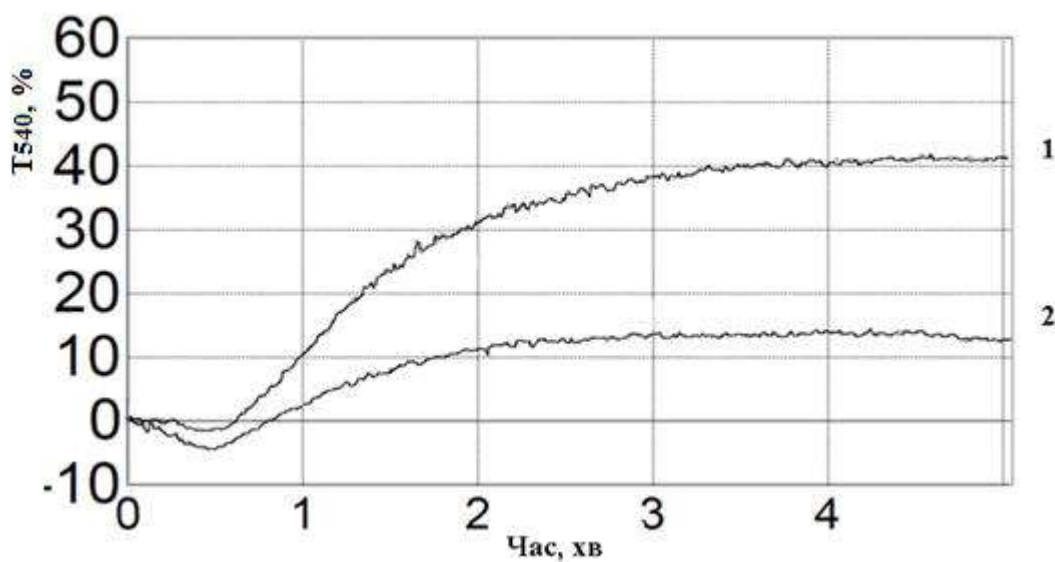


Рис. 3.25 Вплив Lys-плазміногену на агрегацію відмитих тромбоцитів людини, індуктор – 1,25 мг/мл колаген: 1 – контрольна агрегація, 2 – 1,2 мкМ Lys-плазміноген.

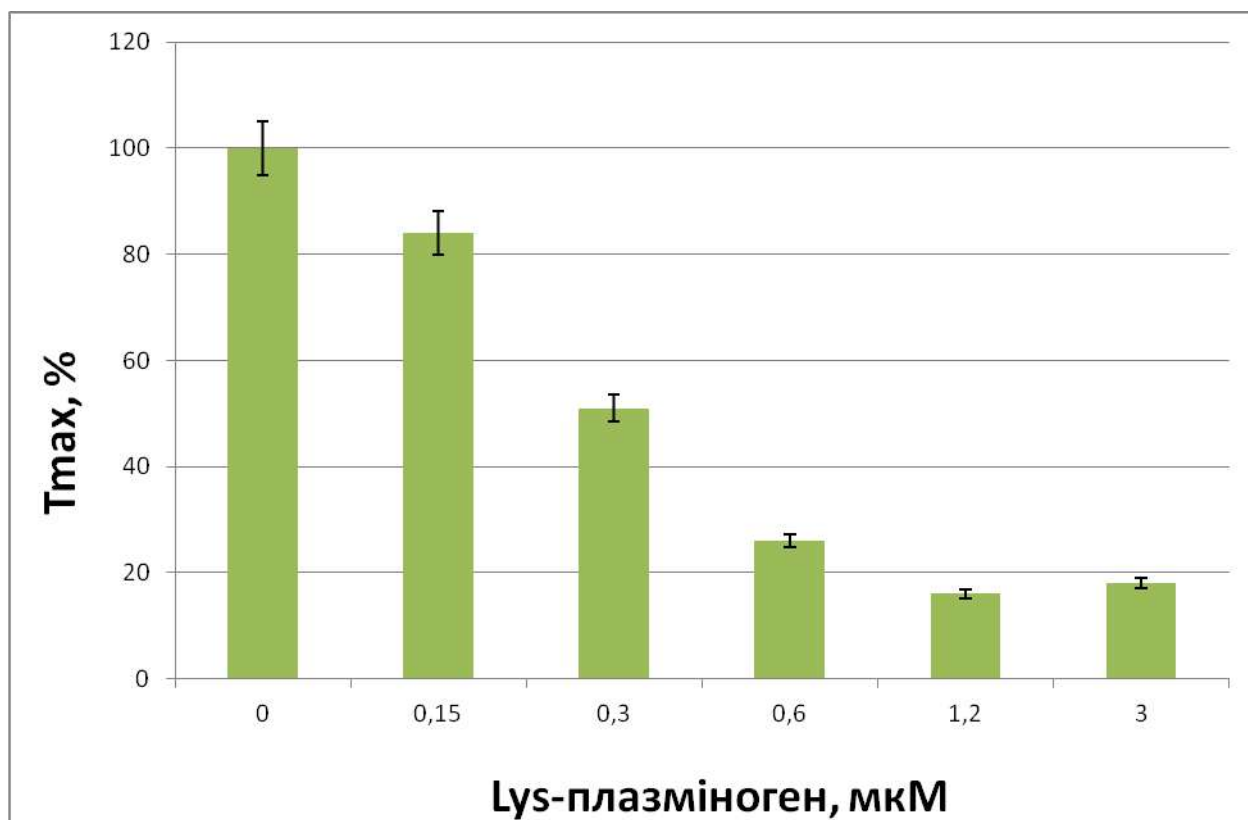


Рис. 3.26 Вплив різних концентрацій Lys-плазміногену на агрегацію тромбоцитів, індуктор – 1 од. NIH/мл тромбін ( $n = 3$ ). Ступінь контрольної агрегації прийнято за 100%.

Наявність інгібуючого ефекту Lys-плазміногену та відсутність його у разі Glu-плазміногену можна пояснити структурними особливостями цих молекул. Відсутність N-кінцевого фінгер-домену в молекулі Lys-плазміногену сприяє формуванню відкритої конформації його молекули. Тому Lys-форма проензиму з більш високою ефективністю розщеплюється активаторами плазміногену, порівняно з Glu-формою [226], а також з більш високою афінністю зв'язується з фібрином [367] та поверхнею клітин [368].

Ефект Lys-плазміногену ставить питання про можливе фізіологічне значення цієї молекули. Ця форма проензиму за нормальних умов відсутня у кровотоці. Вперше Lys-плазміноген виявили в плазмі крові пацієнтів, що підлягали дії тромболітичної терапії [369]. Пізніше було доведено, що генерація цього проензиму відбувається локально, тому його немає у

системному кровотоці здорових донорів. Lys-плазміноген визначали за допомогою імуногістохімічних методів на поверхні макрофагів та в осередках запалення [370], а також на поверхні ендотеліоцитів судин різних органів як в нормі, так і під час хронічних запальних процесів [371]. В роботі співробітників відділу хімії та біохімії ферментів Інституту біохімії було показано, що за певних умов Lys-плазміноген може утворюватися на поверхні тромбоцитів [372]. Можливо, що ця молекула є не тільки проміжною формою для утворення плазміну, а створює певний вплив на функціональні властивості тромбоцитів.

Надалі вивчали вплив Lys-плазміногену на ристоміцин-індуковану аглютинацію тромбоцитів, що, як відомо, опосередкована взаємодією GP Ib-IX-V та vWF. Для цього суспензію нативних тромбоцитів передінкубували з ристоміцином (1,5 мг/мл) та Lys-плазміногеном (1,2 мкМ) протягом трьох хвилин. Аглютинацію тромбоцитів стимулювали, додаючи аутологічну плазму крові, як джерело vWF. Виявили, що аглютинація тромбоцитів, індукована ристоміцином, не пригнічується Lys-плазміногеном (Рис. 3.27). Пропорційне підвищення концентрації Lys-плазміногену до 1,4 мкМ (з огляду на внесення в реакційне середовище фібриногену у складі аліквоти плазми) не супроводжується інгібуванням процесу аглютинації.

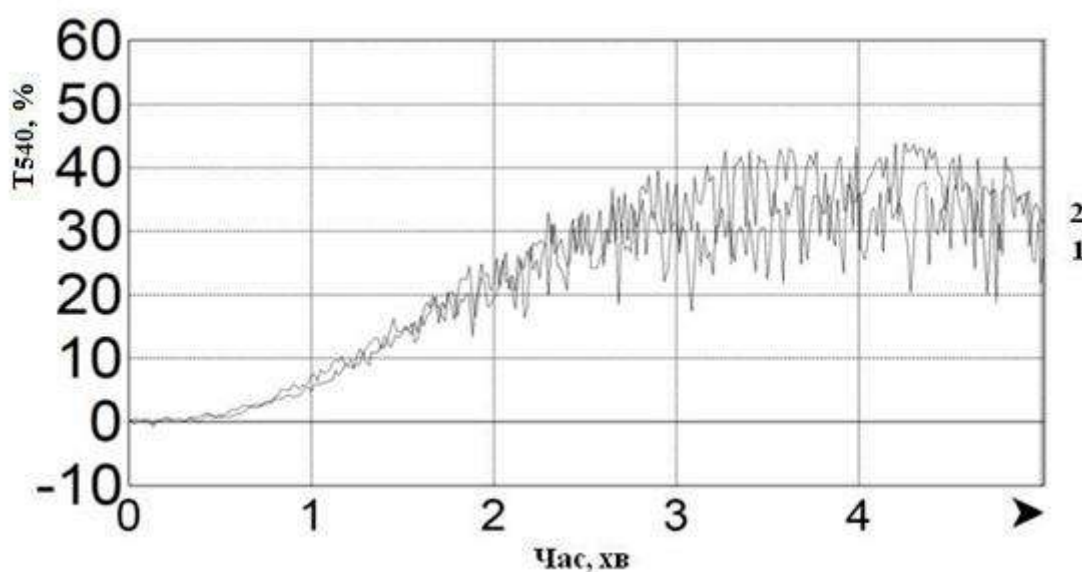


Рис. 3.27 Вплив Lys-плазміногену на аглютинацію відмитих тромбоцитів людини, індуктор – 1,5 мг/мл ристоміцин: 1 – контрольна аглютинація, 2 – 1,2 мкМ Lys-плазміноген.

Аналізуючи отримані результати, можна зробити висновок щодо механізму інгібіторної дії Lys-плазміногену. Цілком імовірно, що цей ліганд не чинить інгібувального впливу на адгезивні контакти, що забезпечуються глікопротеїном GP Ib-IX-V та фактором фон Віллебранду. Дія Lys-плазміногену спрямована на контакти, які опосередковані взаємодією  $\beta 3$ -інтегринів з їх лігандами. Такий висновок узгоджується з даними літератури стосовно цього питання. Adelman et al. встановлено, що моноклональні антитіла проти сайту зв'язування фактору фон Віллебранда на GP Ib, взяті у концентрації достатній для повного інгібування ристоміцин-індукованої аглютинації, не впливали на зв'язування плазміногену з тромбоцитами [252].

На основі результатів агрегометрії можна зробити висновок про те, що Lys-плазміноген виявляє потужну інгібувальну дію щодо необоротної агрегації тромбоцитів, стимульованих високими концентраціями агоністів – ADP, тромбіну та колагену. Дозозалежний характер інгібування тромбін-індукованої агрегації вказує на специфічну взаємодію Lys-плазміногену з обмеженим числом сайтів зв'язування на тромбоцитарній поверхні. Ристоміцин-залежна аглютинація тромбоцитів не пригнічується Lys-плазміногеном, що свідчить про селективність його дії щодо механізму агрегації. Аналіз отриманих даних дозволяє припустити, що антиагрегаційний ефект обумовлений взаємодією Lys-плазміногену з протеїнами, що вивільняються або експонуються тромбоцитами під час активації та залучаються до процесу агрегації. Не виключено, що така взаємодія перешкоджає асоціації лігандів з їх інтегриновими рецепторами та запобігає формуванню міжтромбоцитарних контактів. Як варіант можна розглянути взаємодію Lys-плазміногену з тромбоспондином, який експонується на поверхні активованих тромбоцитів [400]. Відомо, що один з



двох фібриноген-зв'язуючих сайтів в молекулі тромбоспондину є також сайтом зв'язування для плазміногену. Таким чином, можна припустити, що екзогенний Lys-плазміноген здатен зв'язуватись з тромбоспондином, перешкоджаючи ефективному зв'язку цього протеїна з фібриногеном (Рис. 3.28). В результаті такого впливу Lys-плазміногену тромбоспондин-залежні адгезивні контакти порушуються і агрегація тромбоцитів стає менш ефективною.

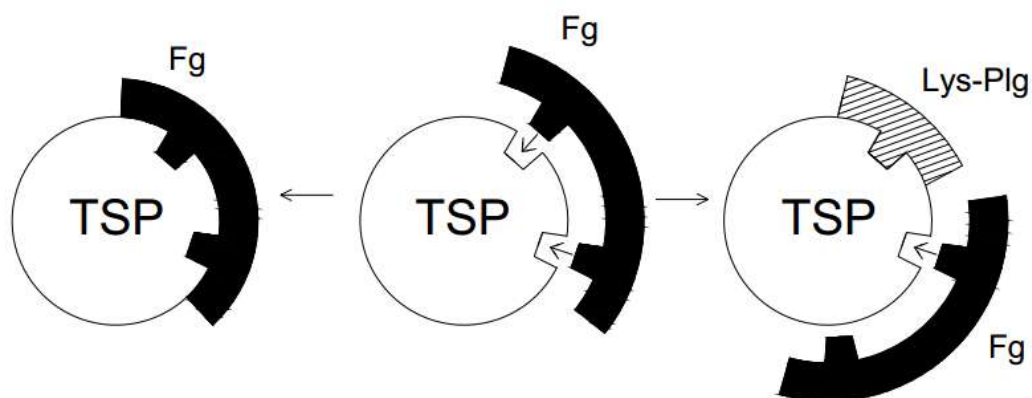


Рис. 3.28 Фібриноген-тромбоспондинова взаємодія в присутності Lys-плазміногену: Fg – фібриноген, TSP – тромбоспондин, Lys-Plg – Lys-плазміноген.

На наступному етапі нашої роботи вивчали механізм інгібування Lys-плазміногеном агрегації тромбоцитів, а саме завданням було з'ясувати, який структурний компонент молекули плазміногену – серинпротеїназний домен або кринглові домени – перешкоджає утворенню міжклітинних контактів під час агрегації тромбоцитів.

Для того щоб з'ясувати, чи не є даний феномен наслідком ензиматичної активності плазміну, що може утворюватися в середовищі агрегації, нами проведено ряд наступних експериментів.

По-перше, ми перевірили вплив різних концентрацій плазміну на агрегаційну здатність тромбоцитів [373]. В науковій літературі існують суперечливі дані стосовно цього питання. Стосовно високих доз плазміну

доведено, що плазмін в концентрації 1 CU/мл (за даними Schafer et al, 1986 1 CU дорівнює приблизно 0,45 нМ) здатен викликати агрегацію тромбоцитів [374]. Автори роботи пояснюють такий ефект дією плазміну на PAR-рецептори тромбоцитів. Дослідження низьких доз плазміну на тромбоцитарну агрегацію дало суперечливі результати. Так, в роботі Schafer та Adelman [375] було показано, що низькі дози плазміну спричиняли інгібувальний вплив на тромбін- та колаген-індуковану агрегацію відмитих тромбоцитів людини. Автори роботи спостерігали повну втрату агрегаційної здатності тромбоцитів, якщо перед додаванням індуктора вони були інкубовані протягом 20 хвилин з 0,1-0,5 CU/мл плазміну. Доза 0,05 CU/мл за таких умов знижувала максимальну амплітуду тромбін- та колаген-індукованої агрегації принаймні вдвічі. Разом з тим, в роботі Ervin та Peerschke [376] було показано, що інкубація тромбоцитів з плазміном 0,05 CU/мл протягом 60 хв призводить до активації тромбоцитів. Автори роботи застерігають, що використання плазміну в якості тромболітика є небезпечним і може викликати тромботичні ускладнення.

На рис. 3.29 наведено типові агрегатограми, які відображають дозозалежний вплив плазміну на агрегацію тромбоцитів. Показано, що плазмін в концентрації 1 CU/мл викликав зміни, які характерні для дії агоністів агрегації (наприклад тромбіну).

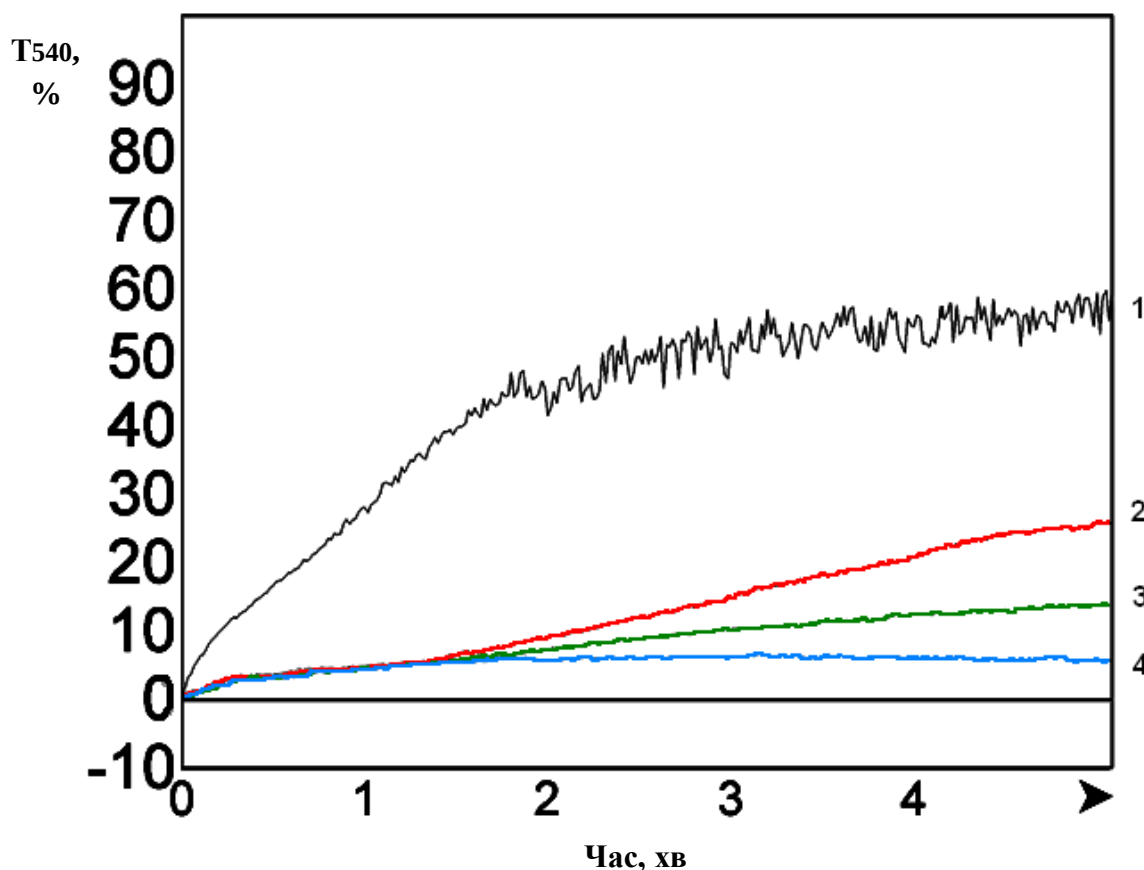


Рис. 3.29 Агрегація тромбоцитів людини, індукована різними концентраціями плазміну: 1 – контрольна агрегація тромбоцитів, індукована тромбіном (1 од. NIH/мл); 2 – 1 CU/мл плазмін; 3 – 0,5 CU/мл плазмін; 4 – 0,25 CU/мл плазмін.

Ці дані узгоджуються з результатами Schafer et al. [374], які показали, що плазмін в концентрації 1 CU/мл викликав часткову агрегацію тромбоцитів, а в концентрації 1,5 CU/мл – повну агрегацію порівняльно з дією тромбіну в концентрації 1 U/мл. Автори роботи [377] вважають, що стимулюючий вплив плазміну на агрегацію тромбоцитів зумовлений його дією на PAR–рецептори. Поява в плазмі таких високих концентрацій плазміну можлива внаслідок тромболітичної терапії. Було доведено, що при лікуванні стрептокіназою гострого інфаркта міокарду концентрація стрептокінази в плазмі досягає 300

IU/мл. Така концентрація стрептокінази приводила до появи плазміну 0,5-1,0 CU/мл [378] через 15 хв.

Експерименти з використанням протокової цитофлуориметрії показали, що зв'язування плазміну з тромбоцитами інгібувалося апротиніном та 6-аміногексановою кислотою, що свідчило про участь лізин-зв'язуючих сайтів та каталітичного домену у взаємодії плазміну з тромбоцитами [379]. Слід сказати, що Lys-плазміноген у співвідношенні з плазміном 2:1 та 4:1 інгібував плазмін-індуковану активацію тромбоцитів, в той час як Glu-плазміноген навіть у співвідношенні 15:1 не виявляв такого впливу [380]. Тобто, можна припустити, що якщо в системі присутній Lys-плазміноген в достатній кількості, то плазмін, який може утворитися під час попередньої інкубації тромбоцитів з Lys-плазміногеном, не буде впливати на агрегаційну здатність цих клітин. Це узгоджується з нашими дослідженнями щодо інгібувального впливу Lys-плазміногену на тромбін- та колаген-індуковану агрегацію відмитих тромбоцитів.

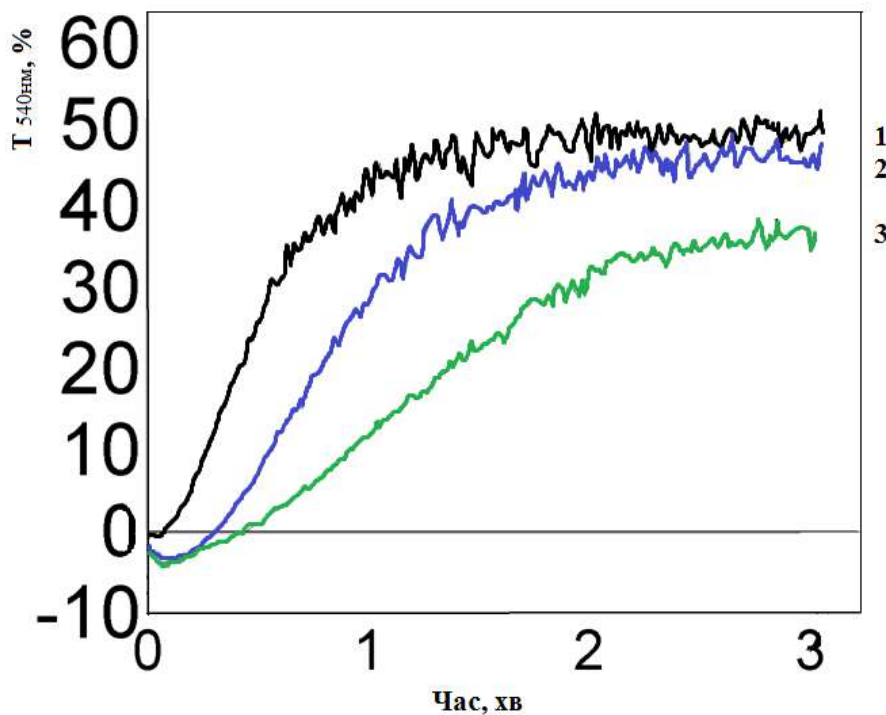
Наступним етапом було визначення впливу плазміну на тромбін- та колаген-індуковану агрегацію тромбоцитів.

Кількість плазміну у середовищі агрегації визначали методом реєстрації амідолітичної активності ензиму. З цією метою попередньо було отримано ряд кінетичних кривих, що описують вивільнення *n*-нітроаніліну внаслідок гідролізу хромогенного субстрату S 2251 плазміном (1,0 - 20,0 нМ). Для кожної кривої визначали швидкість ензиматичної реакції як тангенс кута нахилу початкової висхідної ділянки до осі абсцис. Будували калібрувальну криву залежності швидкості гідролізу S 2251 плазміном від концентрації ензиму. За результуючою швидкістю гідролізу хромогенного субстрату в середовищі, що містило інтактні тромбоцити людини (300 - 350 тис. клітин/мкл) та 1,2 мкМ Lys-плазміногену, визначили концентрацію плазміну, як 1,2 нМ. Для цього суспензію інтактних тромбоцитів людини інкубували з плазміном (1,2 нМ) за 37°C протягом 3 хв при перемішуванні, потім агрегацію тромбоцитів стимулювали внесенням агоністу. Нами не виявлено

впливу екзогенного плазміну на агрегацію тромбоцитів за умов експерименту (табл. 3.2). Отримані результати узгоджуються з даними, що наведені у роботі Pasche et al. [381], де показано відсутність впливу наномолярних концентрацій плазміну на тромбін-стимульовану агрегацію у разі, якщо час інкубації не перевищував 5 хв.

Надалі дослідили ефект більших концентрацій (50-100 нМ) плазміну на тромбін- та колаген-індуковану агрегацію відмитих тромбоцитів. Для цього суспензію інтактних тромбоцитів людини інкубували з плазміном за 37°C протягом 3 хв при перемішуванні, потім агрегацію тромбоцитів стимулювали внесенням агоністу. Нами показано, що після передінкубації інтактних тромбоцитів з плазміном у концентраціях 50 та 100 нМ спостерігається незначне інгібування агрегації тромбоцитів, стимульованих тромбіном (рис. 3.30), тоді як ступінь колаген-індукованої агрегації знижується принаймні вдвічі (рис. 3.31).

А



Б

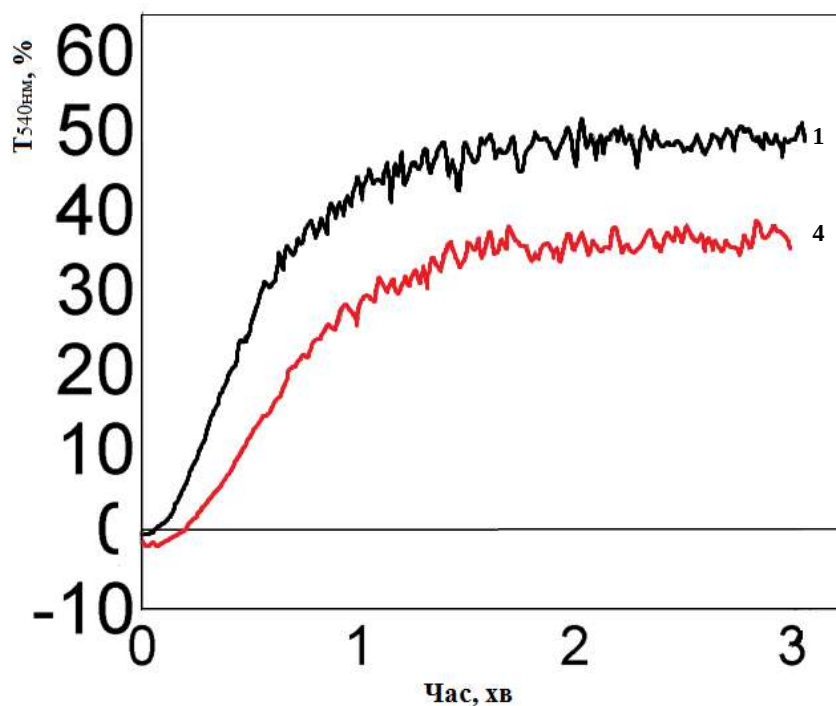


Рис. 3.30 Вплив екзогенного плазміну на агрегацію тромбоцитів людини, стимульованих тромбіном (1 од. НІН/мл): 1 – контрольна агрегація (МА = 51,8 %,  $V_{30c}$  = 52,5 %/хв), 2 – 2% гліцерол (МА = 53,5 %,  $V_{30c}$  = 49,1 %/хв), 3 – 100 нМ плазмін (МА = 41,9 %,  $V_{30c}$  = 14,1 %/хв), 4 – 50 нМ плазмін (МА = 39,9 %,  $V_{30c}$  = 26,1 %/хв).

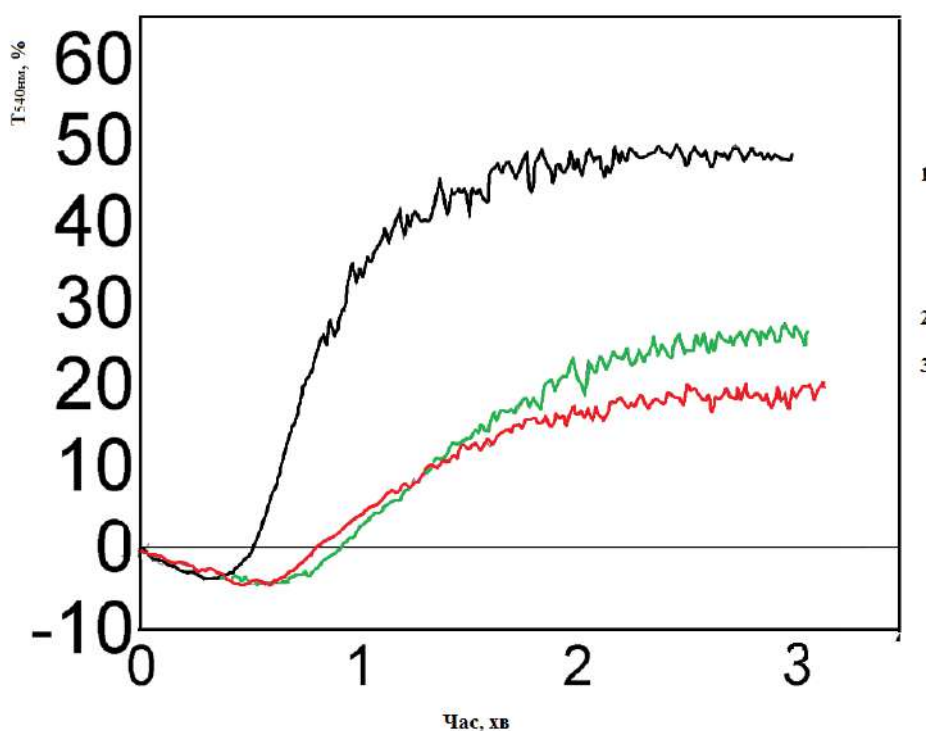


Рис. 3.31 Вплив екзогенного плазміну на агрегацію тромбоцитів людини, стимульованих колагеном (1,25 мг/мл): 1 – контрольна агрегація (МА = 53 %,  $V_{30c} = 55,2$  %/хв), 2 – 50 нМ плазмін (МА = 32,4 %,  $V_{30c} = 18,1$  %/хв), 3 – 100 нМ плазмін (МА = 25,4 %,  $V_{30c} = 19,4$  %/хв).

За відсутності передінкубації плазмін у вказаних концентраціях достовірно не пригнічував тромбін-індуковану агрегацію тромбоцитів. Ізольована дія плазміну (100 нМ) або гліцеролу не індукує спонтанної агрегації тромбоцитів за умов експерименту. Разом з тим, гліцерол, в якому зберігалися препарати плазміну, не чинив достовірного ефекту на агоніст-індуковану агрегацію тромбоцитів, якщо його концентрація в середовищі інкубації не перевищувала 2 %. Можливо, що важливий внесок до антиагрегативних ефектів плазміну робить взаємодія його некаталітичних ділянок з молекулярними мішенями на поверхні тромбоцитів, як це показано в експериментах з використанням Lys-плазміногену. За думкою Takada Y, плазмін зв'язується з клітинами завдяки інтегриновим рецепторам, наприклад, показан безпосередній зв'язок плазміна з інтегрином  $\alpha V\beta 3$  [382]. Залежно від концентрації плазміну та участі агоністів реалізуються два протилежних шляхи плазмінового впливу на тромбоцити (Рис. 3.32). За умов дії високих концентрацій плазміну (приблизно 1 CU/мл та вище) та без участі агоністів (тромбіну або колагену) відбувається активація тромбоцитів завдяки впливу ензиму на PAR-рецептори. При цьому, як зазначають автори роботи [374], відбувається активація фосфоліпази C, утворення інозитол-3 фосфату, взаємодія його з відповідними рецепторами на поверхні гранул, та секреція іонів кальцію. Це приводить через ряд відповідних етапів до активації інтегринів (за механізмом inside-out) і підвищенню адгезивних властивостей тромбоцитів. До того ж, Rabhi-Sabile S et al. [383] встановили, що обмежений протеоліз  $\alpha IIb\beta 3$  призводить до набуття цим глікопротеїном активної конформації та супроводжується зростанням кількості фібриногену, сорбованих на поверхні активованих тромбоцитів.

Але за умов стимулюючої дії тромбіну або колагену плазмін здатен виявляти інгібуючий вплив на утворення міжтромбоцитарних контактів, або здійснюючи протеолітичну деградацію інтегринових рецепторів, або зв'язуючись з ними, перешкоджати зв'язку лігандів, які забезпечують міжклітинні контакти. Як було показано в роботі Kost C et al., плазмін здатен змінювати властивості і самих лігандів [384]. Так, обмежений протеоліз вітронектину, який вважається прокоагулянтним фактором, призводить до того, що цей адгезивний ліганд набуває здатності до посиленого зв'язку з крингловими структурами плазміногену, що, як свідчать результати наших досліджень, справляє негативний вплив на утворення міжтромбоцитарних зв'язків.

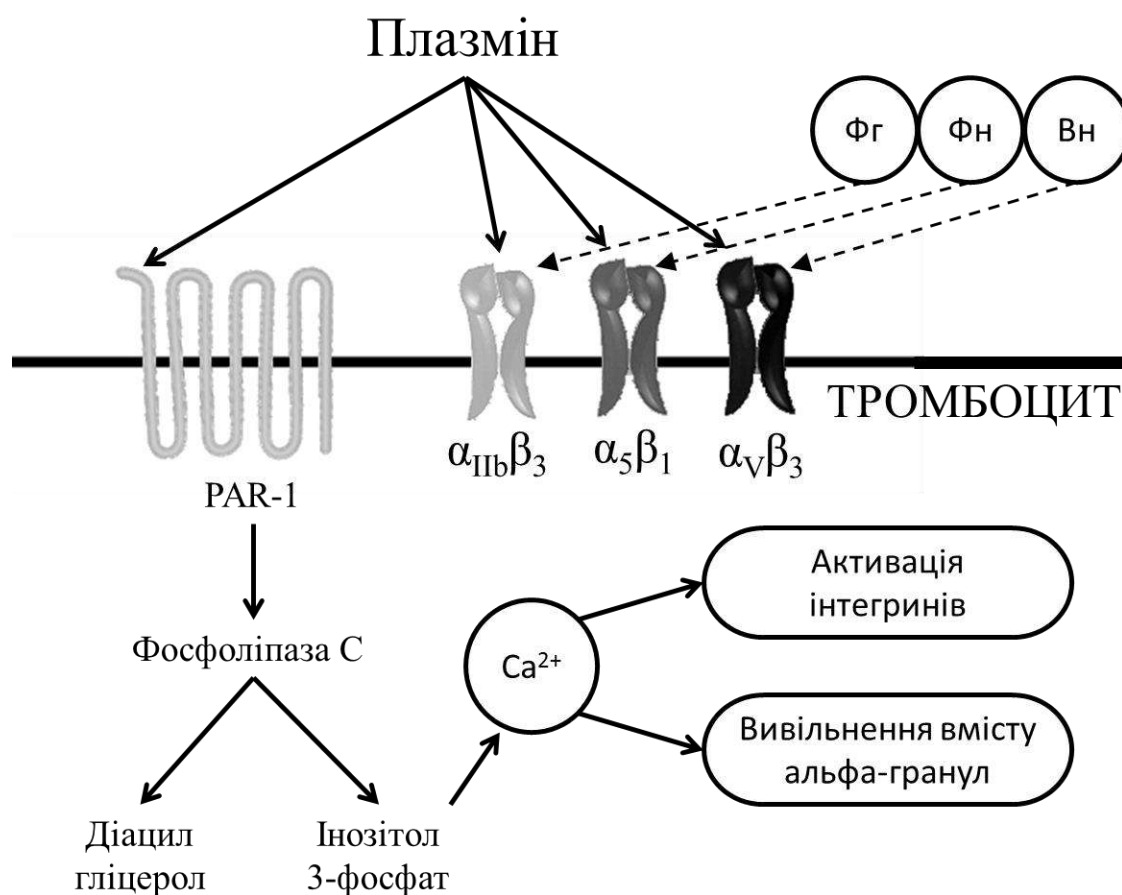


Рис. 3.32 Схема дії плазміну на тромбоцитарні інтегрини.

Фг – фібриноген, Фн – фібронектин, Вн – вітронектин.



Розглянуті особливості плазмінової дії можуть значення при розгляді певних патологій. Відомо, що у плазмі крові хворих з карциномою простати та раком яєчника спостерігається підвищений вміст остеопонтину [385]. Як згадувалося раніше, цей адгезивний протеїн здатен утворювати зв'язок з інтегрином  $\alpha V\beta 3$  та можливо, іншими тромбоцитарними інтегринами, оскільки має у своєму складі послідовність RGD. Було показано, що плазмінова деградація остеопонтину веде до посиленню адгезії, яка забезпечується завдяки інтегринам  $\alpha V\beta 3$  та  $\alpha 5\beta 1$ . Таким чином, за умов наявності плазміну підвищується здатність тромбоцитів утворювати контакти з пухлинними клітинами. Аналогічні механізми можуть бути в основі підвищеної адгезії тромбоцитів до ушкоджених стінок артерій. За даними літератури, у пацієнтів з атеросклерозом спостерігається підвищений рівень остеопонтину у плазмі крові [386]. При наявності у таких хворих плазмінової активності на поверхні клітин є підстави для швидкого утворення тромбу.

Щоб оцінити внесок серинпротеїназного домену плазміногену в реалізацію антиагрегаційного ефекту Lys-плазміногену було проведено серію експериментів з інгібітором серинових протеїназ, аprotиніном. Інгібітор використовували в концентрації 5,5 МО/мл. Обрана концентрація аprotиніну інгібує активність наномолярної концентрації плазміну в середовищі агрегації, проте не пригнічує власне процес агрегації тромбоцитів, стимульованих тромбіном. За даними літератури аprotинін здатен з високою спорідненістю, проте оборотно, зв'язуватись с плазміном ( $K_i = 2.3 \cdot 10^{-10}$  М). Нами показано, що зниження ступеню та швидкості тромбін-індукованої агрегації під впливом Lys-плазміногену спостерігається за присутності аprotиніну (див. табл. 3.2). Обрана концентрація аprotиніну інгібує активність наномолярної концентрації плазміну в середовищі агрегації, проте не пригнічує власне процес агрегації тромбоцитів, стимульованих тромбіном. Отримані результати узгоджуються з даними, представленими в роботі [243],

де було показано, що аprotинін не перешкоджав зв'язуванню плазміногену з тромбоцитами, які стимульовані тромбіном, проте повністю блокував ефекти, обумовлені супутнім плазміном.

Таблиця 3.2.

**Вплив плазміну та аprotиніну на інгібування Lys-плазміногеном агрегації тромбоцитів, що стимульована тромбіном ( $M \pm m$ ;  $n = 6$ )**

|                                                  | Максимальна<br>амплітуда агрегації, % | Швидкість агрегації<br>на 30 с, %/хв |
|--------------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| Контрольна агрегація                             | $44,60 \pm 9,51$                      | $18,25 \pm 6,23$                     |
| 1,2 мкМ Lys-плазміноген                          | $17,70 \pm 2,51^*$                    | $7,42 \pm 5,47^*$                    |
| 1,2 нМ плазмін                                   | $42,60 \pm 3,36$                      | $17,26 \pm 4,88$                     |
| 5,5 МО/мл аprotинін                              | $45,36 \pm 5,68$                      | $18,00 \pm 5,19$                     |
| 1,2 мкМ Lys-плазміноген<br>+ 5,5 МО/мл аprotинін | $15,75 \pm 4,35^*$                    | $5,20 \pm 1,06^*$                    |

**Примітка.** Відмінності у порівнюваних групах є статистично значимими ( $p < 0,05$ ):

\* - порівняно з показниками «Контрольної агрегації».

Таким чином, в експериментах з екзогенним плазміном та аprotиніном ми не виявили участі серинпротеїназного домену в реалізації антиагрегаційного ефекту Lys-плазміногену. Можна припустити, що дія цього проензиму опосередкована його крингловими структурами.

Міжпротеїнові взаємодії плазміногену реалізуються за участі LBS, що розташовані в його кринглових доменах. Аналог лізину 6-аміногексанова кислота блокує LBS зимогену й порушує такі взаємодії. Тому надалі вивчали ефект 6-АГК на інгібування Lys-плазміногеном агрегації тромбоцитів. Встановили, що в концентраціях 0,05 - 0,5 мМ 6-АГК послаблює

антиагрегаційний ефект Lys-плазміногену, тоді як за присутності 1 мМ 6-АГК зниження ступеня тромбін-індукованої агрегації за дії Lys-плазміногену не спостерігається (рис. 3.33). Діапазон діючих концентрацій 6-АГК вказує на залучення до взаємодії «плазміноген - тромбоцит» LBS високої та низької афінності. 6-АГК виявляє подібний ефект на інгібування Lys-плазміногеном агрегації тромбоцитів, стимульованих колагеном. При цьому, 6-АГК у вказаних концентраціях не

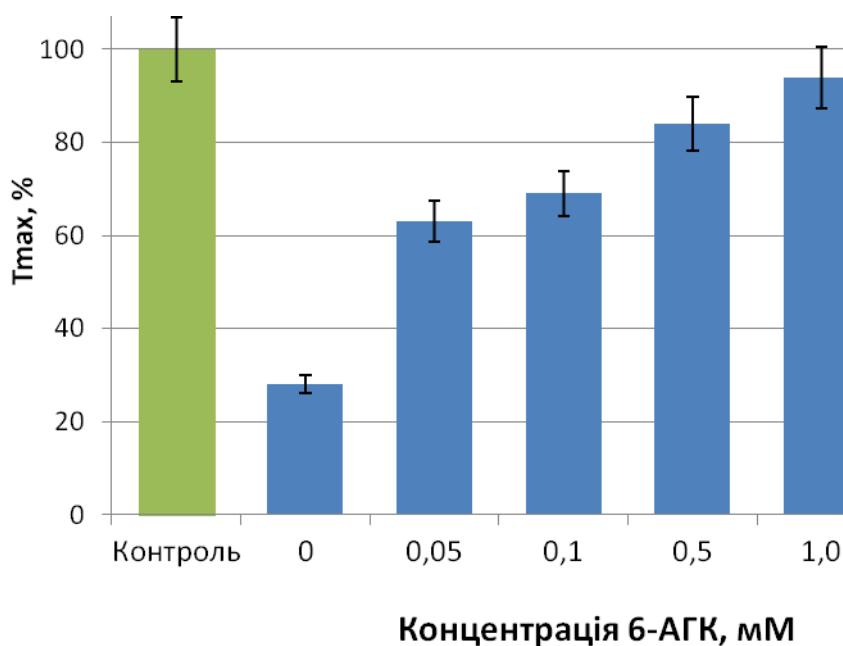


Рис. 3.33 Інгібування Lys-плазміногеном (1,2 мкМ) тромбін-індукованої агрегації відмитих тромбоцитів за присутності 6-аміногексанової кислоти (n = 3). Контроль – тромбін-індукована агрегація.

впливає власне на процес агоніст-індукованої агрегації. В роботах Miles et al. IC<sub>50</sub> 6-АГК були близькими за значеннями: 20 мкМ 6-АГК на 50% пригнічувала зв'язування Glu-плазміногену та його фрагменту (амінокислотна послідовність 1-3 кринглових доменів) до тромбін-стимульованих тромбоцитів [242, 387].

Таким чином, встановлено, що екзогенний плазмін у наномолярній концентрації не впливає на агрегацію тромбоцитів. Антиагрегаційна дія Lys-плазміногену не обумовлена каталітичною активністю його

серинпротеїназного домену, оскільки виявляється навіть за присутності інгібітора серинових протеїназ апротиніну в середовищі агрегації. Дані, отримані в експериментах з 6-АГК, вказують на те, що для забезпечення інгібувального ефекту Lys-форми зимогену визначальною є високоспецифічна взаємодія проензиму з протеїнами на поверхні тромбоцитів, що опосередкована LBS його кринглових структур. Тому наступною задачею нашої роботи було вивчити дію крингльових фрагментів плазміногену на агрегацію тромбоцитів людини та інгібувальний ефект Lys-плазміногену щодо агрегації.

В організмі людини плазміноген є попередником ангіостатинів – крингльових фрагментів (K1-3, K1-4, K1-4,5 та K1-5) та окремих кринглових доменів зимогену, які виявляють антиангіогенні властивості [388, 389, 390]. Такі фрагменти утворюються в плазмі крові та на клітинній поверхні під дією еластази нейтрофілів, матриксних металопротеїназ, калікреїну або за рахунок автолізу плазміну [391]. Як відомо, біологічна дія ангіостатинів пов'язана із пригніченням проліферації та міграції ендотеліальних клітин [392], а також інгібуванням рекрутування нейтрофілів [393] та макрофагів [394] до осередку пухлиноутворення, наслідком чого є сповільнення неоваскуляризації, ангіогенезу, пухлинного росту та метастазування. Тонкі відмінності у структурній організації кринглових доменів у складі ангіостатинів обумовлюють їх неоднакову афінність щодо аналогів лізину, рецепторів, протеїнів-мішеней, а також забезпечують диференціювання їх регуляторних функцій, не властивих нативній молекулі плазміногену [233].

Останнім часом з'являється все більше даних про участь тромбоцитів у регуляції процесу росту нових кровоносних судин. Під час активації тромбоцити вивільняють численні фактори, які модулюють ангіогенез [395]. Серед них – фактор росту судинного ендотелію VEGF, основний фактор росту фібробластів bEGF, епідермальний фактор росту EGF, фактор росту тромбоцитарного походження PDGF та матричні металопротеїнази. Jurasz et

al. показали, що на поверхні неактивованих тромбоцитів шляхом гідролізу тромбоцитарного та екзогенного плазміногену має місце конститутивне утворення ангіостатинів K1-4 та меншою мірою K1-3 [396]. Проте, автори не виключають можливості генерації ангіостатинів з іншим набором кринглових доменів за участю інших клітин крові. Будучи осередком генерації про- та антиангіогенних факторів тромбоцити можуть підпадати під аутокринний вплив проміжних та кінцевих продуктів розщеплення плазміногену. Разом з тим, вивчення впливу фрагментів молекули проензиму допоможе з'ясувати, які саме кринглові домени Lys-плазміногену опосередковують його зв'язування та антиагрегаційний ефект.

В нашій роботі вивчали дію крингловмісних фрагментів плазміногену – K1-3, K4, K5 та Val 442-плазміногену (мініплазміногену) – на агрегацію відмитих тромбоцитів людини, індуковану тромбіном. Для модуляції агрегаційної здатності тромбоцитів препарати кринглових фрагментів K1-3, K4 і K5 додавали у концентрації, що була визначена найбільш ефективною для Lys-плазміногену (1,2 мкМ), а також в 5-кратному надлишку (з огляду на меншу кількість LBS у складі кожного кринглу, порівняно з цілісною молекулою, та їх функціональні відмінності).

Виявили, що препарати K1-3 та K4, взяті окремо у концентраціях 1,2 мкМ та 6 мкМ або у комбінації K1-3+K4 (імітація ефекту ангіостатину K1-4 [259]), не пригнічують агрегацію тромбоцитів: показники агрегації достовірно не відхиляються від контрольних значень. Фрагмент плазміногену K5 (1,2 мкМ) також не виявляє антиагрегаційної дії (табл. 3.3).

Більш докладно слід зупинитися на експериментах, в яких вивчали вплив мініплазміногену на агрегацію тромбоцитів. Мініплазміноген являє собою каталітичний домен і K5 плазміногену. З метою розмежування ефектів K5 та серинпротеїназного домену, а також мінімізації дії мініплазміну використовували такі підходи:

- вивчали вплив мініплазміногену на агрегацію тромбоцитів за присутності аprotиніну в середовищі агрегації;

- вивчали вплив препарату мініплазміногену, в якому ензиматична активність була попередньо заінгібована p-NPGB.

Встановили, що за умов інгібування активності серинпротеїназного домену мініплазміноген, подібно до власне K5 плазміногену, не пригнічує процес тромбін-стимульованої агрегації тромбоцитів людини (див. табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Вплив крингльмісних фрагментів плазміногену на агрегацію тромбоцитів людини, індуковану тромбіном ( $M \pm m$ ;  $n = 7$ )

|                                                | Максимальна амплітуда агрегації, % | Швидкість агрегації на 30 с, %/хв |
|------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| Контрольна агрегація                           | $43,19 \pm 6,91$                   | $17,55 \pm 4,00$                  |
| 1,2 мкМ Lys-плазміноген                        | $20,46 \pm 4,59^*$                 | $12,22 \pm 1,20$                  |
| 1,2 мкМ K1-3                                   | $44,50 \pm 6,36$                   | $15,05 \pm 4,01$                  |
| 6 мкМ K1-3                                     | $41,30 \pm 7,52$                   | $11,00 \pm 0,96$                  |
| 1,2 мкМ K4                                     | $41,00 \pm 5,42$                   | $14,00 \pm 3,08$                  |
| 6 мкМ K4                                       | $44,00 \pm 8,12$                   | $11,40 \pm 2,35$                  |
| 1,2 мкМ K1-3 + 1,2 мкМ K4                      | $43,72 \pm 5,70$                   | $16,82 \pm 1,70$                  |
| 1,2 мкМ K5                                     | $39,80 \pm 6,22$                   | $13,55 \pm 3,89$                  |
| 1,2 мкМ міні-плазміноген                       | $40,86 \pm 2,79$                   | $15,95 \pm 2,43$                  |
| 1,2 мкМ міні-плазміноген + 5,5 МО/мл апротинін | $46,70 \pm 7,56$                   | $14,40 \pm 3,16$                  |
| 1,2 мкМ міні-плазміноген (оброблений p-NPGB)   | $43,30 \pm 5,94$                   | $15,20 \pm 2,98$                  |

**Примітка:** відмінності у порівнюваних групах є статистично значимими ( $p < 0,05$ ): \* - порівняно з показниками «Контрольної агрегації».

Отже, нами вперше проведено дослідження ефектів ангіостатинів на агрегаційну здатність тромбоцитів. Показано, що крингльмісні фрагменти молекули плазміногену (K1-3, K4, K5 та мініплазміноген) не чинять впливу на агрегаційну здатність тромбоцитів людини, стимульованих тромбіном. Разом

з тим, на основі отриманих даних можна зробити попередній висновок про те, що для пригнічення процесу агрегації необхідна цілісна молекула Lys-плазміногену.

Слід зауважити, що використання фрагментів плазміногену в якості міметиків дії цілісної молекули не дає відповіді на питання, які саме кринглові структури плазміногену опосередковують зв'язування та дію цього проферменту на функціональні властивості тромбоцитів. Крім того, толерантність фрагментів плазміногену щодо агрегації не дозволяє говорити про факт зв'язування фрагментів плазміногену з поверхнею тромбоцитів. Тому надалі використовували крингльові фрагменти молекули в якості конкурентів Lys-плазміногену в середовищі агрегації. Для цього перед внесенням Lys-плазміногену (1,2 мкМ) та тромбіну (1 од. НІН/мл) суспензію неактивованих тромбоцитів інкубували протягом 1 хв із препаратами К1-3, К4 або К5 у концентраціях 0,12 - 1,2 мкМ (рис. 3.34-3.36). Контрольні криві інгібування Lys-плазміногеном агрегації тромбоцитів записували окремо за присутності буферів-розчинників для кожного препарату фрагменту плазміногену. Виявили, що передінкубація неактивованих тромбоцитів з еквімолярними концентраціями крингльових фрагментів запобігає прояву інгібувального ефекту Lys-плазміногену: спостерігається відновлення ступеню та швидкості тромбін-стимульованої агрегації до контрольних значень.

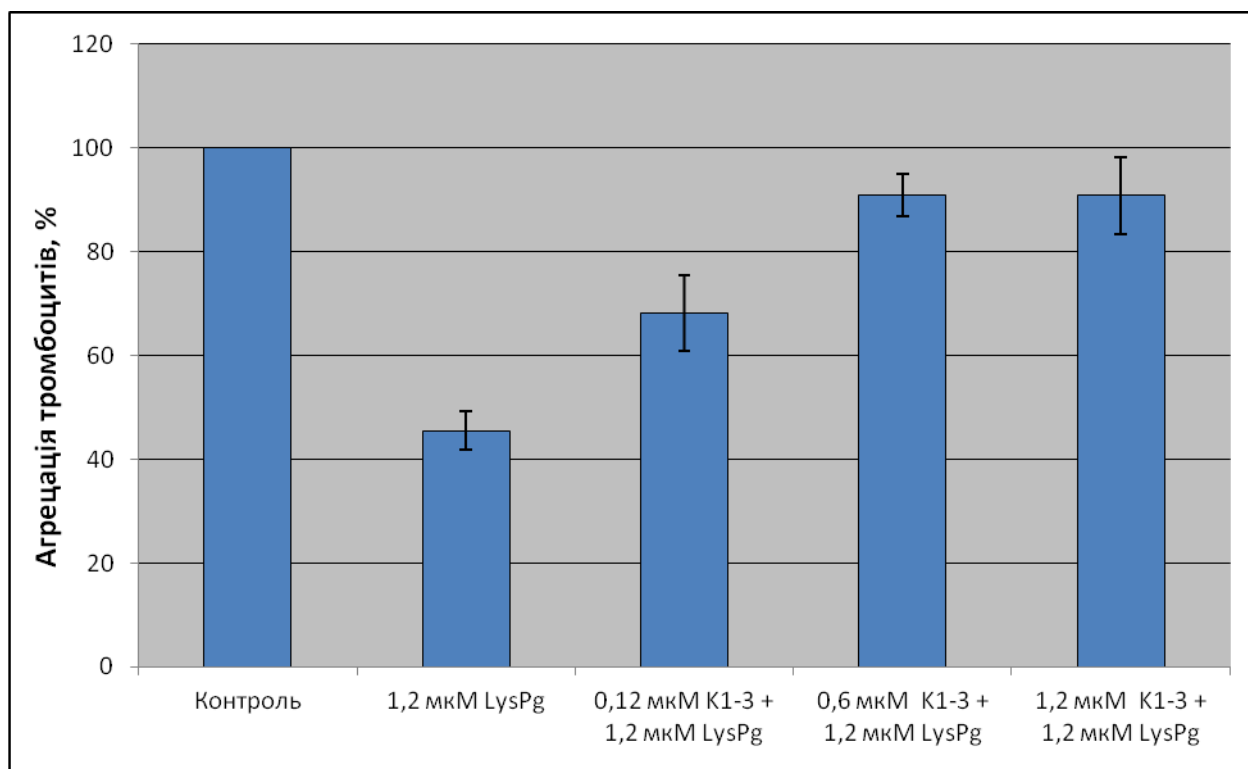


Рис. 3.34 Вплив фрагменту плазміногену К 1-3 на інгібіторний ефект Lys-плазміногену щодо тромбін-індукованої агрегації відмитих тромбоцитів: 1 – контрольна агрегація; 2 – 1,2 мкМ Lys-плазміногену; 3 – 0,12 мкМ K1-3 + 1,2 мкМ Lys-плазміногену; 4 – 0,6 мкМ K1-3 + 1,2 мкМ Lys-плазміногену; 5 – 1,2 мкМ K1-3 + 1,2 мкМ Lys-плазміногену; На рисунку представлені дані трьох експериментів.



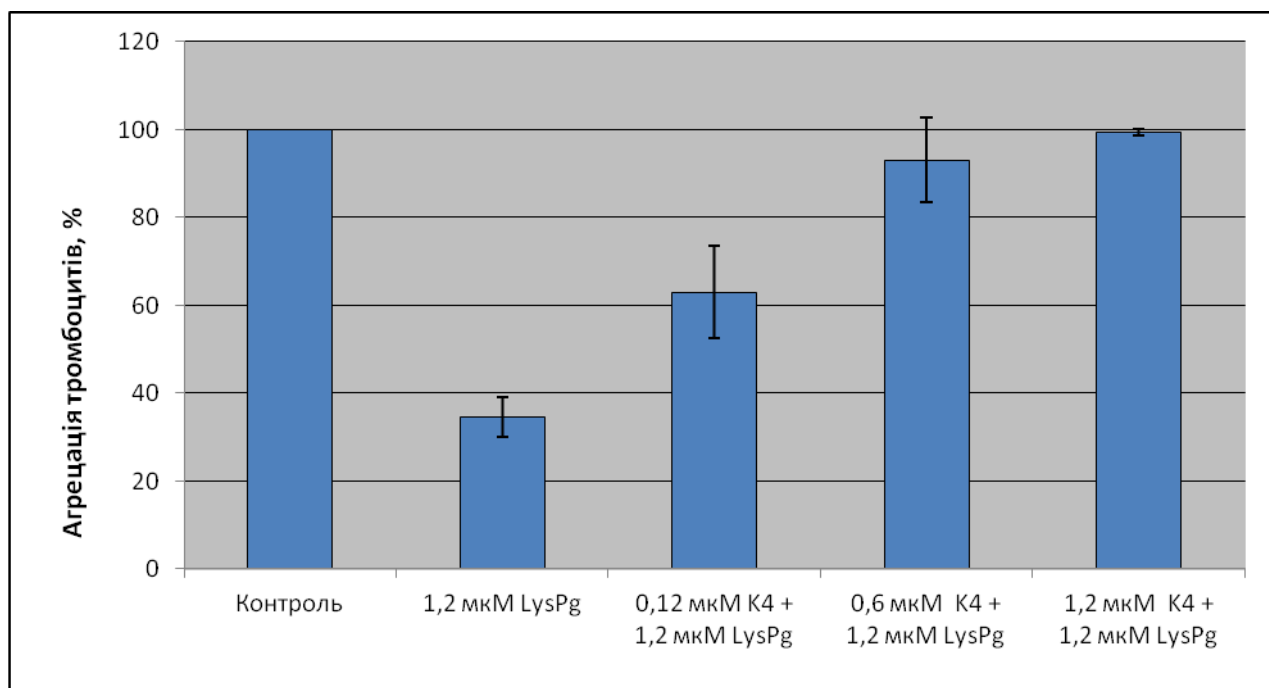


Рис. 3.35 Вплив фрагменту плазміногену К 4 на інгібіторний ефект Lys-плазміногену щодо тромбін-індукованої агрегації відмитих тромбоцитів: 1 – контрольна агрегація; 2 – 1,2 мкМ Lys-плазміногену; 3 – 0,12 мкМ К4 + 1,2 мкМ Lys-плазміногену; 4 – 0,6 мкМ К4+ 1,2 мкМ Lys-плазміногену; 5 – 1,2 мкМ К4 + 1,2 мкМ Lys-плазміногену; На рисунку представлені дані трьох експериментів.

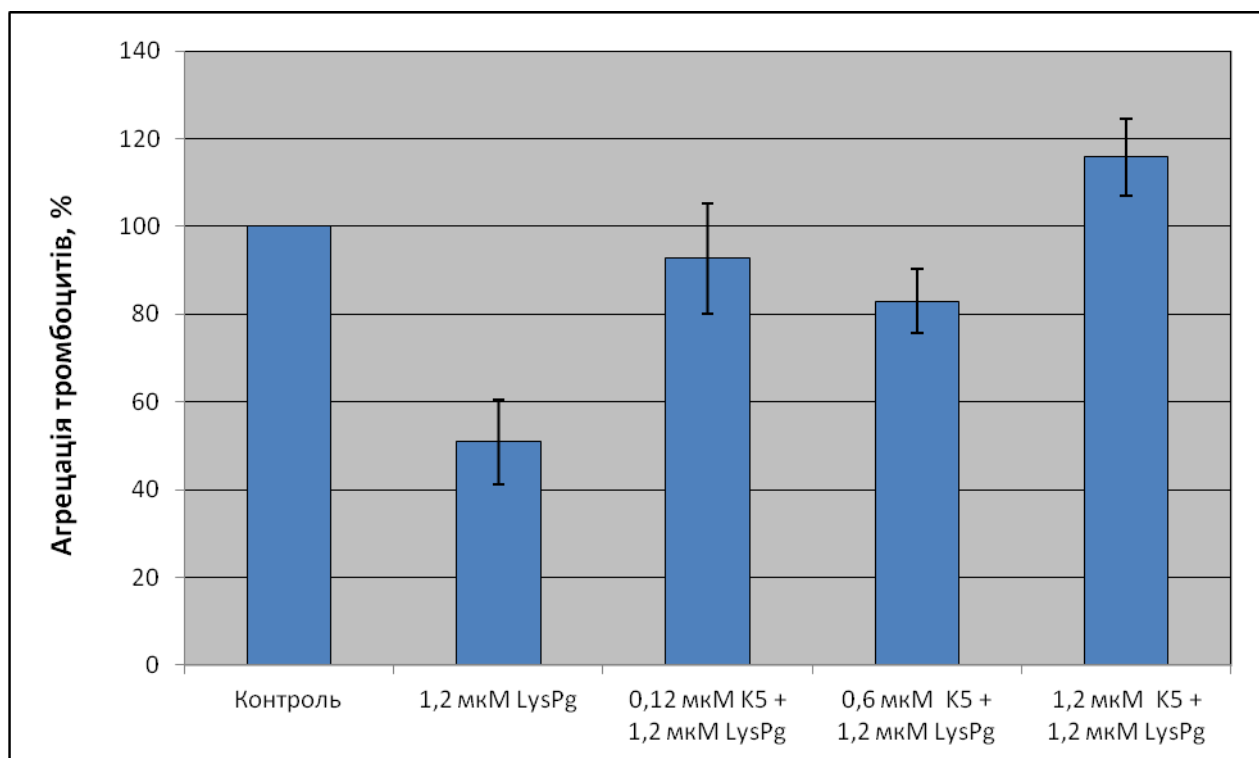


Рис. 3.36 Вплив фрагменту плазміногену К 5 на інгібіторний ефект Lys-плазміногену щодо тромбін-індукованої агрегації відмитих тромбоцитів: 1 – контрольна агрегація; 2 – 1,2 мкМ Lys-плазміногену; 3 – 0,12 мкМ K5 + 1,2 мкМ Lys-плазміногену; 4 – 0,6 мкМ K5 + 1,2 мкМ Lys-плазміногену; 5 – 1,2 мкМ K5 + 1,2 мкМ Lys-плазміногену; На рисунку представлені дані трьох експериментів.

Цікаво відмітити, що фрагмент плазміногену K5 вже у концентрації 0,12 мкМ відновлює ступінь агрегації тромбоцитів на 90%, тоді як K1-3 та K4 – лише наполовину від контрольного рівня [397, 398, 399]. Крім того, в присутності еквімолярних концентрацій K5 та Lys-плазміногену відмічено тенденцію до незначної стимуляції агрегації [400].

Результати наших експериментів узгоджуються з даними Miles et al. [387], які показали конкурентне інгібування зв'язування Glu-плазміногену з поверхнею нестимульованих тромбоцитів трьома типами фрагментів еластазного розщеплення плазміногену ( $IC_{50}$  для K1-3, K4 та мініплазміногену становили 12 мкМ, 29 мкМ та 14 мкМ, відповідно). З огляду на діючі концентрації кринглівмісних фрагментів найбільш

ефективною автори вважають амінокислотну послідовність, що відповідає 1-3 кринглам плазміногену. Проте, інгібувальні концентрації кринглових фрагментів у  $10^2$ - $10^3$  разів перевищують концентрацію плазміногену, що була взята авторами в описаних експериментах. В нашій же роботі концентрації кринглів були еквімолярними або на порядок поступалися діючій концентрації Lys-плазміногену, що, ймовірно, є наслідком більш високої спорідненості Lys-форми зимогену до тромбоцитарної поверхні, порівняно з Glu-плазміногеном.

Отже, нами показано, що, на відміну від цілісної молекули Lys-плазміногену, кринглові фрагменти зимогену – K1-3, K4 та K5 – не впливають на тромбін-індуковану агрегацію відмитих тромбоцитів людини. Мініплазміноген за умов інгібування каталітичної активності його серинпротеїназного домену також не виявляє антиагрегаційної дії. Разом з тим, нетривала передінкубація неактивованих тромбоцитів з препаратами K1-3, K4 та K5 запобігає інгібуванню Lys-плазміногеном агрегації цих клітин. Беручи до уваги отримані результати, можна зробити висновок про те, що зв'язування Lys-плазміногену з його рецепторами на тромбоцитарній поверхні відбувається із залученням LBS 1, 4 або 5 кринглового домену зимогеу. Конкурентна здатність крингльмісних фрагментів плазміногену є свідченням тотожності їх сайтів зв'язування з такими для Lys-плазміногену та, можливо, між собою. Отримані дані дають підстави вважати, що інгібування Lys-плазміногеном (але не Glu-формою зимогену) агрегації тромбоцитів обумовлене мультицентровим характером його взаємодії з тромбоцитарними рецепторами із залученням кількох кринглових доменів.

Отримані результати та аналіз даних літератури дозволяють запропонувати на роль рецепторів плазміногену на поверхні тромбоцитів плазміноген-зв'язувальні протеїни  $\alpha$ -гранул (тромбоспондин, фібриноген, вітронектин, гітидин-багатий протеїн), що вивільняються і залишаються асоційованими з мембраною цих клітин, а також інтегрини  $\beta 3$ -родини ( $\alpha \text{IIb}\beta 3$  та  $\alpha \text{V}\beta 3$ ). Як вже зазначалося, тромбоспондин залучається до утворення

міжтромбоцитарних контактів через взаємодію з фібриногеном, що асоційований з  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ , або безпосередньо з цим інтегрином [401]. Тромбоспондин має 2 сайти зв'язування з фібриногеном, причому один з них частково перекривається із сайтом зв'язування плазміногену. Плазміноген може зв'язуватися з цим адгезивним протеїном за допомогою 5 кринглового домену. Цікаво, що Lys-плазміноген виявляє втричі більшу спорідненість до тромбоспондину, ніж Glu-плазміноген [402]. Цілком ймовірно, що екзогенний Lys-плазміноген, зв'язуючись з тромбоспондином, перешкоджає взаємодії останнього з фібриногеном, і, як наслідок, повномасштабній агрегації тромбоцитів. Висока ефективність K5 у інгібування взаємодії «Lys-плазміноген-тромбоцит», що була показана в нашому дослідженні, свідчить на користь даного припущення. Разом з тим, взаємодія плазміногену з іммобілізованим на тромбоцитарній поверхні фібриногеном також не виключена. В розчині Lys-плазміноген зв'язується з фібриногеном із вкрай низькою афінністю [367]. Проте, нещодавно показано, що абсорбція фібриногену на поверхні індукує конформаційні перетворення в молекулі, внаслідок чого той набуває властивостей фібрину [403], який з високою афінністю зв'язує плазміноген [387].

Результати, що були отримані в нашій роботі, не виключають можливості, що інгібування агрегації тромбоцитів Lys-плазміногеном може бути проявом його регуляторної функції, а не лише наслідком створення стеричних перешкод на шляху формування міжтромбоцитарних контактів. Адже тотожність сайтів зв'язування Lys-плазміногену на поверхні тромбоцитів з такими для ангіостатинів може вказувати на залучення інтегрину  $\alpha\text{V}\beta_3$  до реалізації інгібувального ефекту Lys-плазміногену. Як відомо, ангіостатини K1-3, K1-5 та плазмін, на відміну від Glu-плазміногену, можуть зв'язуватися з  $\alpha\text{V}\beta_3$  на поверхні ендотеліоцитів артерій [404, 405]. Причому, сам проангіогенний ефект плазміну (індукція міграції ендотеліоцитів) опосередкований специфічною взаємодією його кринглових доменів з інтегрином. Ангіостатини, анти- $\alpha\text{V}\beta_3$  антитіла, RGD-пептид та

інгібітор серинових протеїназ блокують цей ефект [404]. Спираючись на результати експериментів по вивченню зв'язування свіжоотриманого плазміногену та так званого «aged»-плазміногену, Takada припускає, що частково деградована форма плазміногену також може зв'язуватися з  $\alpha V\beta 3$  за рахунок експонування в її молекулі інтегринзв'язуючих сайтів (можливо, кринглових доменів) [404]. Таким чином, в нашій роботі вперше встановлено, що плазміноген/плазмінова система може долучатися до регуляції функціонального стану тромбоцитів і тим самим обмежувати агрегаційну здатність цих клітин.

Отримані дані свідчать про залучення плазміноген/плазмінової системи, яка контролює функціональний стан багатьох типів клітин, до регуляції міжтромбоцитарних контактів через взаємодію з адгезивними протеїнами на поверхні мембран.

### Висновки

1. Lys-плазміноген, на відміну від Glu-форми, створює інгібувальний вплив на агрегацію тромбоцитів, індуковану ADP, тромбіном та колагеном.
2. Lys-плазміноген не чинить інгібувального впливу на адгезивні контакти, що забезпечуються глікопротеїном GP Ib-IX-V та фактором фон Віллебранду.
3. Антиагрегаційна дія Lys-плазміногену не обумовлена каталітичною активністю його серинпротеїназного домену, оскільки виявляється навіть за присутності інгібітора серинових протеїназ апротиніну в середовищі агрегації. Інгібувальний ефект Lys-форми зимогену опосередкований LBS його кринглових структур.

### **3.8. Вплив антикоагулянтних препаратів гепарину на ефекти плазміногену щодо утворення міжтромбоцитарних зв'язків**

Отримані дані стосовно інгібувального впливу Lys-плазміногену на утворення адгезивних зв'язків під час агрегації тромбоцитів поставили питання про збереження цього ефекту під час використання антикоагулянтних препаратів. Відомо, що гепарин може зв'язуватися з чисельними білками плазми – компонентами системи гемостазу, молекулами адгезії, факторами росту. Так, окрім своєї антикоагулянтної функції, він виступає стимулятором профібринолітичних процесів: гепарин здатен активувати фактори внутрішнього шляху фібринолізу (XII фактор та калікреїн) та індукувати вивільнення t-PA ендотеліоцитами. Крім того, в літературі є повідомлення про те, що олігосахариди гепарину можуть безпосередньо сприяти активації плазміногену його активаторами в розчині та на клітинній поверхні. Проте власне спрямованість та механізм дії сульфатованих глікозаміногліканів на систему активації плазміногену залишається предметом дискусій.

Так кінетичні дослідження [406, 407, 408] свідчать про позитивний ефект високомолекулярних гепаринів на процес активації плазміногену одно- та дволанцюговою формами tPA та uPA. Автори робіт зазначають, що за присутності сульфатованих олігосахаридів  $K_{кат}$  реакції активації зростає у 4 - 25 разів, однак  $K_m$  залишалася незмінною. Дія низькомолекулярних фракцій гепарину була неоднозначною, залежно від молекулярної маси їх олігосахаридних ланцюгів та іонної сили реакційного середовища [409, 410]. Припускають, що посилення процесу активації плазміногену короткими фрагментами гепарину (ди-тетрасахариди) відбувається винятково за рахунок їх зв'язування з tPA, в той час як довші олігосахариди можуть взаємодіяти як з активатором так і власне з плазміногеном [410]. Утворення такого потрібного комплексу призводить до конформаційних змін в молекулі активатора, що сприяє його взаємодії з плазміногеном [411], з одного боку, та конверсії одноланцюгової форми активатора в дволанцюгову, з іншого [409, 412].

Також не існує єдиної думки щодо здатності гепаринів різної молекулярної маси зв'язуватися з нативною та частково деградованою

формою плазміногену. Методом афінної хроматографії (binding competition assay) показано, що як Glu-плазміноген так і Lys-плазміноген [412] можуть зв'язуватися з гепарином, проте така взаємодія плазміногену з гепарином є чутливою до концентрації солі [412] та іонної сили [413]. Разом з тим, Andrade-Gordon та співав. [414] показали, що низькомолекулярні фракції гепарину, отримані шляхом деполімеризації з використанням азотної кислоти або гепаринази, виявляли селективну спорідненість до Lys-плазміногену, не зв'язуючись при цьому з нативною формою проензиму.

З іншого боку, є повідомлення про взаємодію гепарину з адгезивними молекулами – фактором фон Віллебранда [415], тромбоспондином [416] та вітронектином [417]. Так, наприклад, в домені A1 фактору фон Віллебранда локалізовані амінокислотні послідовності, що відповідають за його взаємодію з гепарином [418]. В тому ж домені знаходиться єдиний відомий на сьогодні сайт зв'язування фактору фон Віллебранда з глікопротеїном Ib [419]. Показано, що сульфатовані глікосфінголіпіди здатні інгібувати адгезивні взаємодії тромбоцитів, що опосередковані зв'язуванням фактору фон Віллебранда з глікопротеїном Ib [420]. Це узгоджується з даними Sobel M et al., які повідомляють про значне зниження ристоміцин-індукованої аглютинації тромбоцитів за умов внутрішньовенного введення препаратів гепарину [421].

Автори роботи [367] методом протокової цитометрії показали, що препарати нефракціонованого гепарину у терапевтичній концентрації здатні індукувати експресію адгезивного протеїну Р-селектину (маркерного протеїну секреції  $\alpha$ -гранул) на поверхні тромбоцитів, а також викликають помірну активацію тромбоцитарного інтегрину  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. Не виключено, що виявлений стимуляторний ефект гепарину на тромбоцити обумовлений його взаємодією з  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. В роботах останніх років стверджується, що зв'язування олігосахаридів гепарину з цим інтегрином стабілізує відкриту (активовану) конформацію  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, що сприяє його контакту з адгезивними протеїнами та забезпечує стабільну тромбоцитарну агрегацію [422, 423].

Виходячи з наведених літературних даних та відомостей про використання методу агрегації тромбоцитів в якості тестової системи для лікарських препаратів, ми вирішили дослідити вплив різних препаратів гепарину на ефекти нативної та частково деградованої форм плазміногену щодо агрегації тромбоцитів[424, 425, 426].

Препарати гепарину набули широкого використання в клінічній практиці для попередження та лікування тромботичних ускладнень. Гепарин – це глікозаміноглікан, що складається з сульфатованих залишків D-глюкозаміну та D-глюкуронової кислоти. Антикоагулянтна дія гепарину обумовлена наявністю в його складі пентасахаридних послідовностей – високоафінних сайтів зв'язування антитромбіну – розміщених з певною частотою вздовж молекули [427]. Зв'язуючись з антитромбіном гепарин сприяє інактивації фактору згортання крові Ха та тромбіну (фактору IIa). Інактивуючи тромбін цей глікозаміноглікан обмежує формування фібрину, а також пригнічує тромбін-залежну активацію тромбоцитів та факторів згортання крові V і VIII.

Антикоагулянтна дія гепаринів залежить від довжини їх полісахаридного ланцюга. Розрізняють два класи гепаринів: нефракціоновані гепарини (НГ) із молекулярною масою близько 15 кДа та низькомолекулярні гепарини (НМГ), молекулярна маса яких коливається в межах 2,5 - 6,5 кДа. Вкорочення полісахаридного ланцюга гепарину до 18 - 19 моносахаридних залишків (5 кДа) призводять до зміни специфічності його дії [428]. Так, НМГ меншою мірою (порівняно з НГ) інактивують тромбін, оскільки невеликі фрагменти полісахариду не можуть зв'язувати водночас антитромбін та тромбін (рис. 3.37). Для інактивації ж фактора згортання Ха зв'язування з гепарином не є обов'язковим, тому невеликі фрагменти полісахариду виявляють таку ж анти-Ха-факторну активність, як і великі молекули. Співвідношення активностей анти-Ха/анти-IIa для препаратів НГ складає 1:1, в той час як для комерційних препаратів НМГ цей показник коливається в





Першим етапом роботи стала перевірка препаратів гепарину на агрегацію тромбоцитів. Нами були використані три лікарських форми гепарину – субстанція НГ ( $MW = 15$  кДа, анти-Ха-факторна активність = 166 МО/мг, анти Ха/анти-Па = 1/1,), ін'єкційний препарат НМГ надропарин ( $MW = 4,5$  кДа, анти-Ха-факторна активність = 9500 МО/мл, анти Ха/анти-Па = 4/1) та ін'єкційний препарат фондапаринуксу «Арікстра» ( $MW = 1,7$  кДа,  $C = 5$  мг/мл). Діюча концентрація препаратів НГ, НМГ та фондапаринуксу в нашому дослідженні знаходилась в межах допустимих терапевтичних значень, що виявляються в плазмі крові пацієнтів під час гепаринотерапії [432, 433]. Кінцева концентрація НГ та НМГ в середовищі агрегації становила 1 МО/мл (за анти Ха-факторною активністю), пентасахариду фондапаринуксу – 1 мкг/мл. Препарат фондапаринукс не утворював комплексів з протеїнами плазми крові, що здатні зв'язувати гепарин [434]. За даними літератури, цей пентасахарид у концентраціях  $<2$  мг/л є толерантним щодо агрегаційної здатності тромбоцитів [432].

Методом агрегометрії нами встановлено, що у концентрації, близькій до терапевтичної, досліджувані препарати гепарину – НГ, НМГ та фондапаринукс – не викликають спонтанної агрегації тромбоцитів ЗТП за умов експерименту та не впливають на агрегацію, стимульовану ADP: ступінь та швидкість агрегації достовірно не відрізняються від контрольних показників (рис. 3.38).

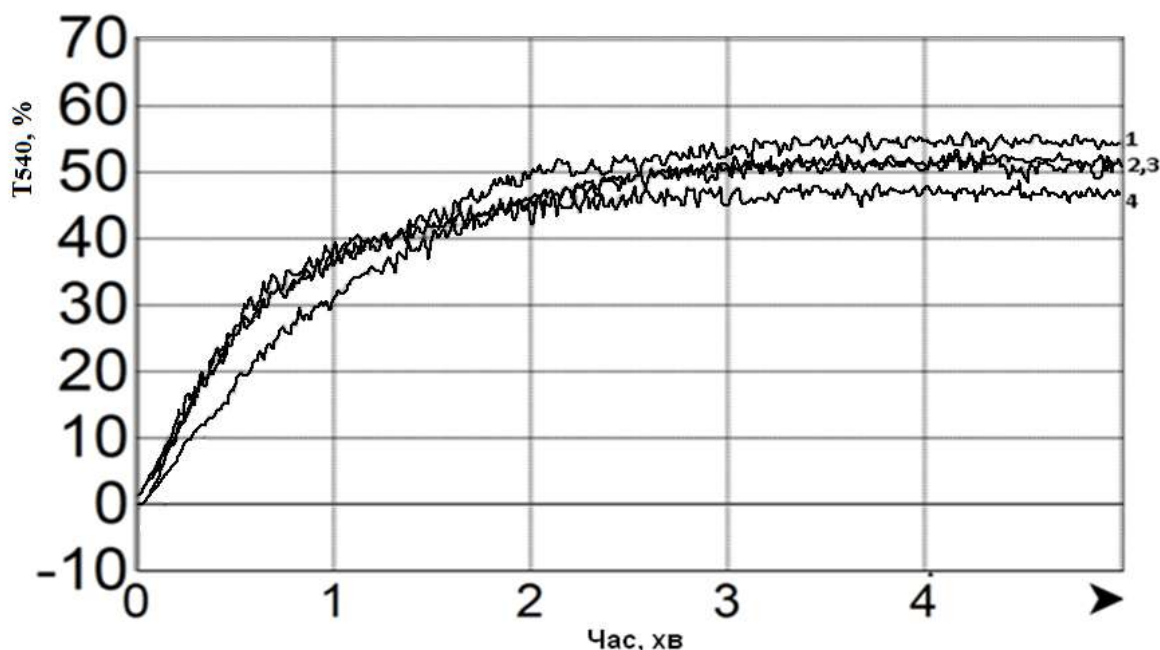


Рис. 3.38. Вплив нефракціонованого гепарину, низькомолекулярного гепарину та пентасакхариду фондапаринуксу на агрегацію тромбоцитів ЗТП крові (індуктор – 5 мкМ ADP): 1 – контрольна агрегація, 2 – 1 МО/мл НГ, 3 – 1 МО/мл НМГ, 4 – 1 мкг/мл фондапаринукс.

Наступним етапом роботи стало дослідження впливу препаратів гепарину (нефракціонованого гепарину, низькомолекулярного гепарину та пентасакхариду фондапаринуксу) на модулюючий ефект плазміногену щодо агрегації тромбоцитів. Як видно з рис. 3.39 в присутності всіх перевіряємих препаратів гепарину зберігався інгібувальний вплив Lys-плазміногену на агрегацію тромбоцитів в препаратах збагаченої тромбоцитами плазми (індуктор - ADP). Слід зауважити, що в присутності низькомолекулярного гепарину ефект Lys-плазміногену навіть посилювався. Препарати гепарину в більшості випадків не створювали модулюючого впливу на дію Glu-плазміногену, хоча в разі перевірки дії препаратів НМГ зареєстровано зниження ADP-індукованої тромбоцитарної агрегації в присутності не тільки Lys-плазміногену, але й Glu-форми зимогену.

Таким чином, можна зробити висновок, що в присутності препаратів гепарину в зразках збагаченої тромбоцитами плазми зберігався модулюючий

вплив Lys-плазміногену на адгезивні контакти між активованими тромбоцитами.

Ми припустили, що відсутність вираженого впливу препаратів гепарину на ефекти Lys-плазміногену може бути обумовлена нездатністю гепарину виступати конкурентом потенційних сайтів зв'язування проензиму на поверхні тромбоцитів (наприклад, інтегрини або молекули адгезії).

Водночас толерантність нативної форми Glu-плазміногену щодо агрегації також не зазнала достовірних змін у присутності всіх форм гепаринів. Можливо, через значну різницю в афінності зв'язування плазміноген не здатен зв'язатися з гепарином в присутності надлишку фібрин(оген)у плазми та/або тромбоцитарної поверхні. Так, наприклад, анонсовані в літературі  $K_d$  для взаємодій плазміноген/гепарин та плазміноген/неактивовані тромбоцити становлять 120 мкМ [407] та 1,9 мкМ [242], відповідно.

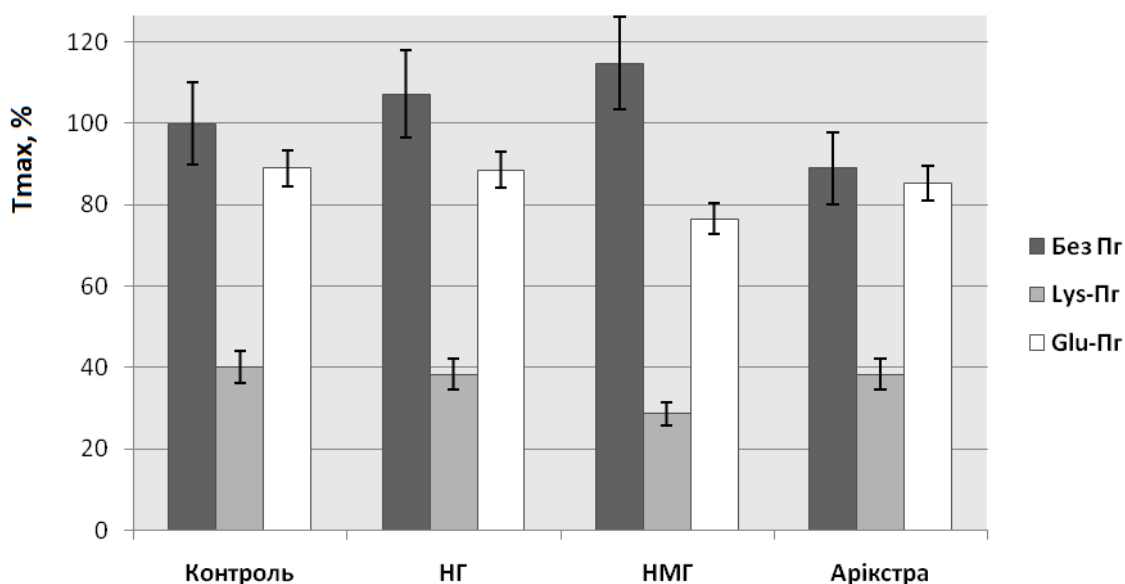


Рис. 3.39 Вплив нефракціонованого гепарину (НГ), низькомолекулярного гепарину (НМГ) та фондапаринуксу «Арікстра» на ефекти плазміногену щодо агрегації збагаченої тромбоцитами плазми, індуктор – 5  $\mu$ M ADP ( $n = 4$ ). Ступінь контрольної агрегації прийнято за 100%. \* –  $P < 0,05$  порівняно з групою «Без Пр».

Нами було також проведено дослідження впливу НГ на секреторну активність тромбоцитів ЗТП, стимульованих ADP (5 мкМ). Як вказувалося раніше, при секреції тромбоцитарних альфа-гранул вивільнюються як адгезивні інтегрини, так і адгезивні молекули, - вітронектин, фібронектин, фібриноген та Р-селектин [435]. Автори роботи [422, 423] показали, що гепарин здатен впливати на ефективність міжтромбоцитарного зв'язку, утвореного за допомогою тромбоцитарних інтегринів.

Для оцінки рівня секреторної активності тромбоцитів визначали активність PAI-1 в плазмі крові до та після стимуляції агрегації. Відомо, що тромбоцити здатні спонтанно вивільняти PAI-1 при механічних впливах. Тому за контроль було взято БТП, отриману після осадження тромбоцитів в ЗТП, яку попередньо інкубували у кюветі агрегометру протягом 8 хв. при перемішуванні (в табл. 3.4 група «Контроль. До агрегації»). Встановлено, що після стимуляції ADP тромбоцити секретують функціонально активну форму інгібітора PAI-1. Так, як видно з таблиці 3.4, рівень цього протеїну в плазмі крові достовірно зростає після агрегації, порівняно з фоновим значенням плазми. Разом з тим показано, що експозиція ЗТП з 1 МО/мл НГ також викликає зростання активності PAI-1 в плазмі крові незалежно від подальшої стимуляції клітин агоністом агрегації. Отже, власне НГ навіть у терапевтичній концентрації може викликати активацію тромбоцитів ЗТП, наслідком чого є вивільнення PAI-1 у складі їх  $\alpha$ -гранул.

Таблиця 3.4.

Вплив нефракціонованого гепарину на ADP-індуковану секрецію тромбоцитами інгібітора активатора плазміногену 1 типу ( $M \pm m$ ;  $n = 3$ )

| Групи | Показники                              |                  |
|-------|----------------------------------------|------------------|
|       | Активність PAI-1 у плазмі крові, МО/мл |                  |
|       | Контроль                               | Нефракціонований |

|                                                     |                    |                    |
|-----------------------------------------------------|--------------------|--------------------|
|                                                     |                    | гепарин (1 МО/мл)  |
| БТП крові                                           | $36,77 \pm 1,82$   | $52,24 \pm 4,32^*$ |
| БТП крові після агрегації<br>(індуктор – 5 мкМ ADP) | $51,56 \pm 2,59^*$ | $56,41 \pm 1,49^*$ |

Примітка. Відмінності у порівнюваних групах є статистично значимими ( $p < 0,05$ ):

\* - порівняно з показниками групи «Контроль. До агрегації».

Отримані результати узгоджуються із даними, що наведені в роботі Xiao et al. [436]. Методом протокової цитометрії автори показали, що НГ у терапевтичній концентрації індукує експресію Р-селектину (маркерного протеїну секреції  $\alpha$ -гранул) на поверхні тромбоцитів, а також викликає помірну активацію тромбоцитарного інтегрину  $\alpha\text{IIb}\beta 3$ . Не виключено, що виявлений стимуляторний ефект гепарину на тромбоцити обумовлений його взаємодією з  $\alpha\text{IIb}\beta 3$ . В роботах останніх років мова йде про те, що зв'язування олігосахаридів гепарину з цим інтегрином стабілізує відкриту (активовану) конформацію  $\alpha\text{IIb}\beta 3$ , що сприяє його контакту з адгезивними протеїнами та забезпечує стабільну тромбоцитарну агрегацію [422, 423].

### Висновки

1. Показано, що інкубація збагаченої тромбоцитами плазми з препаратами гепарину (не фракціонованого гепарину, низькомолекулярного гепарину та фондапаринуксу) не викликає спонтанної агрегації тромбоцитів в плазмі та достовірно не впливає на ADP-індуковану агрегацію тромбоцитів.
2. В наших експериментах не виявлено модулюючої дії препаратів гепарину різної молекулярної маси у терапевтичних концентраціях на ефекти

нативної та частково деградованої форм плазміногену щодо ADP-індукованої агрегації тромбоцитів в зразках збагаченої тромбоцитами плазми.

### **3.9. Вплив плазміногену на перебудову актинового цитоскелету тромбоцитів за їх активації**

Під час активації та секреції тромбоцити зазнають складних морфологічних змін, що здійснюються за рахунок реорганізації їх цитоскелету. Основними компонентами цитоскелету цих клітин є актинові мікрофіламенти. Актин у тромбоцитах представлений у трьох формах: глобул-мономерів актину (G-актин), двониткових спіралеподібних філаментів (F-актин) та у комплексі з актин-асоційованими білками, формуючи так званий мембранний кортекс (MC-актин) – систему мікротрубочок, які розташовані по периметру клітини в примембранному просторі. Активация тромбоцитів індукує АТР-залежний процес полімеризації глобулярного актину та асоціацію актину мембранного кортексу з філаментним апаратом клітини. Як наслідок, в активованих тромбоцитах близько 90% усього актину знаходиться у філаментній формі. Співвідношення різних пулів актину використовується в якості чутливого показнику, який характеризує стан цитоскелету клітини [438].

Цитоскелетні структури виконують не лише опорно-механічну функцію, а й виступають модуляторами багатьох клітинних процесів, забезпечуючи передачу сигналу від рецепторів, розташованих на поверхні плазматичної мембрани, до середини клітини. Зокрема, взаємодія актину мембранного кортексу з інтегриновими рецепторами є необхідною умовою для забезпечення міцної адгезії та агрегації тромбоцитів [437]. Інгібування процесів полімеризації актину та реорганізації актинового цитоскелету порушує адгезивні властивості інтегринів, що призводить до втрати тромбоцитами агрегаційної здатності [438]. Ми припустили, що інгібування Lys-плазміногеном агрегації тромбоцитів може бути наслідком його дії на

ранніх стадіях активації цих клітин. Тому наступним завданням нашої роботи було дослідити вплив різних форм плазміногену на стан актинового цитоскелету тромбоцитів при активації цих клітин різними агоністами.

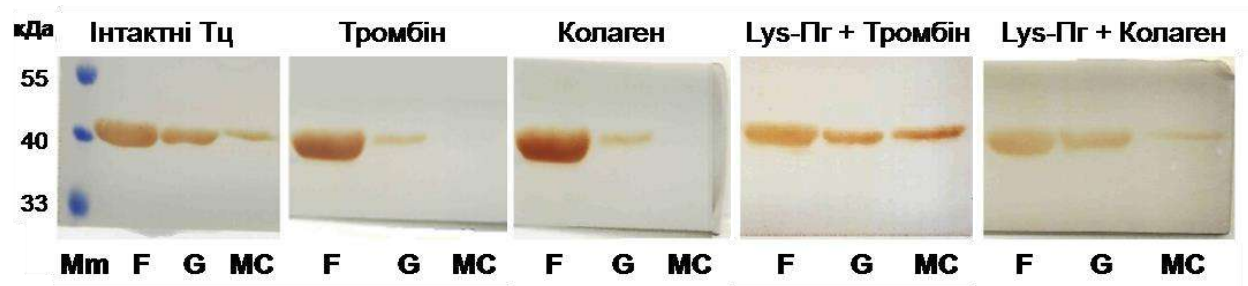
Для цього в експеримент було взято наступні групи клітин: 1) інтактні тромбоцити (контроль); 2) тромбоцити, активовані тромбіном (1 од. НІН/мл); 3) тромбоцити, активовані колагеном (1,25 мг/мл); 4) тромбоцити, інкубовані з Glu- або Lys-плазміногеном (1,2  $\mu$ M); 5) тромбоцити, передінкубовані з Glu- або Lys-плазміногеном та активовані тромбіном; 6) тромбоцити, передінкубовані з Glu- або Lys-плазміногеном та активовані колагеном. Протеїнові фракції тромбоцитів, що містять різні форми актину, отримували після руйнування клітин шляхом їх обробки детергент-вмісним буфером та наступного диференційного центрифугування, як описано в розділі «Матеріали та методи дослідження». Детекцію актину у складі протеїнових фракцій здійснювали методом імуноблотингу. Відносний вміст окремих пулів актину у досліджуваних групах тромбоцитів оцінювали денситометрично і виражали у відсотках від кількості філаментного актину у відповідній групі клітин.

Результати імуноблотингу і дані денситометричного аналізу зображень блотів, вказують на те, що в неактивованих тромбоцитах представлені три форми актину: вміст G-актину й МС-актину складає близько 55 та 40% відносно кількості F-форми, відповідно (рис. 3.40, А та Б, група «Інтактні Тц»). Активація тромбоцитів тромбіном та колагеном призводить до суттєвого зменшення пулів G- та МС-актину. Результати кількісного аналізу показали, що вміст G-актину у активованих тромбоцитах, знижується до 10% відносно кількості F-форми, тоді як пул МС-актину практично не детектується (рис. 3.40, групи «Тромбін» та «Колаген»). Виявлене нами зменшення пулу мономерної форми актину є наслідком інтенсивного фібрилогенезу, що індукується агоністами активації. «Зникнення» пулу МС-актину у протеїнових фракціях активованих тромбоцитів є, вірогідно,



результатом його асоціації (та співосадження під час відокремлення пулів актину) з пулом актинових філаментів цитоплазми.

**А**



**Б**

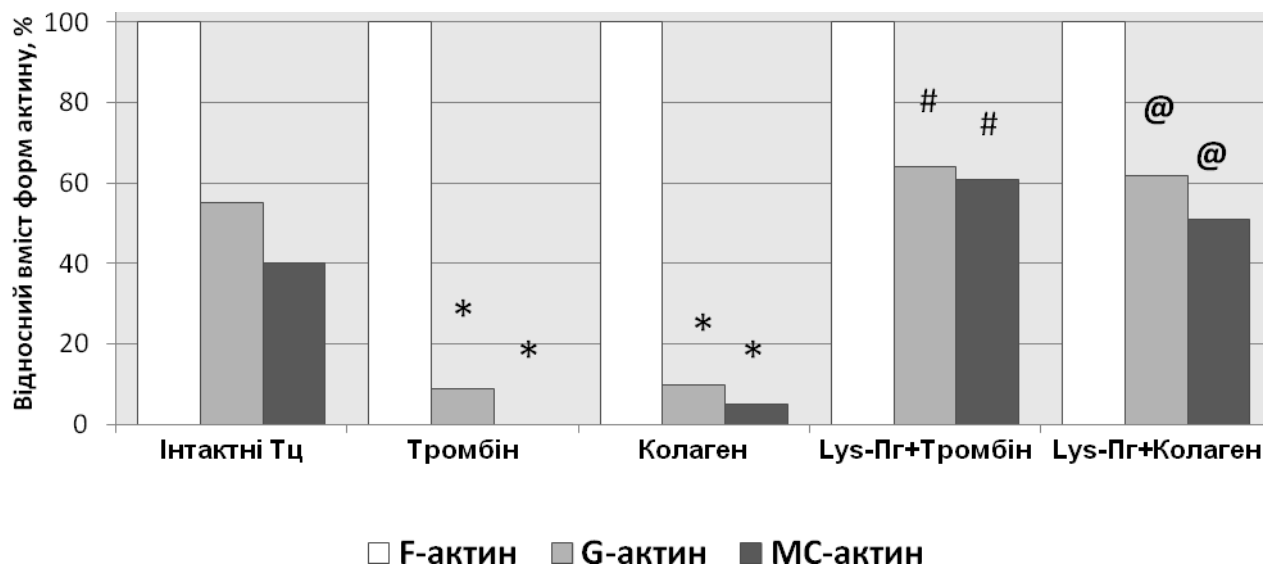


Рис. 3.40 Вплив Lys-плазміногену на перебудову актинового цитоскелету тромбоцитів за їх активації тромбіном і колагеном:

А – імуноблот актинвмісних протеїнових фракцій інтактних та активованих тромбоцитів,

Б – відносний вміст форм актину тромбоцитів (\* –  $P < 0,05$  порівняно з групою «Інтактні тромбоцити»; # –  $P < 0,05$  порівняно з групою «Тромбін»; @ –  $P < 0,05$  порівняно з групою «Колаген»),

Mm – маркери молекулярної маси; F – філаментний актин; G – глобулярний актин; MC – актин мембранного кортексу, Тц – тромбоцити.

Отже, отримані нами дані засвідчують адекватний перебіг процесу реорганізації актинових цитоскелетних структур під час активації тромбоцитів людини тромбіном і колагеном, а також узгоджуються з даними отриманими [439, 440] та результатами морфологічного дослідження реорганізації актинового цитоскелету тромбоцитів, проведеного рядом авторів [441, 442].

Після дії агоністів активації на тромбоцити, що були передінкубовані з Lys-плазміногеном, не відбувається перерозподілу пулів актину, характерного для активованих тромбоцитів (рис. 3.40, А). В досліджуваних групах «Lys-Pg + тромбін» та «Lys-Pg + колаген» спостерігається за високі, як для активованих тромбоцитів, рівні глобулярного актину та актину мембранного кортексу. Денситометричний аналіз зображень імуноблотів (рис. 3.40, Б) дозволив встановити, що у групі тромбоцитів «Lys-Pg + тромбін» G-форма актину складає 65% відносно кількості F-актину, тоді як на актин мембранного кортексу припадає близько 60%. Дані показники для групи клітин «Lys-Pg + колаген» складають 63% та 50%, відповідно. Результати аналізу співвідношення різних форм актину у протеїнових фракціях тромбоцитів, що свідчать про порушення Lys-плазміногеном процесу реорганізації цитоскелету тромбоцитів під час активації, корелюють з попередніми даними агрегометричного аналізу. Нами показано, що за присутності даної форми плазміногену має місце зниження ступеня тромбін- та колаген-індукованої агрегації принаймні вдвічі. Натомість, Glu-плазміноген істотно не впливає на агоніст-індуковану реорганізацію актинового цитоскелету тромбоцитів та їх агрегацію.

Як вже зазначалося в огляді літератури, активація тромбоцитів у відповідь на дію агоністів (тромбін, колаген, ADP) передбачає зміни морфології та фізико-хімічних властивостей цих клітин: утворення псевдоподій; вивільнення секреторних гранул; експонування інтегринів та зростання їх афінності до адгезивних лігандів; перерозподіл фосфоліпідів на поверхні плазматичної мембрани. Реорганізація актинового цитоскелету

забезпечує координований перебіг каскаду реакцій внутрішньоклітинного сигналізу, а також бере участь у реалізації означених процесів клітинної відповіді. Особливу роль у ході активації і агрегації тромбоцитів відіграє мембранний кортекс, що сформований з коротких актинових філаментів у комплексі з актин-асоційованими білками (спектрином, вінкуліном, таліном,  $\alpha$ -актиніном, кіндліном та ін.). При активації сигнальних шляхів тромбоцитів актинові фібрили цитоплазми асоціюють з актином мембранного кортексу з утворенням єдиної філаментної мережі. Мембранний кортекс опосередковує взаємодію рецепторів з цитоскелетом клітини, утворюючи, з одного боку, міцний комплекс з інтегрином  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ , а з іншого – з філаментами цитоплазми. Передача сигналу через цитоскелетні протеїни (талін, кіндлін), що асоційовані з  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ , призводить до активації інтегрину. Останній набуває здатності з більшою афінністю зв'язувати адгезивні ліганди (фібриноген, vWF, фібронектин), що призводить до агрегації тромбоцитів. Крім того, філаментні структури контролюють кластеризацію молекул інтегрину у плазматичній мембрані [443]. Показано, що в результаті обробки тромбоцитів агентами-інгібіторами полімеризації актину (цитохалазин, латрункулін), тромбоцити втрачають здатність розпізнавати адгезивні ліганди та агрегувати навіть за присутності сильних агоністів [Díaz-Ricart, 2002]. Однією з причин низької афінності інтегринів цитохалазин-оброблених тромбоцитів може бути стабілізація актинових структур мембранного кортексу та, як наслідок, «консервування» інтегрину  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  у неактивному стані, закритому для взаємодії з лігандами [444]. Тож не виключено, що інгібування Lys-плазміногеном агоніст-індукованої агрегації тромбоцитів є результатом його впливу на сигнальні шляхи клітини, що регулюють динаміку актинового цитоскелету. Зокрема, індуковані Lys-плазміногеном зміни можуть призводити до аберантної зборки актину MC, запобігаючи інтеграції останнього до єдиної філаментної мережі з цитоплазматичними фібрилами та, відповідно, перешкоджати передачі «активуючого» сигналу на шляху від рецепторів агоністів до інтегринів. Так,

показано, що ангіостатин, який містить у своєму складі K1-3 плазміногену, ефективно пригнічує міграцію моноцитів/макрофагів через дезорганізацію актинового цитоскелету даних клітин [445]. Автори припускають, що K1-3 може індукувати дисоціацію актинових філаментів внаслідок взаємодії на поверхні моноцитів/макрофагів з протеїном ангіомотином, який відповідає за формування актинових фібрил і клітинну рухливість.

Отже, нами встановлено, що Lys-плазміноген перешкоджає перебудові актинового цитоскелету тромбоцитів, стимульованих тромбіном та колагеном, що може бути одним із механізмів антиагрегаційної дії Lys-плазміногену.

### **3.10. Вплив плазміногену на експонування вітронектину на поверхні тромбоцитів за умов їх активації**

Як вказувалося раніше, вітронектин є одним із адгезивних протеїнів, що секретуються під час активації тромбоцитів із альфа-гранул. Вперше його експонування на поверхні активованих тромбоцитів було показано в роботі [446]. Автори роботи показали, що вітронектин зв'язується з поверхнею тромбоцитів завдяки інтегрину  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ , оскільки обробка цих клітин антитілами до цього інтегрину блокувала приєднання вітронектину до мембрани тромбоцитів. Блокуючу дію виявляли також пептиди, які містили RGD послідовність. Подальші дослідження виявили, що експонування вітронектину на поверхні тромбоцитів є необхідною умовою для ефективної агрегації, в присутності антитіл до вітронектину друга хвиля агрегації не реєструвалася як в разі відмитих тромбоцитів, так і в препаратах збагаченої тромбоцитами плазми [447]. Було також знайдено, що залежно від агоніста активації, на поверхні активованого тромбоцита може існувати від 8000 до 23000 сайтів для зв'язування цього адгезивного протеїну. Автори роботи зробили висновок, що вітронектин входить до складу макромолекулярного комплексу, який забезпечує адгезивний контакт між активованими

тромбоцитами. Новий погляд на роль вітронектина з'явився після досліджень, проведених Preissner K et al., які довели, що імобілізований вітронектин здатен зв'язувати плазміноген ( $K_d = 0,4 \text{ мкМ}$ ) [448]. Було показано, що гепарин частково перешкоджав зв'язку вітронектина з плазміногеном, на цьому було зроблено припущення про участь гепарин-зв'язуючого домену з боку вітронектина, а оскільки 6-аміногексанова кислота повністю блокувала зв'язок, то це свідчило про те, що з боку плазміногену зв'язок забезпечували кринглові домени. Подалі було показано, що плазмін та Lys-плазміноген мають якнайменш в 10 разів кращий афінітет до вітронектину порівняно з нативною формою проензиму, значення  $K_d$  становили 85нМ та 1мкМ відповідно [449]. До того ж автори роботи показали, що якщо вітронектин був частково деградований під дією плазміну, то це призводило до кращого зв'язування плазміногену. Було зроблено висновок, що плазмін здатен переключати дію вітронектину з прокоагулянтної на профібринолітичну. Подальші дослідження, які були проведені на тромбоцитах, дозволили зробити припущення щодо ролі вітронектину в системі фібринолізу [450]. Автори роботи показали, що під час активації тромбоцитів відбувається вивільнення протеїнкінази А, яка фосфорилує вітронектин, що залишається зв'язаний з поверхнею тромбоцита. Фосфорильований вітронектин послаблює зв'язок з інгібітором активатора плазміногену ПАІ-1, який набуває здатності вивільнюватися з комплексу з вітронектином і переходить в латентну неактивну форму. Таким чином усуваються перешкоди для дії активаторів плазміногену і поверхня тромбоциту може стати місцем для збірки фібринолітичного комплексу.

Наведені дані свідчать про неоднозначну роль вітронектину в утворенні міжтромбоцитарних адгезивних зв'язків. Тому нами була зроблена спроба виявити вплив різних форм плазміногену, які, як вказувалося раніше, значно відрізняються спорідненістю до цього адгезивного протеїну, на експонування вітронектину на поверхні тромбін-стимульованих тромбоцитів.

Нами було використано метод протокової цитофлуориметрії з використанням антитіл до вітронектину. Для проведення дослідження було використано наступні групи клітин: інтактні тромбоцити (контроль); тромбоцити, інкубовані із Glu- чи Lys-плазміногеном; тромбоцити, оброблені тромбіном, і тромбоцити, оброблені тромбіном після їх попередньої інкубації з Lys-плазміногеном. Оцінку експозиції вітронектину на поверхні тромбоцитів проводили за двома параметрами:

1) відсоток вітронектин-позитивних тромбоцитів від всієї кількості досліджуваних клітин у зразку; 2) інтенсивність флуоресценції, детекція була проведена за каналом FL1 (515-535 nm). Для сортування тромбоцитів були встановлені відповідні ворота. Зміни у сигналі флуоресценції, які спостерігалися у випадку впливу досліджуваних молекул, були визначені відповідно до зміщення кривих флуоресценції порівняно з маркером (M), який лімітує криву флуоресценції інтактних тромбоцитів. Для отримання статистично вірогідних результатів було проаналізовано не менше 10 тисяч подій у кожному зразку.

Представлені дані характеризують експонування вітронектину на поверхні інтактних і тромбін-стимульованих відмитих тромбоцитів (Рис. 3.41). Поява вітронектин-позитивних клітин у популяції інтактних тромбоцитів може відбуватися через спонтанну активацію частини клітин, взятих у експерименті. В попередніх роботах рекомендовано використовувати популяцію тромбоцитів, у яких рівень спонтанної активації не перевищував 50-55% [451]. В нашій роботі ми дотримувались цих вимог.

Коли Lys-плазміноген знаходився в інкубаційному середовищі з інтактними тромбоцитами, було відмічено зростання вітронектин-позитивних клітин. Введення Glu-плазміногену не мало ефекту (Рис. 3.41). Можна припустити, що зв'язування Lys-плазміногену з поверхнею тромбоцитарної мембрани призводить до активації клітин, і як наслідок, часткового вивільнення альфа-гранул, та асоціації вивільненого вітронектину з мембраною.

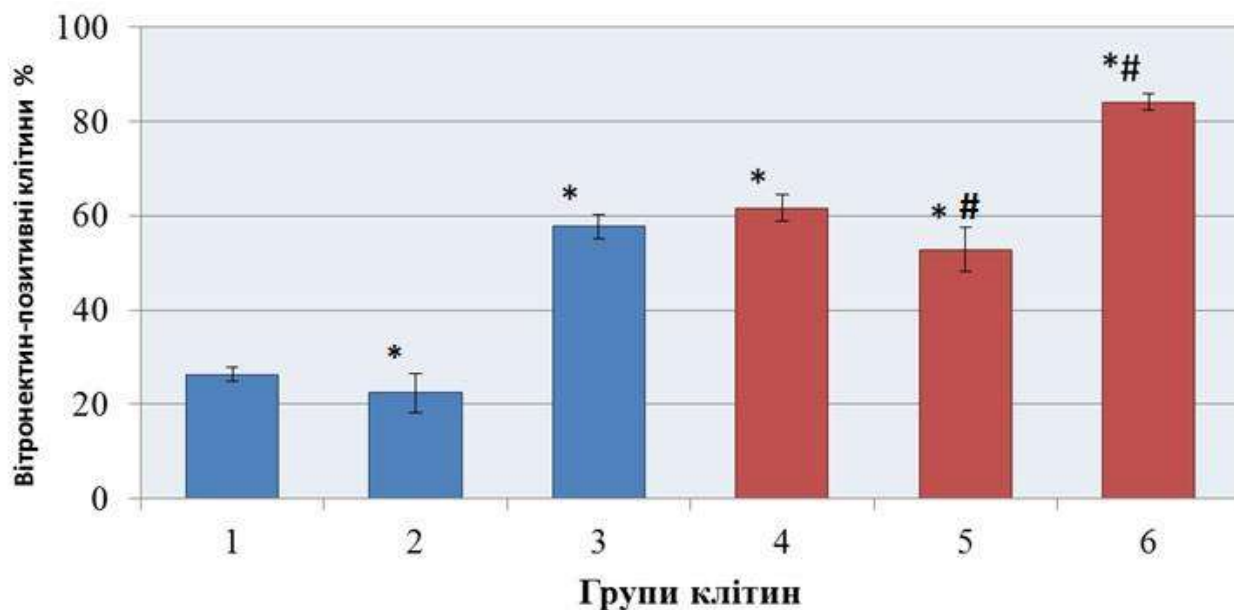


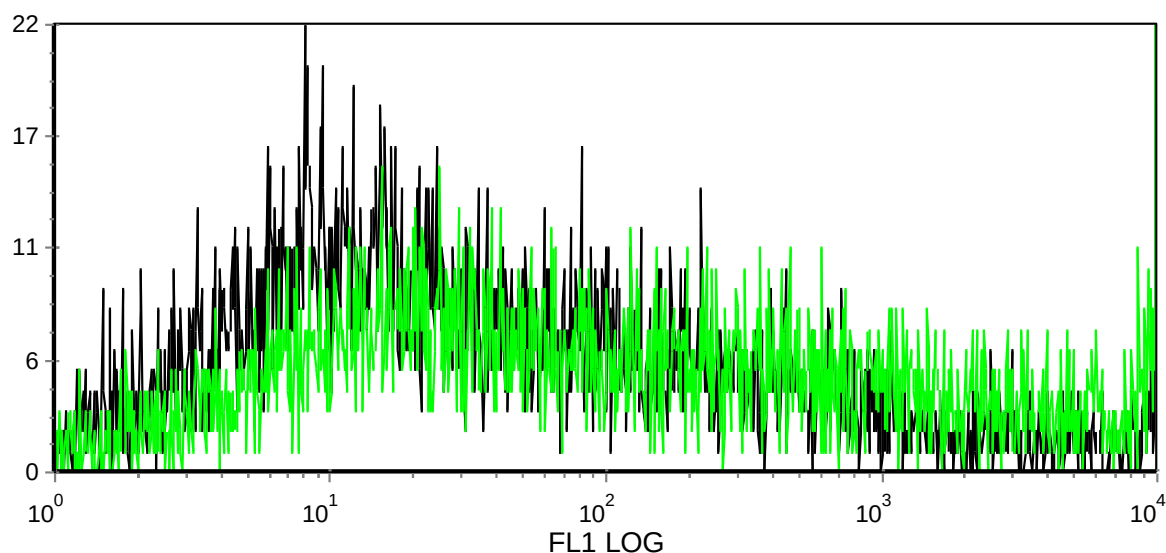
Рис. 3.41 Ефекти Glu- та Lys-форм плазміногену на експонування вітронектину неактивованими та активованими тромбоцитами:

- 1 – неактивовані тромбоцити,
  - 2 – неактивовані тромбоцити, оброблені Glu-плазміногеном (1,2 мкМ),
  - 3 – неактивовані тромбоцити, оброблені Lys-плазміногеном (1,2 мкМ);
  - 4 – тромбоцити, активовані тромбіном (1 од. NIH/мл),
  - 5 – тромбоцити, оброблені Glu-плазміногеном та активовані тромбіном;
  - 6 – тромбоцити, оброблені Lys-плазміногеном та активовані тромбіном.
- Відмінності у порівнюваних групах є статистично вірогідними ( $p < 0,05$ ):\* - порівняно з групою «Неактивовані тромбоцити», # - порівняно з групою «Тромбоцити, активовані тромбіном».

Зміни у інтенсивності сигналу флуоресценції інтактних і тромбін-активованих тромбоцитів мали подібні тенденції, як це було продемонстровано із кількісними перегрупуваннями клітин. Інтактні тромбоцити, інкубовані з Glu- чи Lys-плазміногеном не виявляли ніяких достовірних змін сигналу флуоресценції у порівнянні із контрольною кривою (Рис. 3.42). У випадку тромбін-активованих тромбоцитів спостерігався істотний зсув піку кривої флуоресценції порівняно з контрольною кривою (Рис. 3.43). Попередня інкубація стимульованих тромбоцитів з Lys-

плазміногеном призводить до зсуву піку флуоресценції вправо порівняно з кривою, отриманою для тромбін-стимульованих тромбоцитів (Рис. 3.43), в той час як інкубація із Glu-плазміногеном не викликає ніяких змін (Рис. 3.43).

**А**



**Б**

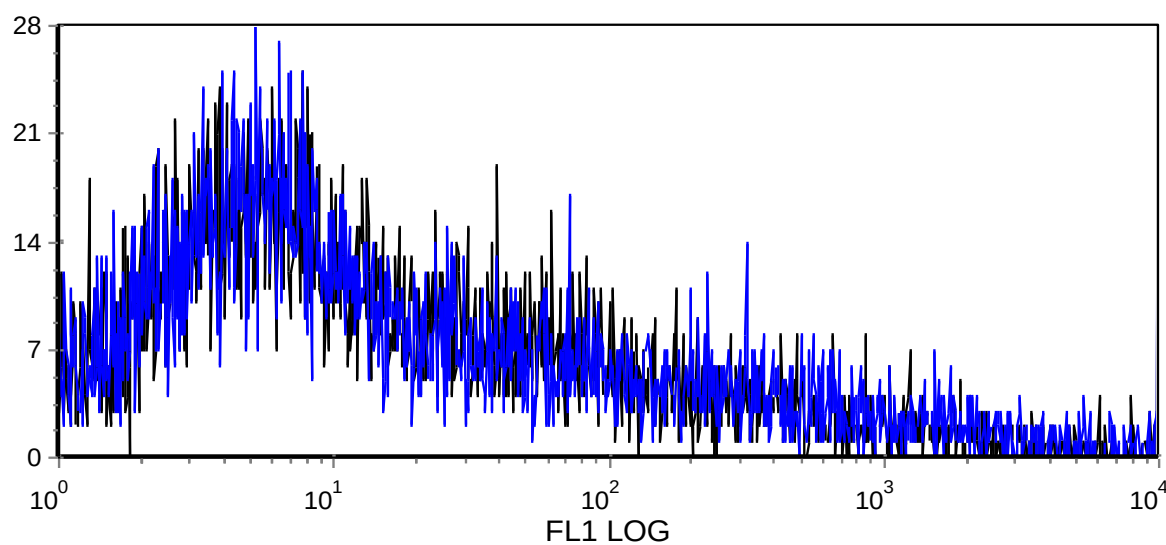
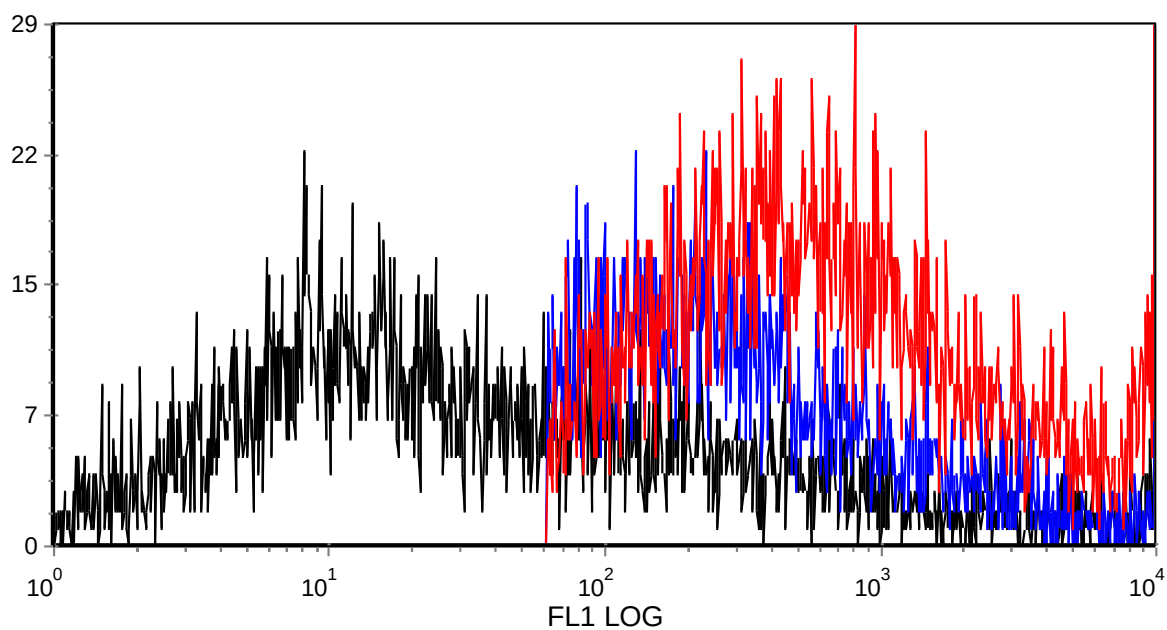


Рис. 3.42 Вплив Lys-плазміногену(А) та Glu-плазміногену(Б) на експонування вітронектину неактивованими тромбоцитами, де Count – кількість подій, FL1 LOG – логарифм інтенсивності флуоресценції FITC. Чорним кольором позначено інтактні тромбоцити, зеленим кольором –



тромбоцити, інкубовані з Lys-плазміногеном, синім кольором - тромбоцити, інкубовані з Glu-плазміногеном.

**А**



**Б**

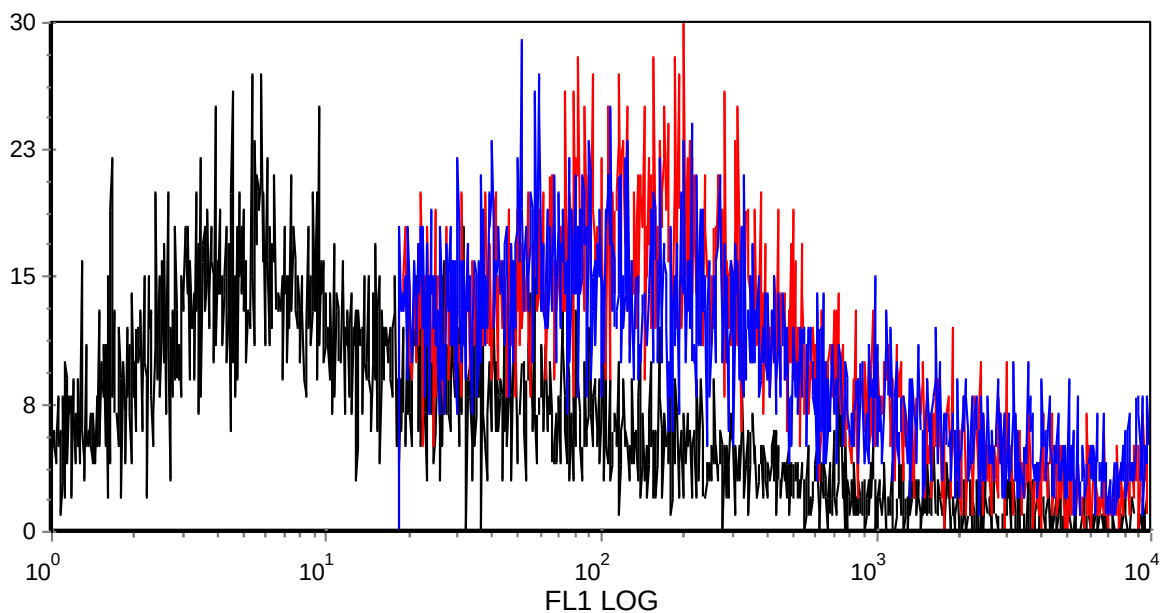


Рис. 3.43 Вплив Lys-плазміногену (А) та Glu-плазміногену (Б) на експонування вітронектину тромбін-активованими тромбоцитами, де Count – кількість подій, FL1 LOG – логарифм інтенсивності флуоресценції FITC. Чорним кольором позначено інтактні тромбоцити, синім кольором – тромбін-

активовані тромбоцити, червоним кольором - тромбін-активовані тромбоцити, що були оброблені Lys-(A) або Glu-плазміногеном(Б).

Узагальнюючи отримані нами результати та дані літератури, ми припустили що на поверхні активованого тромбоциту за участі Lys-плазміногену можуть відбуватися наступні події, які зображені на рис. 3.44.

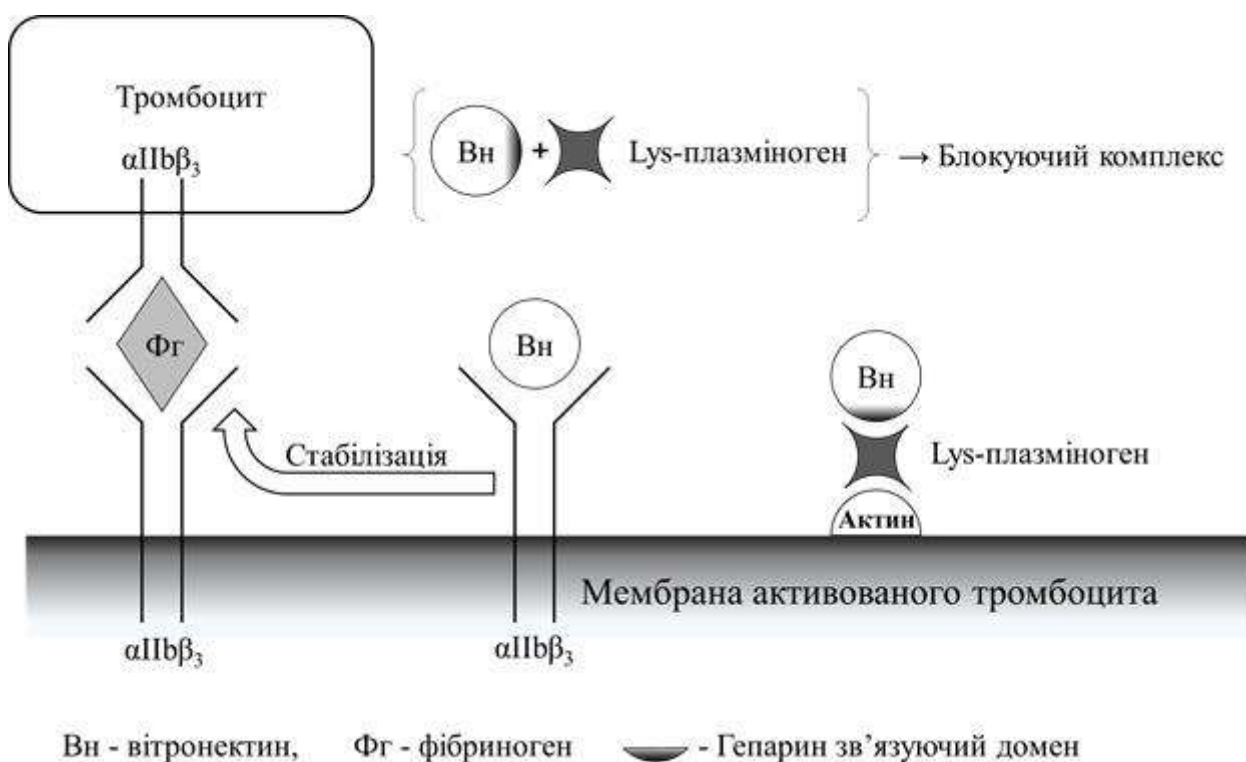


Рис. 3.44 Схема експонування вітронектину на поверхні активованого тромбоциту.

Під час вивільнення альфа-гранул з тромбоцитів секретується олігомерна форма вітронектину, половина якого залишається зв'язаною із клітинною поверхнею [452]. Зв'язування олігомерної форми вітронектину з Lys-плазміногеном може спричиняти зміни в гепарин-зв'язуючому сайті адгезивного протеїну, а такі зміни, як було показано раніше, безпосередньо впливають на адгезивні властивості вітронектину. Цілком імовірно, що утворений комплекс вітронектин- Lys-плазміноген, не буде зв'язуватись з

інтегрином  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  через стеричні перешкоди, або його спорідненість до цього інтегринового рецептора буде послаблена. Відповідно, це буде впливати на ефективність агрегації та утворення міжклітинних контактів, оскільки зв'язок вітронектину з інтегрином  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  є умовою для формування стабільного міжтромбоцитарного контакту за участю фібриногену. Звичайно, для перевірки такого припущення необхідно провести низку подальших експериментів.

З іншого боку, ми спостерігали значне зростання кількості вітронектин-позитивних клітин в разі попередньої інкубації суспензії тромбоцитів з Lys-плазміногеном і подальшої активації тромбіном. У випадку Glu-плазміногену не було істотних змін у кількості вітронектин-позитивних клітин порівняно із випадком стимулювання тромбіном без попередньої інкубації із плазміногеном. Відомо, що при активації тромбоцитів збільшується кількість сайтів для зв'язування плазміногену, а одним із рецепторів плазміногену може бути поверхневий актин, який з'являється на мембрані тромбоцита внаслідок його активації [244]. В свою чергу, актин виявляє різну спорідненість до форм плазміногену. Так, в роботі Roka-Moya Y.M. et al. було показано, що Lys-плазміноген мав набагато кращу спорідненість до актину порівняно з Glu-плазміногеном [453]. Можна припустити, що Lys-плазміноген, зв'язується з поверхневим актином і водночас утворює зв'язок з вітронектином, який вивільнився з альфа-гранул внаслідок активації (рис 3.44) [454, 455]. Оскільки, як вказувалося раніше, спорідненість вітронектину до Lys-плазміногену набагато вища, порівняно з нативною формою проензиму, то ефект збільшення вітронектин-позитивних клітин спостерігається тільки в разі попередньої інкубації тромбоцитів з Lys-плазміногеном. Це припущення можливо за умови, якщо у формуванні зв'язку з вітронектином та актином задіяні різні кринглові структури молекули Lys-плазміногену.

Отримані результати показали, що різні форми плазміногену здатні створювати специфічний вплив на дію адгезивних протеїнів. Роль

вітронектина в формуванні контакту між тромбоцитами є неоднозначною. Мономерна форма вітронектину, яка знаходиться в плазмі перешкоджає ефективній агрегації тромбоцитів. З іншого боку, олігомерна форма цього адгезивного протеїну, що вивільняється з альфа-гранул тромбоцитів під час активації, утворює зв'язок з інтегрином  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  і забезпечує стабілізацію міжтромбоцитарних зв'язків, що утворилися внаслідок фібриногену.

Не можна виключати також можливості, що внаслідок активації тромбоцитів в присутності Lys-плазміногену (ця форма плазміногену має відкриту конформацію і, таким чином, буде швидше перетворюватися на плазмін) має місце утворення плазміну. В такому разі, як вважають автори роботи [450], під дією цієї протеїнази відбувається переключення дії олігомерної форми вітронектину з прокоагулянтної на профібринолітичну (послаблення зв'язку між ПАІ-1 та вітронектином та утворення додаткових сайтів для ефективного зв'язку плазміногена).

#### Висновки.

1. Інкубація інтактних тромбоцитів з Lys-плазміногеном призводила до зростання кількості вітронектин-позитивних клітин, але суттєво не впливала на їх інтенсивність флуоресценції.
2. Стимуляція тромбіном супроводжувалася принаймні двократним зростанням як кількості вітронектин-позитивних тромбоцитів, так і інтенсивності сигналу флуоресценції.
3. Додавання Lys-плазміногену до суспензії відмитих тромбоцитів з наступною активацією тромбіном збільшувало кількість вітронектин-позитивних клітин порівняно з ізольованою стимуляцією агоністом.
4. Glu-плазміноген не спричиняв впливу на експонування вітронектину в разі інтактних та активованих тромбоцитів

#### **3.11. Вплив плазміногену на експонування Р-селектину на поверхні тромбоцитів**

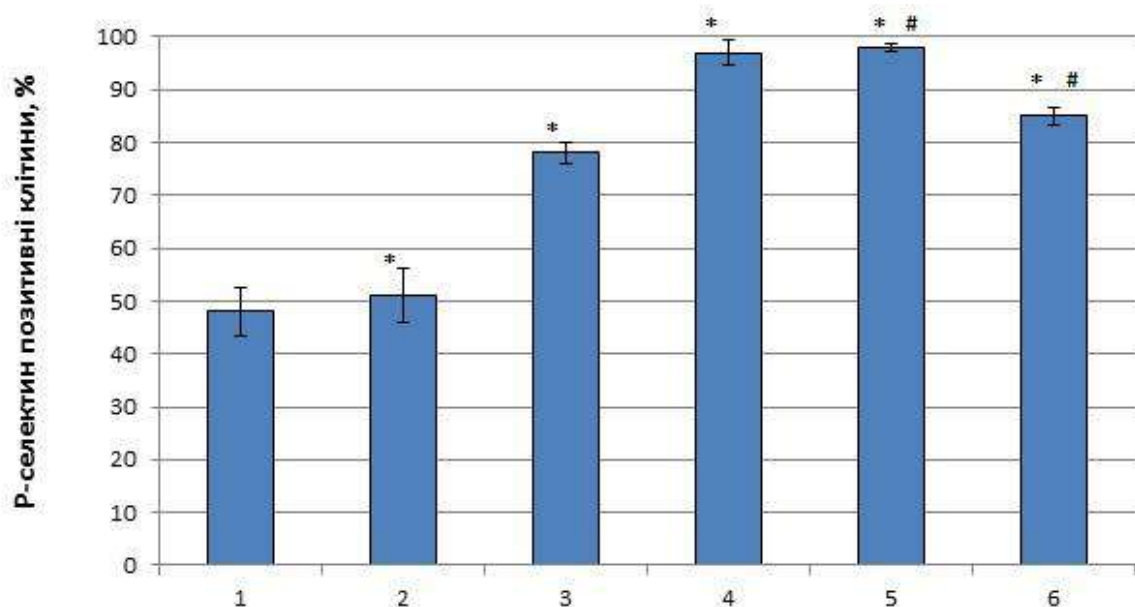
Отже, внаслідок розгорнутої конформації, Lys-форма плазміногену здатна ефективно пригнічувати агрегацію тромбоцитів, активованих ADP, тромбіном та колагеном, тоді як нативна форма зимогену (Glu-плазміноген) не виявляє антиагрегаційної дії за умов експерименту. Інгібувальний ефект Lys-плазміногену має місце переважно на другій необоротній стадії агрегації, яка обумовлена секрецією адгезивних протеїнів з  $\alpha$ -гранул тромбоцитів (фібриногену, вітронектину, тромбоспондину) та формуванням адгезивних контактів за участі інтегрину  $\text{IIbIIIa}$ . Наступним етапом було дослідження ефектів плазміногену на експонування Р-селектину на поверхні тромбоцитів. При утворенні міжтромбоцитарних адгезивних контактів Р-селектин відіграє важливу роль. За даними літератури Р-селектин створює стабілізуючий ефект на утворення тромбоцитарних агрегатів [116]. Слід зауважити, що Р-селектин експонується поступово в період до 10 хвилин, в той час, як максимальна активація  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  відбувається в період перших десяти секунд. Тому вважають, що стабілізуючий ефект Р-селектину реалізується після утворення зв'язку інтегрину  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  з фібриногеном. Для Р-селектину знайдено декілька рецепторних молекул на поверхні тромбоцитів. PSGL-1 є відомим рецептором цього адгезивного протеїну на нейтрофілах та моноцитах, пізніше цей рецептор також було знайдено на поверхні тромбоцитів. Проте його експресія на поверхні цих клітин є значно меншою ніж на лейкоцитах [456]. Інший рецептор для Р-селектину на тромбоцитах – це протеїн GP Ib. Однак, було показано, що антитіла до PSGL-1 або до протеїну GP Ib не мали значного впливу на ADP- або тромбін-індуковану агрегацію тромбоцитів [457, 458]. Було зроблено висновок, що найбільш вірогідними рецепторними молекулами Р-селектину, які беруть участь в утворенні міжтромбоцитарних зв'язків є гангліозиди, що містять залишок тетрасахаридів сіаліл Льюїс х [459]. Показано, що після активації тромбоцитів ADP або тромбіном відбувається перерозподіл цих гангліозидів на тромбоцитарній поверхні [460, 461]. Оскільки Р-селектин-вуглеводний зв'язок є досить міцним і здатен

витримувати значне навантаження, вважають, що саме завдяки йому належить головна роль в стабілізації тромбоцитарних агрегатів [462].

Проведені нами дослідження щодо експресії Р-селектину на поверхні тромбоцитів з використанням цитометричного аналізу дозволили виявити наступне. Як видно з рис. 3.45, частка Р-селектин-позитивних клітин у препаратах інтактних тромбоцитів становила  $48 \pm 4,6$  % від їх загальної кількості (10 000 клітин, які відбиралися для аналізу). Кількість спонтанно активованих тромбоцитів залежить від способу їх отримання та варіює від 50 до 92% [451]. Таким чином, отримані за нашою методикою тромбоцити були придатні для подальшої роботи з ними. Слід зауважити, що кількість Р-селектин позитивних тромбоцитів залежить від багатьох факторів. Автори роботи [463] вказують, що ця кількість підвищується при старінні, підвищеному рівні систолічного та діастолічного артеріального тиску крові, при підвищеному рівні глікозильованого гемоглобіну та має зворотню кореляцію з вмістом холестерину та ліпопротеїдів високої щільності. Активація тромбоцитів тромбіном в наших експериментах супроводжувалася зростанням кількості Р-селектин-позитивних клітин в 2 рази, інтенсивність їх флуоресценції також достовірно підвищувалася (рис. 3.45)[464]. Вплив Lys-плазміногену призводить до статистично вірогідного зростання пулу тромбоцитів, що презентують Р-селектин. Можна зробити припущення, що під відбувається часткове вивільнення тромбоцитарних альфа гранул впливом Lys-плазміногену. Якщо інтактні тромбоцити інкубували з Lys-плазміногеном з наступною активацією тромбіном, то це призводило до зниження кількості Р-селектин-презентуючих тромбоцитів порівняно з групою агоніст-активованих клітин, та значного зниження інтенсивності флуоресценції (Рис.3.45 та 3.46). Разом з тим, предінкубація інтактних тромбоцитів з Glu-плазміногеном та наступною активацією тромбіном, не мала суттєвого впливу на кількість Р-селектин позитивних клітин або на інтенсивність флуоресценції. Отримані результати збігаються з даними, представленими в розділі 3.8. , які свідчать, що нативна форма плазміногену

не впливає на стан актинового цитоскелета тромбоцитів і не змінює їх агрегативну активність.

**А**



**Б**

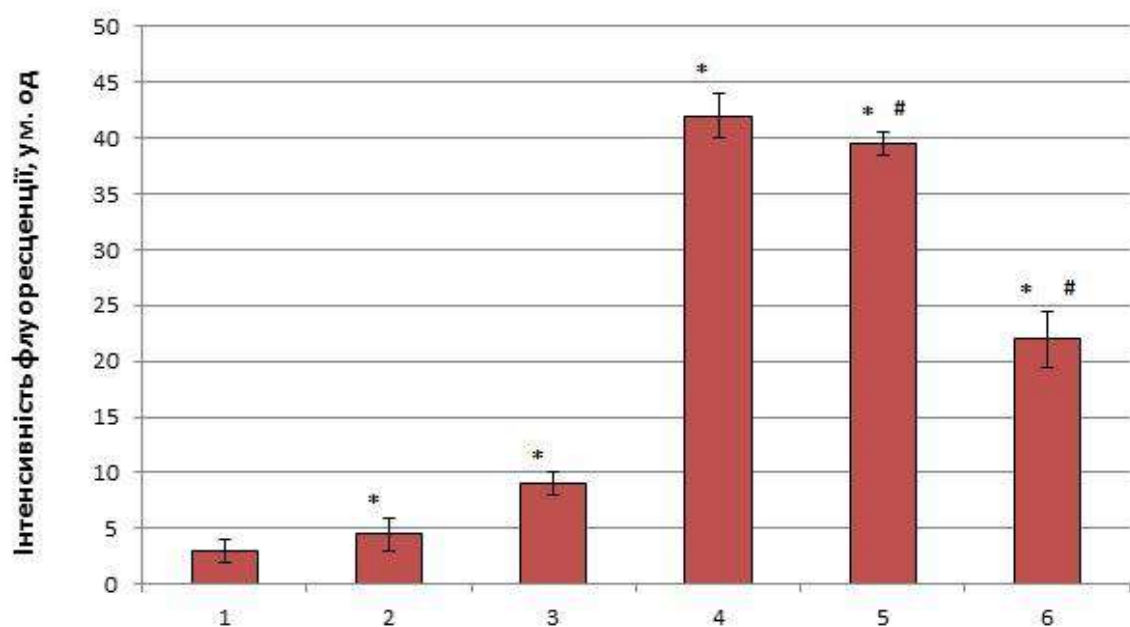


Рис. 3.45 Ефект Glu- та Lys-плазміногену на експонування Р-селектину інтактними та активованими тромбоцитами:

А – відсоток Р-селектин-позитивних клітин,

Б – інтенсивність їх флуоресценції.

- 1 – неактивовані тромбоцити,
  - 2 – неактивовані тромбоцити, оброблені Glu-плазміногеном (1,2 мкМ),
  - 3 – неактивовані тромбоцити, оброблені Lys-плазміногеном (1,2 мкМ);
  - 4 – тромбоцити, активовані тромбіном (1 од. NIH/мл),
  - 5 – тромбоцити, оброблені Glu-плазміногеном та активовані тромбіном;
  - 6 – тромбоцити, оброблені Lys-плазміногеном та активовані тромбіном.
- Відмінності у порівнюваних групах є статистично вірогідними ( $p < 0,05$ ):

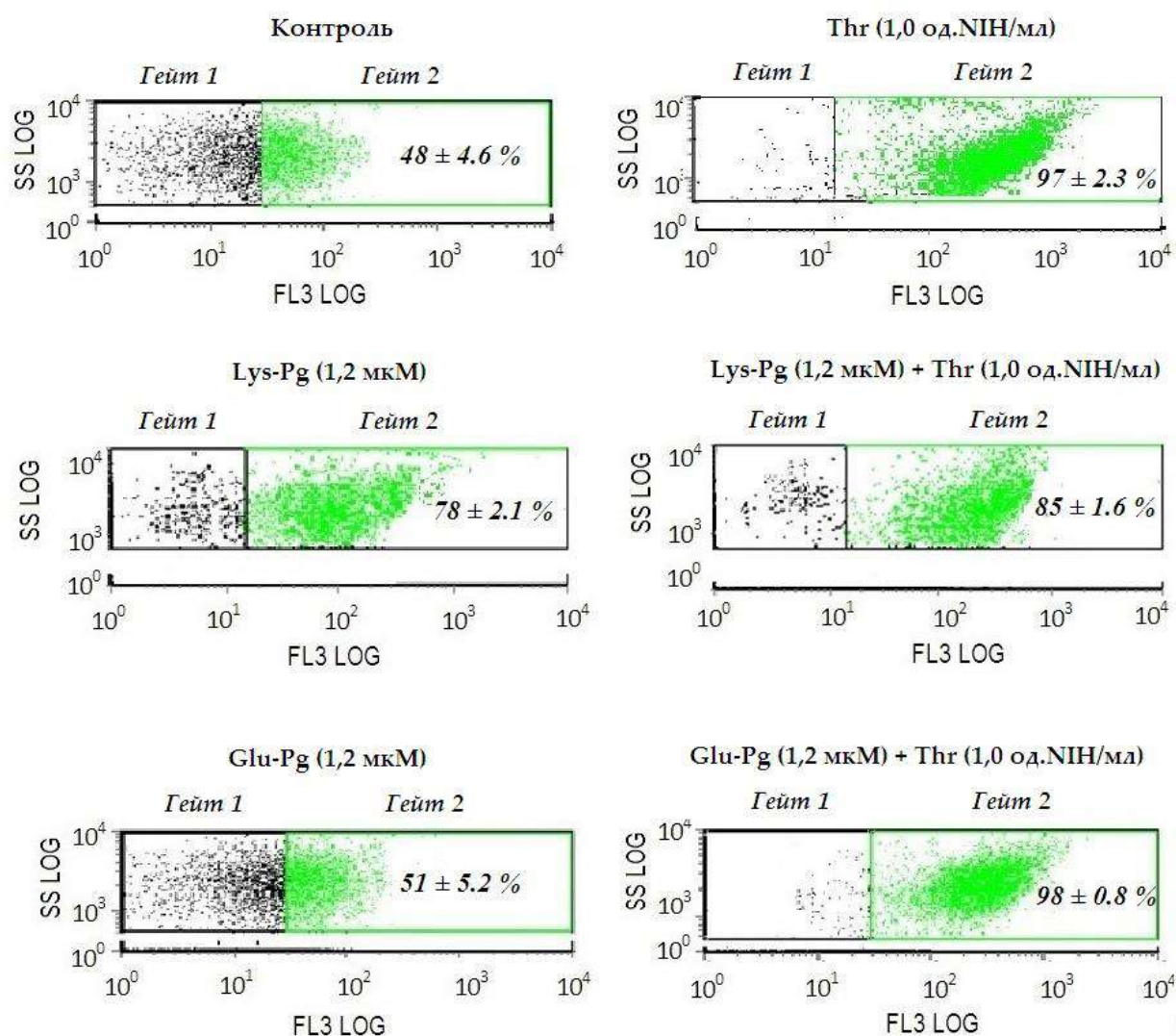
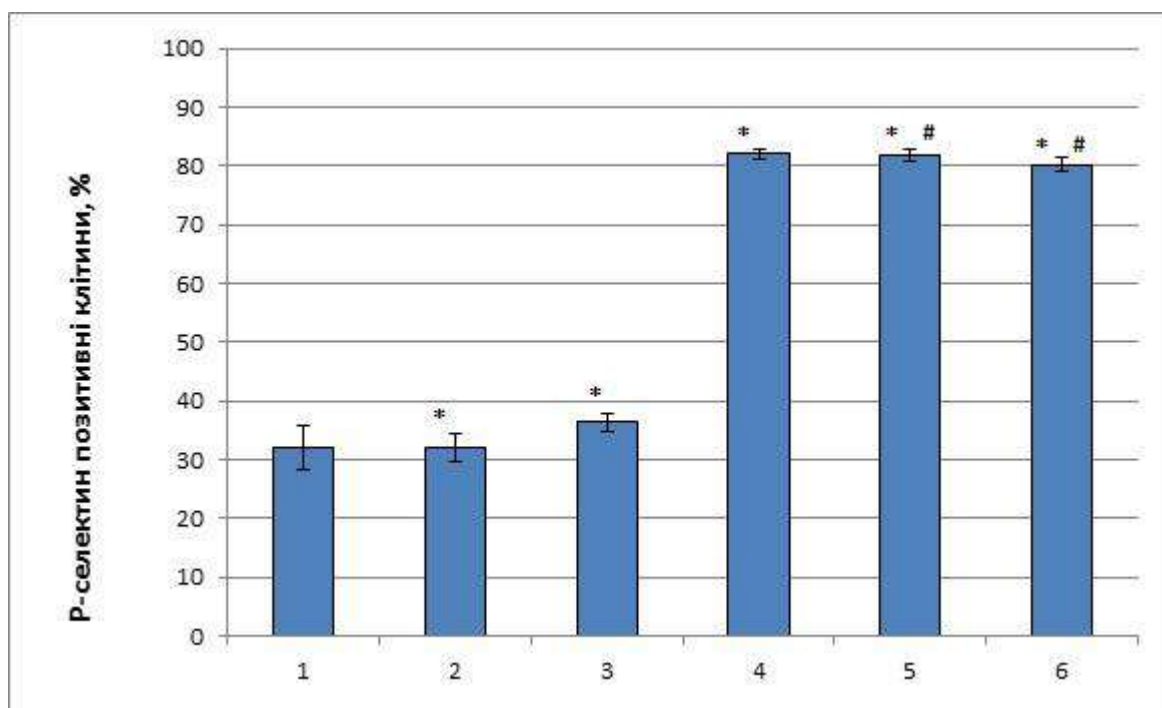


Рис. 3.46. Вплив Lys- та Glu-форм плазміногену на експонування Р-селектину відмитими тромбоцитами людини за їх активації тромбіном (популяції Р-селектинпозитивних тромбоцитів на гістограмах обмежені гейтом 2)



При активації тромбоцитів колагеном ефекти різних форм плазміногену на експонування Р-селектину мали свої особливості. Аналізуючи секрецію  $\alpha$ -гранул, ми встановили, що колаген індукує зростання кількості Р-селектин-позитивних клітин принаймні втричі, інтенсивність флуоресценції при цьому також помітно зростала (Рис. 3.47 та 3.48). Glu- та Lys-плазміноген не виявляють достовірного впливу на експонування Р-селектину, що індукується колагеном. Отримані дані свідчать що ефект двох форм плазміногену на експонування Р-селектину може бути різним залежно від стимулятора. Це можна пояснити тим, що при дії тромбіну та колагену реалізуються різні шляхи сигналіngu [129]. Як видно з рис.3.49, в разі тромбінової стимуляції передача сигналу відбивається завдяки PAR-рецепторам з подальшою активацією фосфоліпази  $C\beta$ . Колагенова стимуляція не пов'язана із залученням G-протеїнів і передає сигнал на фосфоліпазу  $C\gamma$ . Дві форми фосфоліпази різняться між собою за будовою і взаємодією з кальцієм [465]. Фосфоліпаза  $C\gamma$  має додаткові плекстрин-гомологічні домени (РН-домени), які важливі для зв'язку з кальцієм.

**A**



Б

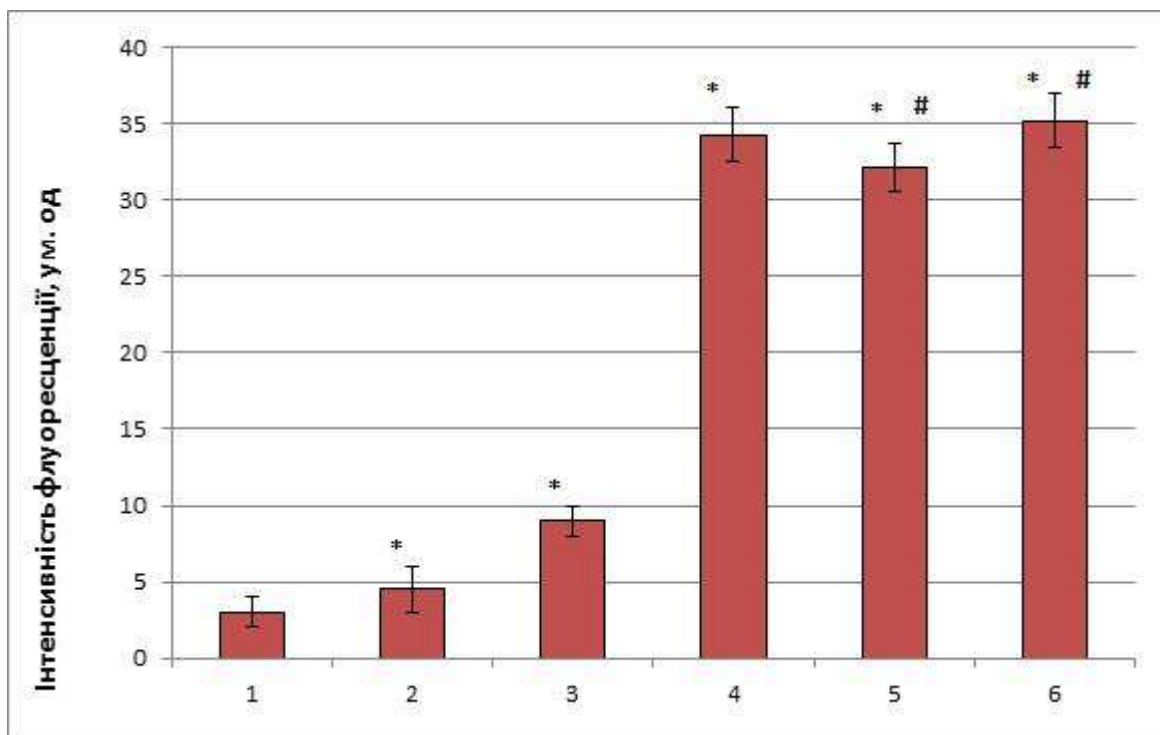


Рис. 3.47. Ефект Glu- та Lys-плазміногену на експонування Р-селектину інтактними та колаген-активованими тромбоцитами:

А – відсоток Р-селектин-позитивних клітин,

Б – інтенсивність їх флуоресценції.

1 – неактивовані тромбоцити,

2 – неактивовані тромбоцити, оброблені Glu-плазміногеном (1,2 мкМ),

3 – неактивовані тромбоцити, оброблені Lys-плазміногеном (1,2 мкМ);

4 – тромбоцити, активовані колагеном (1,25 мг/мл),

5 – тромбоцити, оброблені Glu-плазміногеном та активовані колагеном;

6 – тромбоцити, оброблені Lys-плазміногеном та активовані колагеном.

Відмінності у порівнюваних групах є статистично вірогідними ( $p < 0,05$ ):

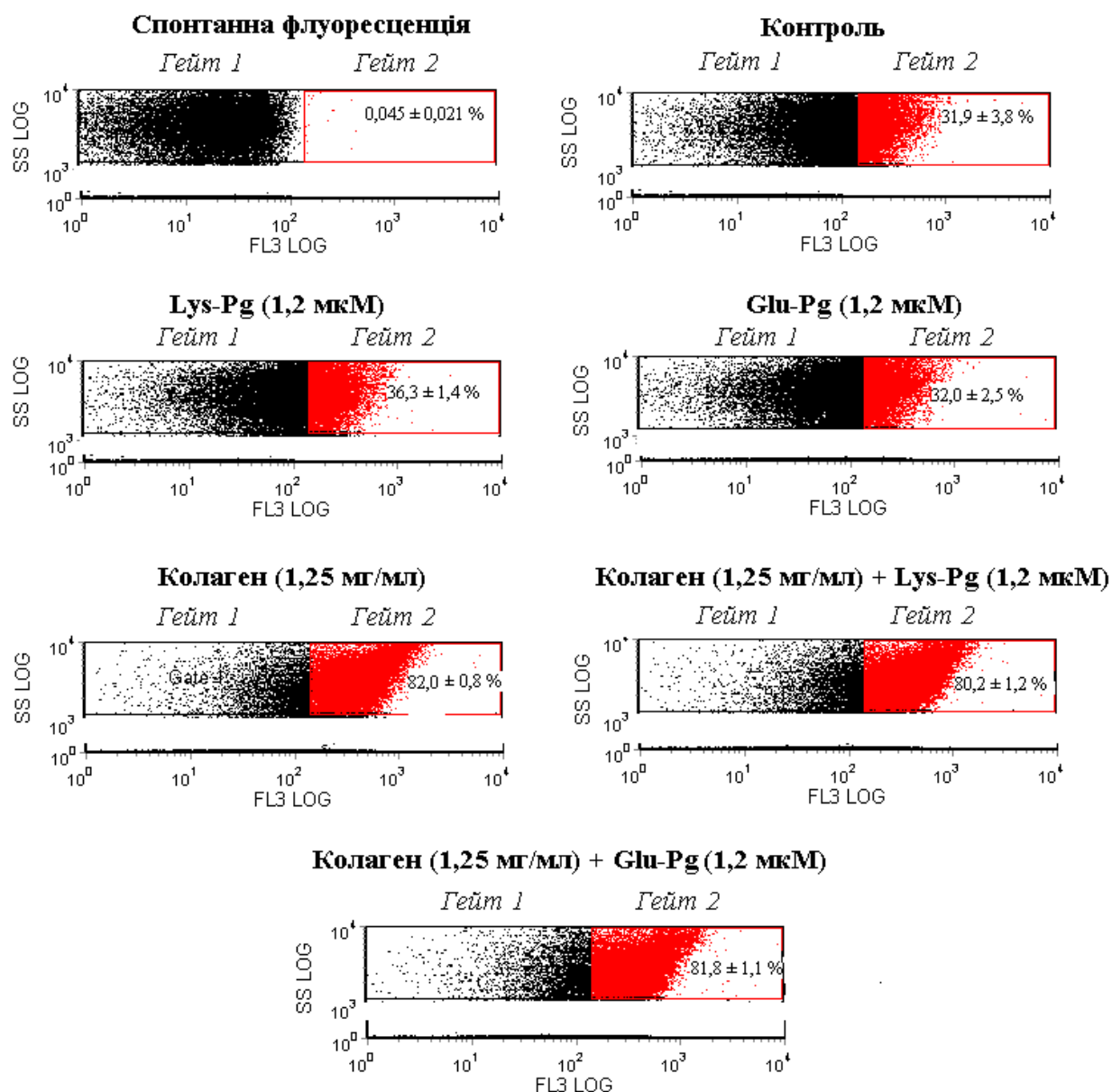


Рис. 3.48 Вплив Lys- та Glu-форм плазміногену на експонування Р-селектину відмитими тромбоцитами людини за їх активації колагеном (популяції Р-селектинпозитивних тромбоцитів на гістограмах обмежені гейтом 2)

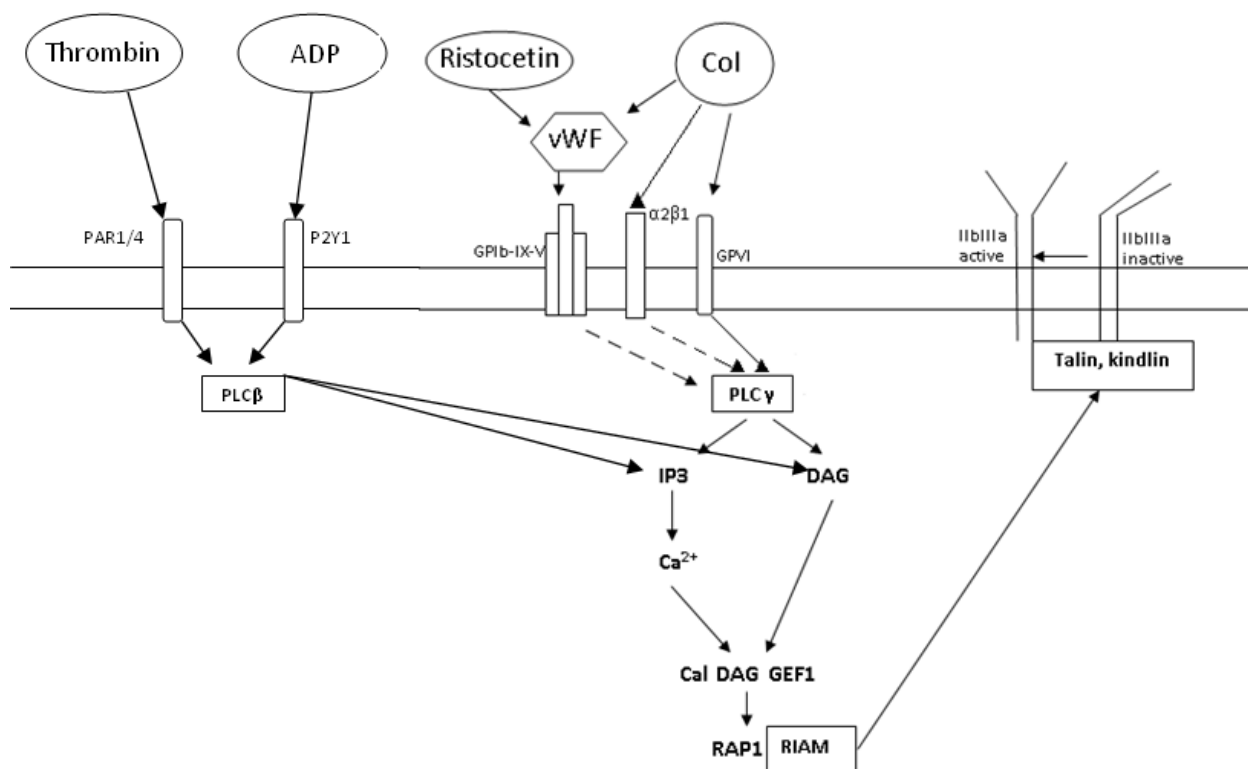


Рис. 3.49. Схема механізму агрегації тромбоцитів під впливом різних агоністів: Col – колаген, vWF – фактор фон Віллебранда PLC – фосфоліпаза С, IP3 – інозитол 3 фосфат, DAG – диацилгліцерол, CalDAGGEF1 – Регулюємий кальцієм та диацилгліцеролом GEF1, RAP1 – Ras-зв'язаний протеїн 1, RIAM – Rap-GTP-залежна адапторна молекула.

Можна припустити, що цей ефект Lys-плазміногену може бути обумовлений дією плазміну, оскільки відомо, що плазміноген, а особливо Lys-плазміноген, за певних умов досить швидко перетворюються на активну протеїназу на поверхні активованих тромбоцитів [466]. Однак, за результатами цитометричного аналізу з використанням апротиніну нами було показано, що апротинін не впливає на зміни кількості Р-селектинпозитивних клітин та сигналу флуоресценції, індуковані Lys-плазміногеном (Рис. 3.50). Таким чином, можна припустити, що за створених експериментальних умов вплив Lys-плазміногену на експонування Р-селектину на поверхні тромбоцитів не пов'язаний з появою протеїназої

активності, а, вірогідно, опосередковується його некаталітичними (крингловими) доменами.

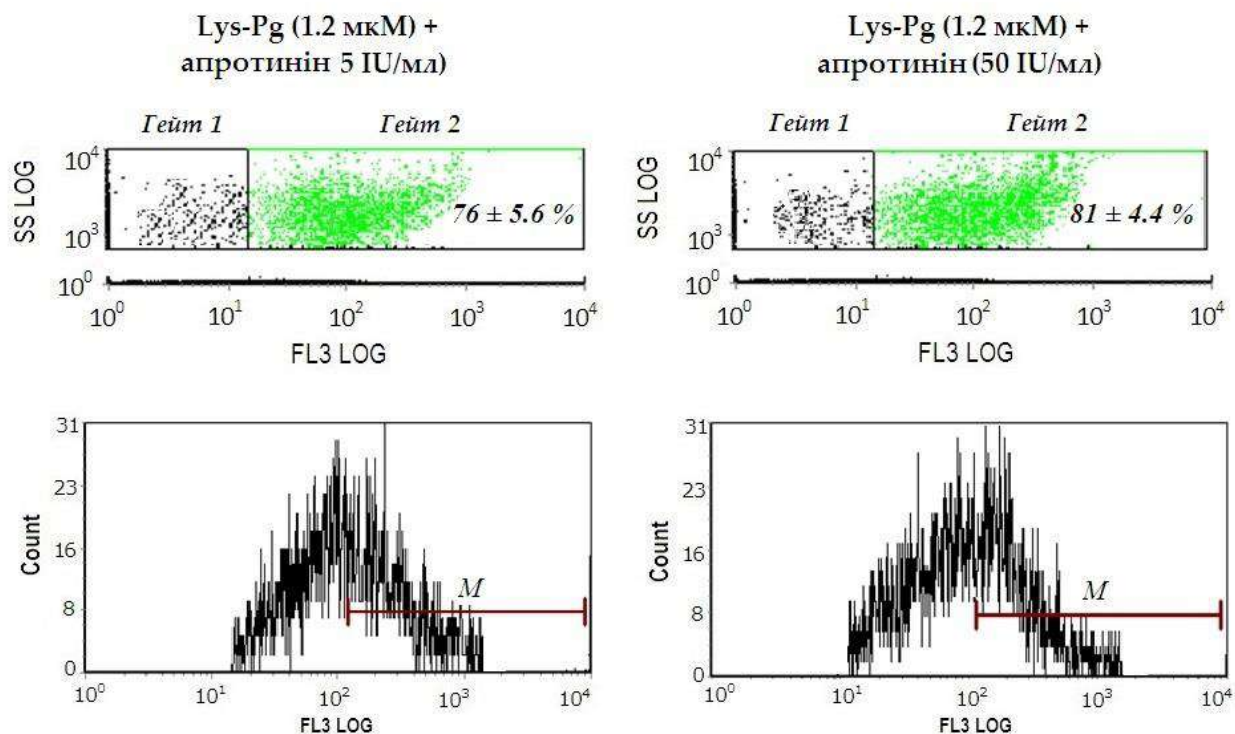


Рис.3.50 Вплив Lys-плазміногену на експонування Р-селектину відмитими тромбоцитами людини за наявності аprotиніну.

Отримані дані стосовно ефектів Lys-плазміногену на експонування Р-селектину на поверхні тромбоцитів є важливими з точки зору впливу компонентів плазміноген/плазмінової системи на адгезивні контакти між тромбоцитами та лейкоцитами. Відомо, що утворення тромбоцитарно-моноцитарних агрегатів відбувається завдяки взаємодії Р-селектину, що знаходиться на поверхні тромбоцитів з лігандом PSGL-1, який постійно експонується на поверхні моноцитів. Без попередньої взаємодії з тромбоцитами лейкоцити не здатні утворювати зв'язок з активованими клітинами ендотелію [463]. Тому є надзвичайно актуальним пошук препаратів, які здатні пригнічувати експонування Р-селектину на поверхні

тромбоцитів. Можливо, що препарати зі структурними фрагментами Lys-плазміногену можуть знайти застосування для цієї мети.

#### Висновки.

1. Інкубація інтактних тромбоцитів з Lys-плазміногеном призводить до статистично вірогідного зростання пулу тромбоцитів, що презентують Р-селектин. Можна припустити, що відбувається часткове вивільнення тромбоцитарних альфа гранул впливом Lys-плазміногену.
2. Додавання Lys-плазміногену до суспензії відмитих тромбоцитів з наступною активацією тромбіном достовірно зменшувало кількість Р-селектинпозитивних клітин та призводило до значного зниження інтенсивності їх флуоресценції порівняно з ізольованою стимуляцією агоністом.
3. Glu-плазміноген не спричиняв впливу на експонування Р-селектину в разі інтактних та активованих тромбоцитів.
4. В разі активації тромбоцитів колагеном Glu- та Lys-плазміноген не виявляють достовірного впливу на експонування Р-селектину на поверхні клітин.
5. Апротинін не впливає на зміни кількості Р-селектинпозитивних клітин та сигналу флуоресценції, що індуковані Lys-плазміногеном. Таким чином, за створених експериментальних умов вплив Lys-плазміногену на експонування Р-селектину на поверхні тромбоцитів не пов'язаний з протеїнажною активністю.

#### **3.12. Вплив плазміногену на експонування фосфатидилсерину на поверхні тромбоцитів**

Ми припустили, що модулюючий ефект різних форм плазміногену, який ми спостерігали в разі процесів експонування адгезивних протеїнів на поверхні стимульованих тромбоцитів (вітронектину та Р-селектину), знайде своє відображення на експонування ФС на їх поверхні. В попередніх

дослідженнях було показано, що утворення прокоагулянтної поверхні тромбоцита в разі тромбінової стимуляції певною мірою залежить від міжтромбоцитарного контакту [206].

При проведенні дослідів інтенсивність зв'язування FITC-кон'югованого анексину 5 з ФС на тромбоцитарній поверхні оцінювали методом протокової цитометрії. В ході аналізу результатів цитометрії для виявлення популяції анексин-позитивних клітин на гістограмі «Count/FL1 Log» використовували маркер M1, що обмежував всі тромбоцити, які зв'язують анексин (рис. 3.51). Маркер M2 охоплював лише субпопуляцію клітин, що зв'язують анексин у великій кількості.

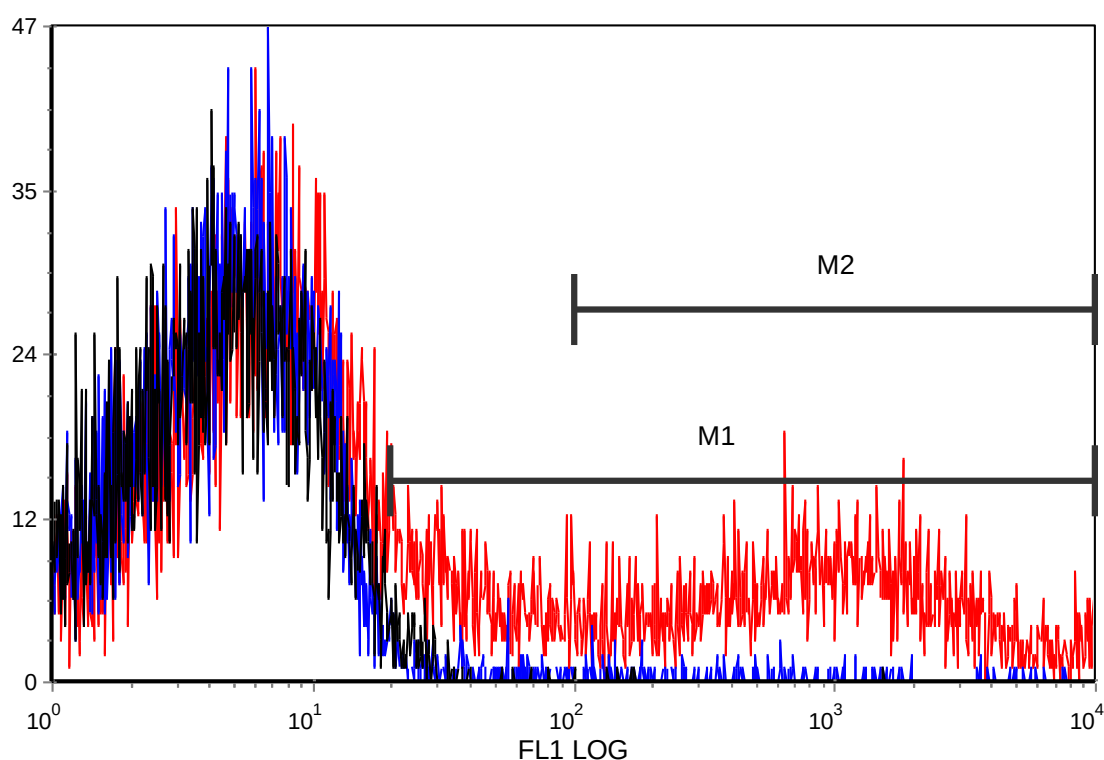


Рис. 3.51 Вплив тромбіну на зв'язування анексину A5 тромбоцитами людини, що були отримані методом гелі-фільтрації (типова гістограма), де чорним кольором позначено негативний контроль (без додавання анексину), синім – інтактні тромбоцити, червоним – тромбоцити, активовані тромбіном.

M1 – тромбоцити, які зв'язують анексин; M2 – тромбоцити, які зв'язують анексин у великій кількості; Count – кількість подій, FL1 LOG – логарифм інтенсивності флуоресценції FITC.

Ми виявили, що в суспензії інтактних тромбоцитів людини, отриманих методом гель-фільтрації, практично відсутня популяція клітин, що експонують ФС. Так, кількість анексин-позитивних тромбоцитів в середньому становить  $3,6 \pm 1,3\%$  від загальної кількості тромбоцитів (рис. 3.52). При активації тромбоцитів тромбіном (1 од. NIH/мл) кількість тромбоцитів, що зв'язують екзогенний анексин, зростає у 8,6 разів і складає  $31 \pm 3,9\%$ . Причому,  $2/3$  популяції анексин-позитивних клітин інтенсивно флуоресціює, що вказує на високий ступінь експонування ФС на їх поверхні. Відокремлення такої субпопуляції тромбоцитів при активації тромбіном чітко видно на точковому графіку (Рис. 3.53). Середнє значення інтенсивності флуоресценції цих клітин в 1,5 – 2 рази перевищує даний показник для популяції анексин-позитивних в цілому (маркер M1). Отже, тромбін не лише виступає індуктором вивільнення альфа-гранул тромбоцитів, але й викликає експонування ФС та, як наслідок, зв'язування анексину 5 на поверхні тромбоцитів людини. За дії тромбіну спостерігається значне зростання кількості анексин-позитивних клітин та відмежування субпопуляції анексин-позитивних тромбоцитів, що інтенсивно флуоресціюють.



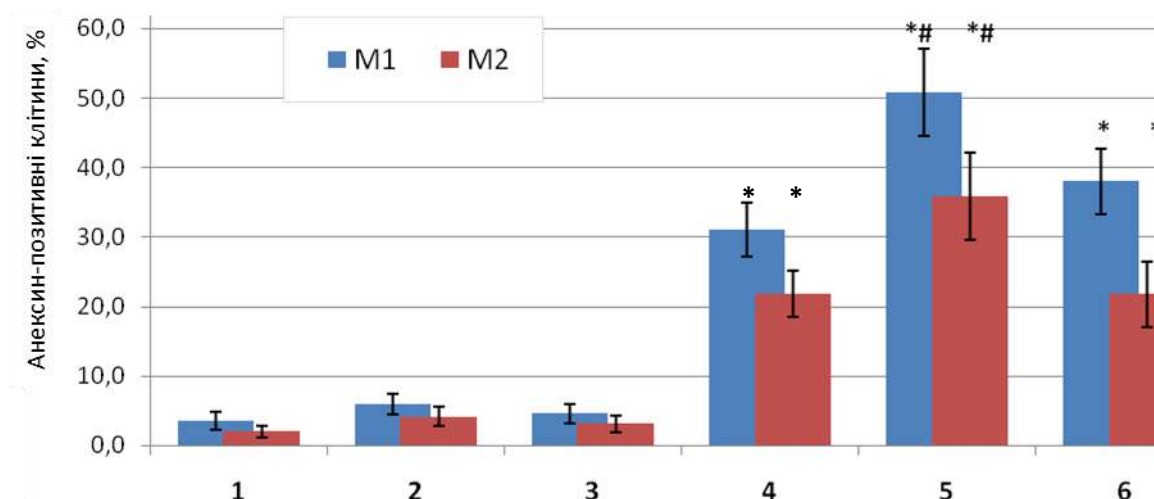


Рис. 3.52. Вплив Glu- та Lys-форм плазміногену на кількість тромбоцитів, які зв'язують анексин А5, за їх активації тромбіном ( $n = 4$ ):

1 – інтактні тромбоцити,  
 2 – інтактні тромбоцити, передінкубовані з Glu-плазміногеном,  
 3 – інтактні тромбоцити, проінкубовані з Lys-плазміногеном;  
 4 – тромбоцити, активовані тромбіном;  
 5 – тромбоцити, проінкубовані з Glu-плазміногеном та активовані тромбіном;  
 6 – тромбоцити, проінкубовані з Lys-плазміногеном та активовані тромбіном.  
 М1 – тромбоцити, які зв'язують анексин; М2 – тромбоцити, які зв'язують анексин у великій кількості. Відмінності у порівнюваних групах є статистично вірогідними ( $p < 0,05$ ): \* - порівняно з групою «Інтактні тромбоцити», # - порівняно з групою «Тромбоцити, активовані тромбіном».

Інкубація інтактних тромбоцитів з Glu-плазміногеном з наступною активацією тромбіном призводить до інтенсифікації зв'язування анексину А5: Чисельність популяції анексин-позитивних клітин достовірно підвищується у 1,6 рази, порівняно з такою в групі тромбін-активованих тромбоцитів. На відміну від нативної форми зимогену, стимулюючий ефект Lys-плазміногену є значно менш вираженим і спрямованим переважно на

субпопуляцію тромбоцитів, що меншою мірою зв'язує анексин (див. рис. 3.52 та 3.53, група «Lys-Pg + Thr»). Варто зазначити, що ізольована дія плазміногену на тромбоцити не викликає подібних змін. Таким чином, враховуючи наші попередні дослідження, встановлено, що Lys-плазміноген пригнічує агрегацію та вивільнення альфа-гранул тромбін-активованих тромбоцитів, проте не чинить суттєвого впливу на зв'язування екзогенного анексину А 5 при дії даного агоністу. Водночас, Glu-плазміноген може виступати ко-стимулятором тромбіну, індуюючи інтенсифікацію експонування ФС тромбоцитами.

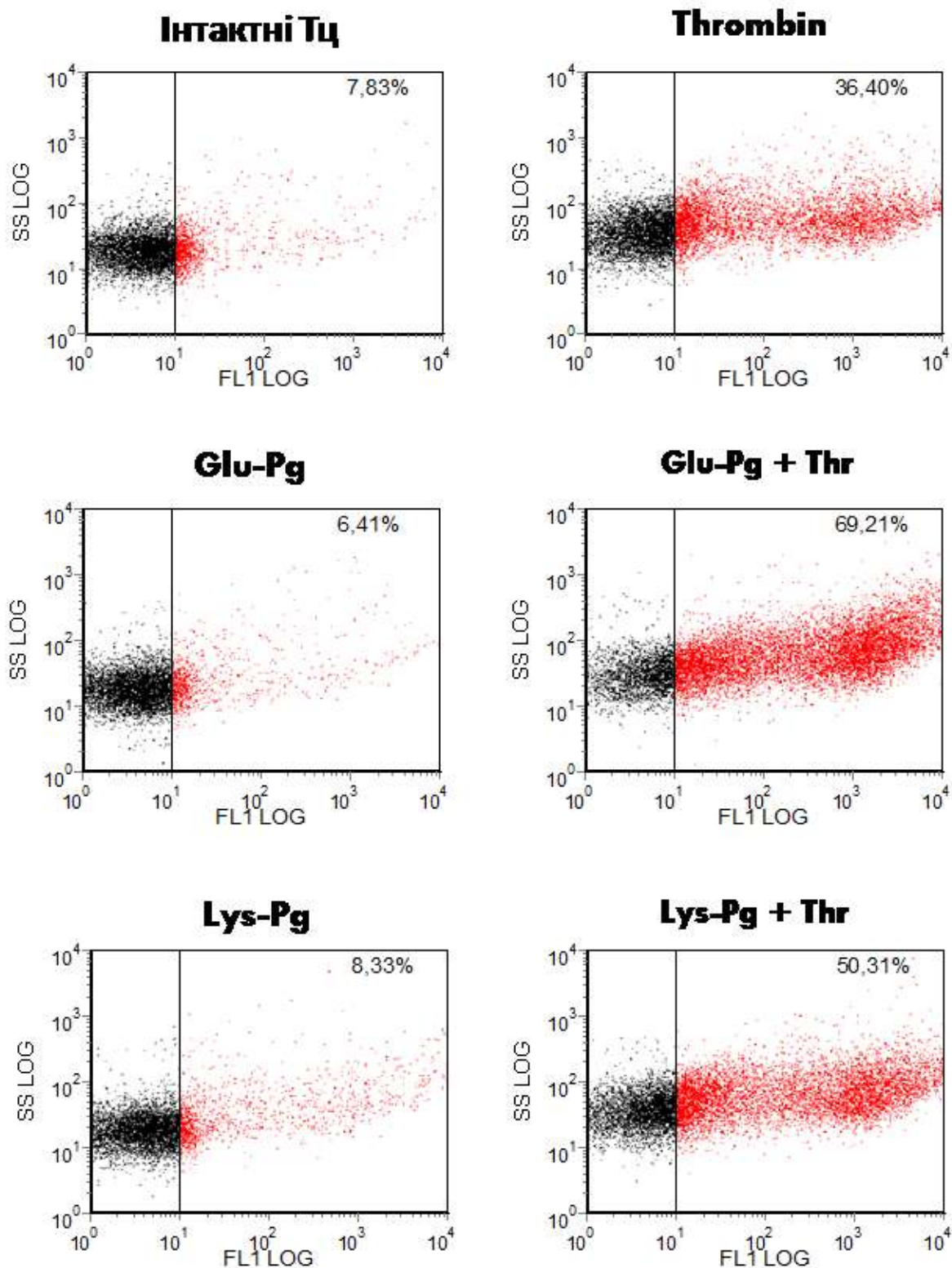


Рис. 3.53 Вплив Glu- та Lys-форм плазміногену на зв'язування анексину 5 тромбоцитами людини при активації тромбіном (типовий точковий графік): SS LOG – логарифм бічного світлорозсіювання частинок, FL1 LOG –

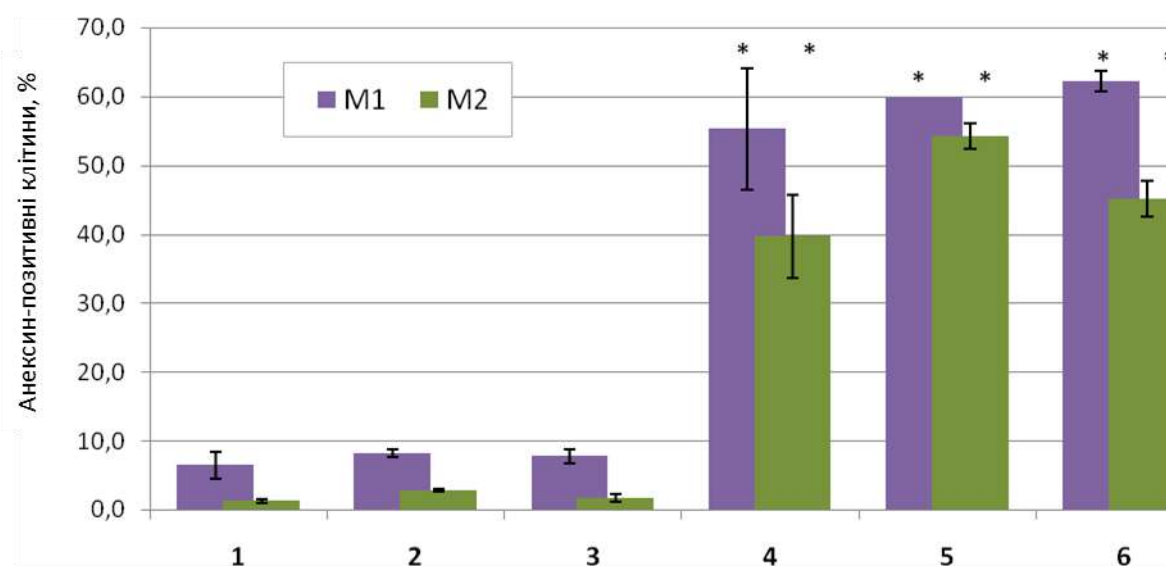
логарифм інтенсивності флуоресценції FITC. Червоним кольором позначено анексин-позитивні клітини.

При активації тромбоцитів колагеном ефекти різних форм плазмінотому на експонування ФС мали свої особливості. Колаген виступає потужним індуктором експонування ФС, про що свідчить зростання кількості анексин-зв'язуючих клітин до  $55,3 \pm 8,8\%$  (рис. 3.54, А). Переважна більшість анексин-позитивних тромбоцитів флуоресціює з надвисокою інтенсивністю, що перевищує даний показник для інтактних клітин у 6 разів (рис. 3.54, Б). Так, на графіку (Рис. 3.55) проілюстровано відокремлення субпопуляції гіперфлуоресцентних тромбоцитів: має місце значне зміщення густини точок вправо по осі ОХ (FL1 LOG), що свідчить про їх високу інтенсивність флуоресценції. Вертикальне розшарування популяції анексин-позитивних клітин вказує на зростання їх гранулярності при дії агоністу. Цікаво відмітити, що чисельність субпопуляції тромбоцитів з надекспонуванням ФС за умов активації колагеном становить близько 4/5 від загальної кількості анексин-позитивних клітин, що перевищує таку за дії тромбіну. Як вказувалося раніше, така потужна відповідь на кальцієву стимуляцію може бути наслідком специфічної стимуляції фосфоліпаз. За думкою Heemskerk J.W.M. et al. , тромбін, який передає сигнал головним чином завдяки фосфоліпазі C $\beta$  призводить до помірного експонування фосфатидилсерину на поверхні активованого тромбоциту, в той час колагенова стимуляція, яка відбувається завдяки фосфоліпазі C $\gamma$  забезпечує високий рівень експонування фосфатидилсерину [207].

Отже, активація тромбоцитів колагеном супроводжується екзоцитозом їх альфа-гранул та інтенсифікацією зв'язування анексину A5 на їх поверхні. Проте, колаген, на відміну від тромбіну, індукує зростання не лише кількості анексин-позитивних клітин, а й інтенсивності їх флуоресценції, що, ймовірно, свідчить про високий рівень експонування фосфатидилсерину на їх поверхні.

Передінкубація тромбоцитів з Glu-плазміногеном підсилює ефект колагену, не викликаючи достовірної зміни загальної кількості анексин-позитивних клітин, проте їх середня інтенсивність флуоресценції збільшувалась принаймні вдвічі. Так, з рис. 3.55 видно, що Glu-плазміноген викликає зростання чисельності субпопуляції гіперфлуоресцентних тромбоцитів. У разі використання Lys-плазміногену такої дії не спостерігали.

**А**



**Б**

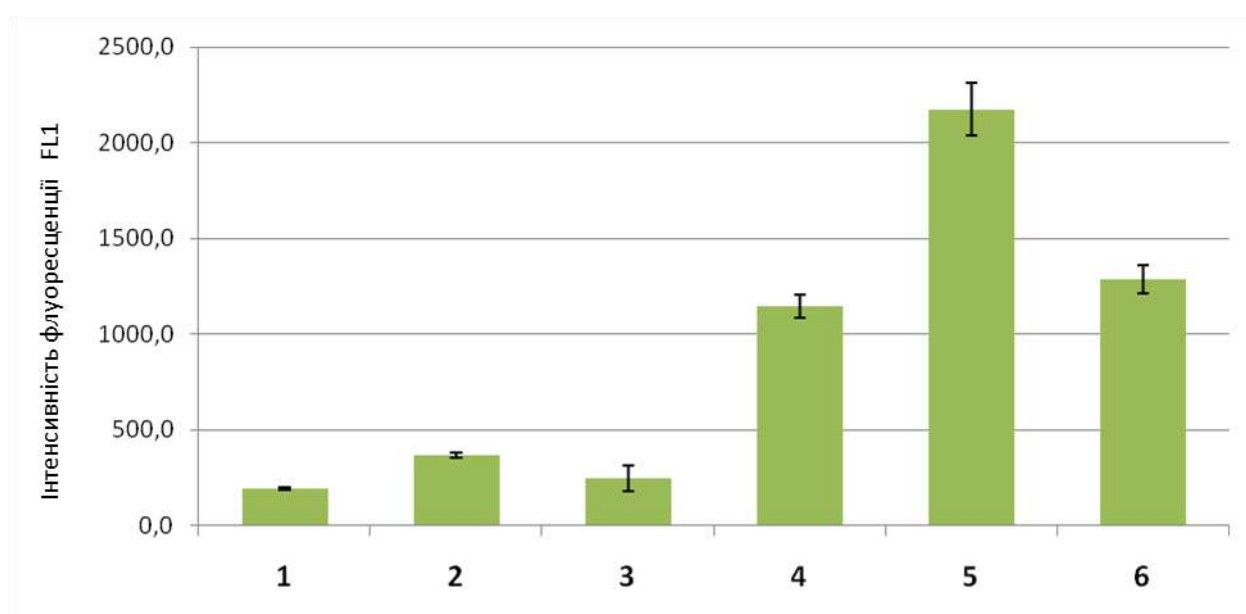


Рис. 3.54 Вплив Glu- та Lys-форм плазміногену на кількість (А) та інтенсивність флуоресценції (Б) тромбоцитів, які зв'язують анексин V, за їх активації колагеном (n = 3):

- 1 – інтактні тромбоцити,
  - 2 – інтактні тромбоцити, проінкубовані з Glu-плазміногеном,
  - 3 – інтактні тромбоцити, проінкубовані з Lys-плазміногеном;
  - 4 – тромбоцити, активовані колагеном;
  - 5 – тромбоцити, проінкубовані з Glu-плазміногеном та активовані колагеном;
  - 6 – тромбоцити, проінкубовані з Lys-плазміногеном та активовані колагеном.
- M1 – тромбоцити, які зв'язують анексин; M2 – тромбоцити, які зв'язують анексин у великій кількості. Відмінності у порівнюваних групах є статистично вірогідними ( $p < 0,05$ ): \* - порівняно з групою «Інтактні тромбоцити».

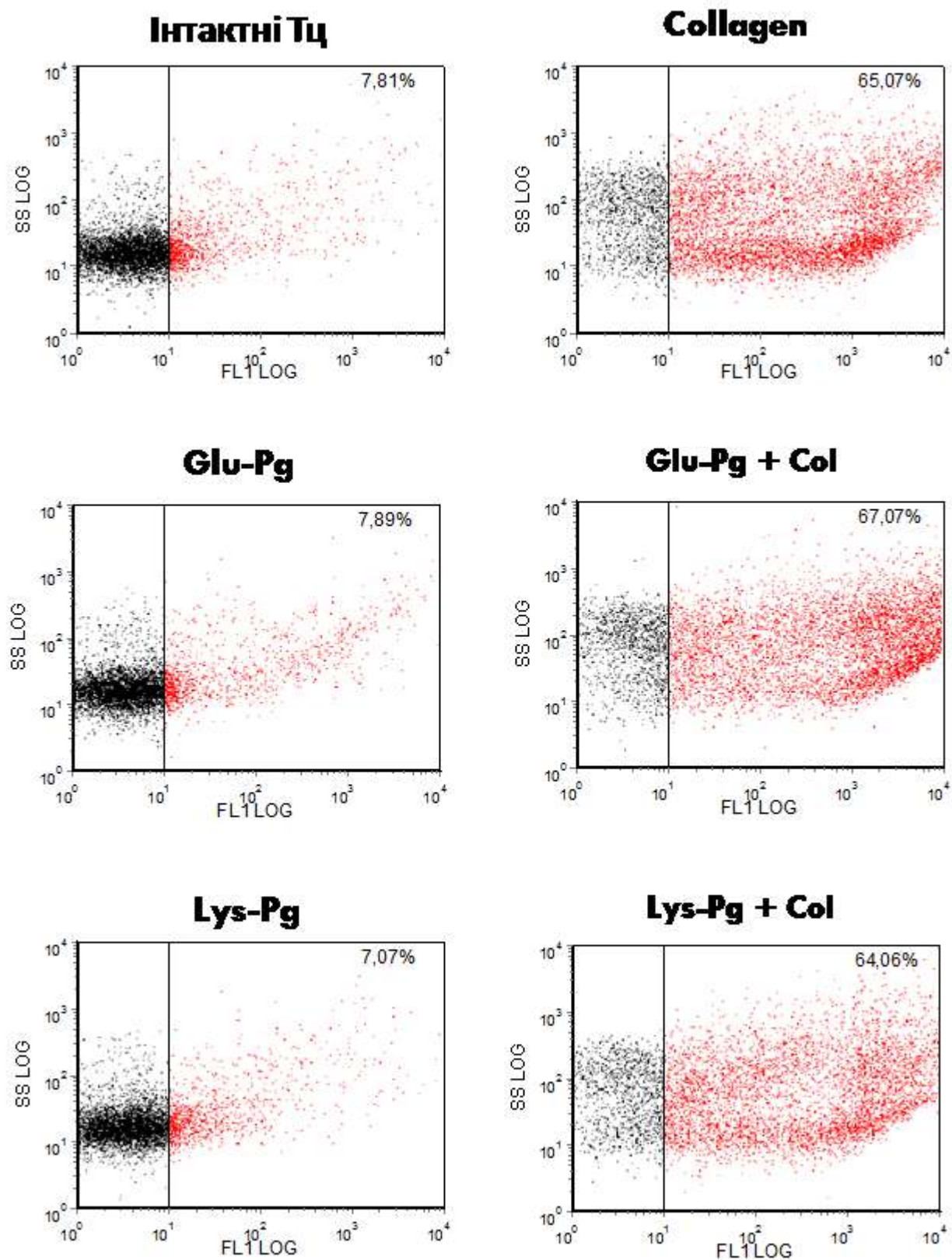


Рис. 3.55 Вплив Glu- та Lys-форм плазміногену на зв'язування анексину А5 тромбоцитами людини при активації колагеном (типовий точковий графік):

SS LOG – логарифм бічного світлорозсіювання частинок, FL1 LOG – логарифм інтенсивності флуоресценції FITC.

Порівняльний аналіз даних цитомерії підтверджує результати, отримані в попередніх дослідженнях стосовно ролі тромбіну та колагену. Ці агоністи тромбоцитарної агрегації здатні виступати як потужні ефектори прокоагулянтної поверхні тромбоцитів. Так, нами встановлено, що активація тромбоцитів супроводжується зростанням кількості анексин-позитивних клітин щонайменше у 8 разів. Інтенсивність флуоресценції при дії колагену також зростає в 6 разів, тоді як у відповідь на тромбін достовірно не змінювалася. У складі популяції анексин-зв'язуючих тромбоцитів має місце відокремлення субпопуляції гіперфлуоресцентних клітин, які, вочевидь, характеризуються надвисоким рівнем експонування фосфатидилсерину на зовнішній поверхні плазматичної мембрани. Субпопуляція є дуже гетерогенною за розміром та ступенем гранулярності (у випадку колагену). Варто відзначити, що при активації тромбоцитів людини колагеном (але не тромбіном) спостерігається інтенсивне утворення мікроагрегатів, про що свідчить поява еліпсоїдної «хмари» високої густини в правому верхньому квадранті на точковому графіку (Рис. 3.56). При цьому в складі таких мікроагрегатів практично відсутні анексин-позитивні клітини. Натомість, чисельна субпопуляція анексин-позитивних частинок представлена у лівій частині графіка, що вказує на порівняно невеликі розміри цих клітин та високий ступінь їх гранулярності.



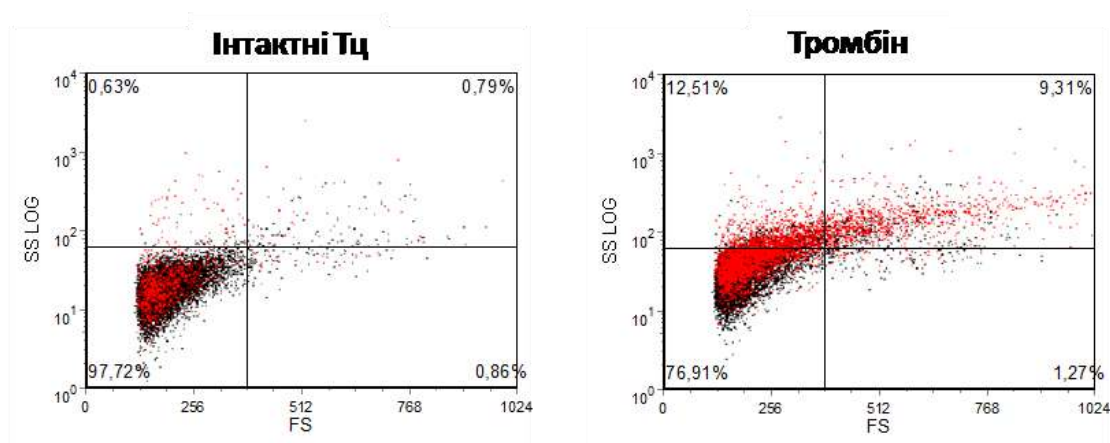
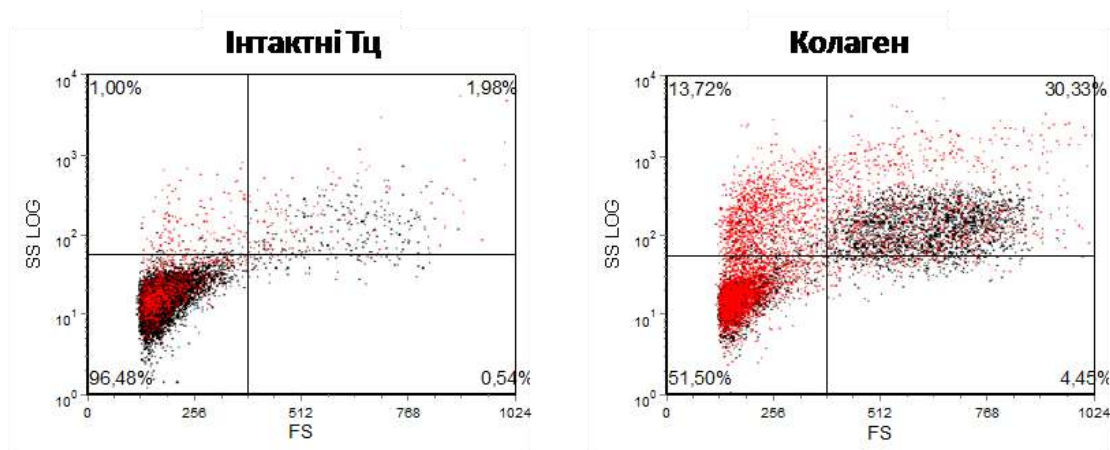
**А****Б**

Рис. 3.56 Зміна розмірів та гранулярності тромбоцитів при дії агоністів активації – тромбіну (А) та колагену (Б) (типовий точковий графік): SS LOG – логарифм бічного світлорозсіювання частинок, FS – пряме світлорозсіювання частинок.

Результати цитометрії дають змогу припустити, що тромбоцити, які експонують фосфатидилсерин безпосередньо не беруть участі у формуванні асоціатів проте виступають матрицею для перебігу реакцій генерації тромбіну та залучаються до регуляції процесу тромбоутворення за рахунок

вивільнення альфа-гранул. Відомо, що тромбоцитарні альфа-гранули містять прокоагулянтні фактори, - фактори V, XI та XIII, а також протромбін. Слід зауважити, що тромбоцитарний фактор V є захищеним від дії протеїну C, який здійснює свій інгібувальний вплив в плазмі [467]. Показано, що в тромбоцитах проангіогенні та антиангіогенні компоненти знаходяться в різних популяціях альфа-гранул і вивільнюються альтернативно [468]. Можливо, що в популяції фосфатидилсеринпозитивних тромбоцитів під час стимуляції специфічних рецепторів вивільнюються переважно прокоагулянтні фактори.

Glu-плазміноген може виступати ко-стимулятором тромбін-індукованого екзоцитозу альфа-гранул та експонування фосфатидилсерину на поверхні тромбоцитів. При цьому дія зимогену переважно спрямована на посилення прокоагулянтних властивостей тромбоцитів. Отримані дані узгоджуються з даними літератури. Так, O'Mullane et al. було показано, що додавання екзогенного Glu-плазміногену до культури моноцитів U 937 призводило до посилення експонування ФС на поверхні цих клітин під впливом факторів апоптозу [469]. Натомість Lys-плазміноген виявляє інгібувальну дію щодо агрегації та секреції альфа-гранул тромбоцитів, проте практично не впливає на тромбін-індуковану інтенсифікацію зв'язування анексину A5 тромбоцитами. Ймовірно, антиагрегаційний ефект Lys-плазміногену спрямований на міжтромбоцитарні взаємодії, і не є наслідком апоптозу агоніст-індукованих тромбоцитів. Можна припустити, що реалізація ефектів різних форм плазміногену на клітини опосередкована різними механізмами, при яких конформація плазміногенової молекули відіграє визначальну роль.

## Висновки

1. Lys-плазміноген виявляє інгібувальну дію щодо агрегації та секреції альфа-гранул тромбоцитів, проте практично не впливає на агоніст-індуковану інтенсифікацію зв'язування анексину V.
2. Вперше встановлено, що Glu-плазміноген потенціює дію тромбіну та колагену, спрямовану на інтенсифікацію зв'язування екзогенного анексину V тромбоцитами людини, яка обумовлена експонуванням фосфатидилсерину на поверхні цих клітин.

## ЗАКЛЮЧЕННЯ

При формуванні тканини та під час її функціонування міжклітинні контакти забезпечуються спеціальними адгезивними протеїнами, які отримали назву молекул клітинної адгезії (МКА). Зазвичай це – інтегральні протеїни, що мають трансмембранний та цитоплазматичний домен, який забезпечує зв'язок адгезивного з протеїну цитоскелетними структурами і передачу сигналу до відповідних внутрішньоклітинних структур. За допомогою МКА клітина здатна утворювати контакти з іншими клітинами або пересуватися уздовж екстрацелюлярного матрикса. В багатьох випадках МКА здатні взаємодіяти з декількома лігандами завдяки існуванню різних сайтів зв'язування. В більшості випадків МКА розташовані на поверхні клітин у вигляді компактних кластерів, утворюючи таким чином ділянки множинного зв'язку. Предметом дисертаційного дослідження були адгезивні взаємодії обумовлені різними класами адгезивних рецепторів. В роботі показано, що під час постнатального розвитку та старіння тканин, функціональному навантаженні спеціалізованих клітин головного мозку та при утворенні адгезивних контактів між клітинами крові відбуваються певні зміни в експресії адгезивних протеїнів та їх взаємодіях з відповідними лігандами. Розглянуто особливості адгезивних зв'язків, що забезпечуються представниками різних родин – імуноглобулінової родини, кадгеринів та інтегринів.

Експресію протеїну адгезії імуноглобулінової родини N-CAM1 було визначено в попередніх роботах в головному мозку щурів в різні періоди ембріонального та постембріонального розвитку. В роботі вивчали експресію протеїну N-CAM1 в тканині м'язів у різні періоди постнатального розвитку щурів. Слід зазначити, що експресія цього протеїну у м'язовій тканині має свої особливості. Показано, що N-CAM1 може залучатись до механізмів, які підтримують синаптичну цілісність

нервово-м'язових сполучень [297]. Інервація м'язових фібрил в період постнатального розвитку ссавців змінюється відповідно до стадії розвитку. У щурів в період від народження до десятого дня постнатального розвитку спостерігається полінейрональна інервація м'язів, тобто кожна м'язова фібрила отримує імпульс від декількох (щонайменш від двох) мотонейронів [470]. Починаючи з десятого дня постнатального розвитку, полінейрональна інервація змінюється на мононейрональну і в м'язах дорослого щура кожна фібрила отримує імпульс лише від одного мотонейрона. На десятий день постнатального розвитку починається також диференціація м'язових фібрил, саме в цей період формуються структури з «повільним» міозином [471]. Під час старіння м'язів відбувається зниження кількості моторних одиниць у людей та гризунів. Оскільки зміни в інервації м'язів неодмінно пов'язані зі змінами в експресії молекул клітинної адгезії, зокрема протеїну N-CAM1, ми визначали експресію цього протеїну в скелетних і серцевих м'язах щура на перший, десятий та сороковий день постнатального розвитку, і також визначили особливості експресії цього протеїну у м'язах старих щурів (279 та 730 день постнатального розвитку).

В попередніх дослідженнях показано існування п'яти сплайс-варіантів матричних РНК в головному мозку щурів та мишей (7,4кб, 6,7кб, 5,2кб, 4,3кб та 2,9кб). Матрична РНК 4,3 кб, яка спостерігалася в ембріональній нервовій тканині гризунів, в період постнатального розвитку мозку ставала менш вираженою. Нами показано наявність тих самих сплайс-варіантів в тканинах скелетних м'язів, причому матрична РНК 4,3 кб виявлялася лише в серцевих м'язах і мала слабку вираженість. Найбільш вираженими в тканинах м'язів в період постнатального розвитку тварин були матричні РНК 6,7кб, 5,2 кб та 2,9 кб. Експресія цих мРНК ставала менш вираженою в препаратах м'язів дорослих щурів. Характерною особливістю тканини м'язів старих тварин була реекспресія матричних РНК 5,2 кб та 2,9 кб. [472]. Слід сказати, що в головному мозку щурів таких змін не відбувалося. В період від першого дня постнатального розвитку до сорокового дня в головному мозку визначали

зниження експресії матричних РНК 7,4 та 6,7кб, та підсилену експресію матричних РНК 5,2 та 2,9 кб. Проте після сорокового дня постнатального розвитку жодних змін в експресії матричних РНК протеїну N-CAM1 не спостерігалось [321]. Можна зробити висновок, що оскільки тканина головного мозку визначається набагато меншою здатністю до регенерації порівняно зі м'язовою тканиною, то це знаходить відповідне відображення в експресії матричних РНК протеїну N-CAM1.

Експресія додаткових екзонів протеїну N-CAM1 заслуговує окремої уваги, тому що вона є унікальною не тільки для всіх представників адгезивних протеїнів, але й серед представників молекул адгезії імуноглобулінової родини. В роботі вивчалась експресія екзонів VASE та групи специфічних екзонів м'язів в період постнатального розвитку та старіння щурів.

Між екзонами шостим та восьмим було знайдено екзон VASE здатний до альтернативного сплайсингу. Якщо відбувається експресія VASE, то результатом є синтез десяти амінокислотних залишків в четвертому імуноглобуліновому домені протеїну N-CAM1. Наявність додаткової послідовності змінює структуру четвертого домену і робить його схожим з варіабельним доменом імуноглобулінових протеїнів. Вважають, що відповідно змінюються і адгезивні властивості протеїну N-CAM1. За думкою Small S.J et al. [33] експресія VASE не інгібує N-CAM1-залежну адгезію. Вважають, що наявність амінокислотної послідовності, яку кодує цей мінорний екзон, підвищує стабільність гомофільного зв'язку. З приводу функціонального значення експресії VASE існує декілька гіпотез, але на підставі експериментальних даних можна зробити припущення, що експресія цього екзону пов'язана з регуляцією синаптичної пластичності. В період раннього розвитку головного мозку в нейронах гіпокампу та мозочку 3% транскриптів протеїну N-CAM1 містять послідовність VASE, в той час як в головному мозку дорослих тварин ця кількість зростає до 50%. За присутності ізоформ протеїну N-CAM1, що містять послідовність, яка

кодується VASE, аксони стають неспроможними до росту. Цілком логічно, що вищезначені ізоформи протеїну N-CAM1 не визначаються в нейроепітелії нюхової цибулини, де нейрогенез та аксональний ріст відбуваються протягом всього життя. Припускають, що амінокислотна послідовність, яка синтезується завдяки експресії VASE, інгібує N-CAM1-стимульований ріст аксону, перешкоджаючи зв'язуванню протеїну N-CAM1 з рецептором FGF і, тим самим запобігає активації останнього [473]. Згідно отриманим в роботі даним, екзон VASE, який мав вираженість в мРНК при постнатальному розвитку головного мозку щура [33], а в препаратах мРНК скелетних м'язів майже не виявлявся. На відміну від скелетних м'язів, в серцевих м'язах спостерігалася виражена гібридизація EVASE з відповідними сплайс-варіантами мРНК протеїну N-CAM1, а саме – 6,7; 5,2 та 2,9 кб. Можна зробити висновок щодо тканино-специфічного характеру експресії екзону VASE в м'язах щура під час постнатального розвитку.

Експресія додаткових специфічних екзонів м'язів (msd) протеїну N-CAM1 має безпосередній вплив на структурно-функціональні властивості протеїну. Додаткові додаткові екзони розташовані між 12 та 13 основними екзонами і невеликі за розміром – msd 1a складається з 15 пар основ, msd 1b – з 48, msd 1c з 42 пар основ та AAG містить лише три нуклеотиди. Додаткові екзони м'язів можуть давати різні комбінації, а завдяки малому розміру цих екзонів, диференціацію за молекулярними масами ізоформ, в яких експресуються msd, зробити досить складно. Однак при експресії цих екзонів структура протеїну N-CAM1 отримує додатковий сайт О-глікозилювання по залишкам серину або треоніну. Вуглеводний компонент – залишок галактози з N-ацетілгалактозаміном – розпізнається лектином з арахісу і може, таким чином, бути використаний в якості доказу експресії додаткових екзонів м'язів в складі протеїну N-CAM1 [474, 475]. Зроблено припущення, що О-глікозилювання протеїну N-CAM1 призводить до підвищення стабільності молекули, як це показано на прикладі рецептора ліпопротеїну низької щільності [476, 477]. В експериментах з трансфекованими клітинами

показано, що експресія ізоформ протеїну N-CAM1, які мають амінокислотні послідовності, що кодуються на базі додаткових екзонів м'язів, сприяє злиттю міобластів [36]. Цей процес є надзвичайно важливим етапом в розвитку м'язової тканини, оскільки злиття міобластів поєднується з початком диференціації м'язів. Після злиття міобластів поділ клітин не відбувається, проте в м'язах дорослого організму частина міобластів продовжує існувати у вигляді клітин-сателітів, які грають роль стовбурових клітин м'язів.

Разом з тим, слід зауважити, що в організмі N-CAM1-негативних мишей не виявлено грубих дефектів в скелетних м'язах в процесі розвитку, а первинні міобласти цих мишей зливалися з такою ж швидкістю, як і клітини нормальних тварин [478]. Це свідчить про те, що підсилення процесу злиття міобластів, яке поєднується з підвищеною експресією N-CAM1, може бути результатом посилення загальної адгезії, і що втрата молекул N-CAM1 може бути компенсована іншими адгезивними молекулами [479]. Цілком імовірно, що експресія певних ізоформ протеїну N-CAM1 з амінокислотою послідовністю, утвореною завдяки *msd* ексонам, спричиняє вплив на інші адгезивні та/або сигнальні молекули, що розташовані в спільних мембранних структурах. Це дало підстави припустити, що протеїн N-CAM1 виконує не тільки адгезивну, але й регуляторну функцію [480].

Окремої уваги заслуговує дослідження Вуеон МК et al, які показали, що ізоформи N-CAM1, синтезовані на базі транскриптів, що містили *msd* екзони, на ранніх стадіях розвитку серцевих м'язів колокалізовані з Z-дисками міофібрил (структура, до якої кріпляться актинові філаменти) [481]. Цікаво, що *msd*-негативні ізоформи протеїну такої локалізації не виявляли, а інші адгезивні протеїни (N-кадгерин та  $\beta$ -1 інтегрин) виявляли асоціацію з Z-дисками набагато пізніше. Вважають, що завдяки експресії *msd* екзонів молекула N-CAM1 набуває здатності взаємодіяти з компонентами екстрацелюлярного матриксу. Можливі два варіанти такої взаємодії. Згідно першого варіанту, *msd*-позитивна ізоформа N-CAM1 завдяки додатковому



сайту О-глікозилювання взаємодіє з лігандом екстрацелюлярного матриксу, а це, в свою чергу, призводить до змін в конформації цитоплазматичного домену, котрий набуває здатності взаємодіяти з Z-диском. Можливо також, що msd-позитивна ізоформа N-CAM1 утворює зв'язок з компонентом екстрацелюлярного матриксу, який має відповідний зв'язок з Z-диском. В будь-якому разі, msd-позитивні ізоформи N-CAM1 можна розглядати як маркери раннього міофібрилогенезу. Як свідчать отримані нами дані, додаткові м'язево-специфічні екзони та їх комбінації виявляють виражену експресію у скелетних м'язах щура. При цьому експресія цих екзонів пов'язана головним чином з мРНК 5,2 та 2,9 кб. Разом з тим в період раннього постнатального розвитку скелетних м'язів показано присутність мРНК, в яких експресія м'язево-специфічних екзонів не була вираженою. Схожий розподіл виявлено в серцевих м'язах щура під час постнатального розвитку.

Дослідження вмісту ізоформ протеїну N-CAM1 в тканинах м'язів в різні періоди постнатального розвитку показали, що ізоформа N-CAM-145 є домінуючою у всіх препаратах скелетних м'язів незалежно від віку тварини. Слід зазначити, що вираженість поліпептидних зон змінювалась залежно від віку: чітка експресія під час раннього постнатального розвитку м'язів, мінімальна вираженість у м'язах дорослого щура (40-й день постнатального розвитку), і реекспресія протеїну N-CAM1 у м'язах старих тварин (270 та 720 день постнатального розвитку). Наявність домінантної ізоформи N-CAM-145 не супроводжується підвищеною експресією мРНК 6,7 кб. Це можна пояснити двома причинами: або у м'язах старих тварин знижений катаболізм ізоформи N-CAM-145, або, навпаки, трансляційна швидкість мРНК 6,7 кб підвищена порівняно з мРНК розміром 5,2 та 2,9 кб. Аналогічні результати було отримано для препаратів серцевих м'язів – наявність домінантної ізоформи N-CAM-145, що не супроводжувалось підвищеною експресією мРНК 6,7 кб.

Роль окремих ізоформ протеїну N-CAM1 досліджена в літературі [482]. Показано, що в організмі N-CAM1-негативних тварин відбуваються

порушення при формуванні нервово-м'язового сполучення. Якщо в організмі дослідних тварин була відсутня лише ізоформа N-CAM1 з найдовшим трансмембранним доменом (N-CAM-180), то спостерігалися зміни в молекулярній організації пресинаптичних терміналей, зокрема було порушено локалізацію протеїну синаптичних везикул RIM, який регулює везикулярний екзоцитоз [483]. В наших дослідженнях виявлено, що під час постнатального розвитку та старіння щурів відбуваються суттєві зміни в експресії додаткових екзонів, які гібридизуються з мРНК 5,2 та 2,9 кб, що відповідають за синтез ізоформи N-CAM-120. Таким чином, роль ізоформ, які прикріплюються до мембрани за допомогою фосфатидилінозитолового якорю, може полягати в забезпеченні адгезивних контактів певної міцності, що деякою мірою залежить від експресії додаткових екзонів, в той час як трансмембранні ізоформи протеїну N-CAM1 можна розглядати як компоненти сигналінгової системи.

Наведені в роботі експериментальні дані свідчать про те, що зміни в експресії матричних РНК під час старіння корелюють з підвищеним вмістом протеїну N-CAM1 в скелетних та серцевих м'язах щура. Можна припустити, що підвищений вміст протеїну N-CAM1 в серцевих м'язах старих щурів може бути наслідком гіпертрофічних змін і являє собою компенсаторну відповідь на втрату м'язових фібрил [317]. Припускають, що зниження кількості м'язових фібрил виникає внаслідок втрати цілих моторних одиниць та неповної реіннервації денервованих м'язових фібрил моторними нейронами, які залишилися. Накопичення інтегрального мембранного глікопротеїну N-CAM1 на поверхні м'язових волокон є загальною відповіддю на м'язову денервацію. В денервованих скелетних м'язах спостерігається підвищений рівень загальної кількості протеїну N-CAM1 та відповідних матричних РНК. Високий рівень цього протеїну виявлено у дводенний період після денервації і зберігається підвищеним до 300 днів у м'язах, які залишаються денервованими [484].

Дослідження протеїнів клітинної адгезії кадгеринової родини виявили певні функціональні особливості цього класу адгезивних молекул. Якщо розглянути роль N-CAM1 та N-кадгерину в процесі злиття міобластів, то за даними авторів роботи [100] N-кадгерина адгезія, на відміну від N-CAM1-залежної адгезії, є критичною для цього процесу. Пептид, що містить послідовність His-Ala-Val, так само як і антитіла до N-кадгерину, спричиняє інгібуючий вплив на злиття міобластів, в той час як антитіла до N-CAM1 за цих же умов такого ефекту не виявляють. Разом з тим, існують цікаві дані про те, що ці протеїни клітинної адгезії здатні до сумісної дії під час аксонального росту в культурі нейронів. Вважають, що N-CAM1, N-кадгерин та FGF-рецептор формують комплекс. N-CAM1 зв'язується з FGF-рецептором завдяки фібронектиновим повторам, а молекула N-кадгерину утворює зв'язок з рецептором завдяки послідовності, що розташована в четвертому екстрацелюлярному домені адгезивного протеїну. Активація комплексу через ряд послідовних подій веде до активації  $\beta$ -1 інтегринової субодиниці, тим самим утворюючи адгезивний зв'язок за типом клітина-матрикс, що є необхідним для успішного аксонального росту [485, 486].

Логічно припустити, що молекули, які залучені до морфогенетичних подій, можуть брати участь в регенеративних процесах в тканинах старих тварин. Наведені в роботі дані свідчать, що це є цілком справедливо для протеїну N-CAM1. В той же час при проведенні аналізу експресії матричних РНК та ізоформ N-кадгеринового поліпептида під час розвитку та старіння тканин печінки, скелетних та серцевих м'язів, нирок та легенів істотних змін виявлено не було.

В роботі досліджено експресію класичних кадгеринів в різних тканинах щура. Експресія N-кадгерину пов'язана з трьома варіантами матричних РНК (5,2 4,3-4,4 та 3,5 кб), E-кадгерина експресія асоціюється з мРНК розміром 4,3 кб, а P-кадгерина експресія – 3,5 кб. За допомогою зондів, які специфічно гібридизувалися з відповідними представниками кадгеринової родини, нами було показано, що експресія N-кадгерину в головному мозку та

скелетних м'язах щура пов'язана з мРНК розміром 5,2 та 4,4-4,3 кб; для печінкової тканини характерні матричні РНК 4,4-4,3 кб та 3,5 кб, а в серцевих м'язах, нирках та легенях спостерігаються всі вищезначені матричні РНК, що відповідають за синтез цього кадгерину. Експресія матричних РНК Е-кадгерину мала свої особливості: матричні РНК 4,3 кб спостерігали в печінці, нирках та легенях, але їх не було в головному мозку, скелетних м'язах або серцевих м'язах. Для Р-кадгерину характерний інший розподіл. Матричні РНК 3,5 кб спостерігаються в тканинах нирок та легенів, слабка експресія цих РНК характерна для головного мозку та серцевих м'язів, в тканинах печінки та в скелетних м'язах експресії Р-кадгеринових матричних РНК не виявлено. Таким чином, можна зробити висновок, що кожен представник кадгеринової родини, незважаючи на високий ступінь гомології первинної структури, має специфічний тканевий розподіл. На відміну від молекул клітинної адгезії імуноглобулінової родини, ми маємо справу з експресією декількох близько родинних генів і, як результат, появою протеїнів з високою гомологією первинної структури, а наявність декількох ізоформ для протеїнів кадгеринової родини нехарактерна. Щодо природи появи декількох мРНК, відповідних за синтез N-кадгеринового поліпептиду, то це можна пояснити різним ступенем поліаденилювання. Наявність однієї поліпептидної зони N-кадгеринового протеїну, що спостерігається за допомогою імуноблотінгу в препаратах різних тканин, свідчить на користь такого припущення.

Дослідження нейрональних молекул клітинної адгезії привернули особливу увагу при діагностиці нервово-психічних розладів. При цьому зафіксовані зміни не тільки в експресії самих адгезивних протеїнів, але й доведена можливість появи у сироватці хворих аутоантитіл до них. Показано, що молекула N-CAM1 грає певну роль в патологічних процесах пов'язаних з розвитком шизофренічної хвороби, - розширенні мозкових шлуночків, когнітивній дисфункції та інших [487]. В структурах гіпокампу при цьому захворюванні визначається зниження форми N-CAM1 [488], а в спино-

мозковій рідині визначається підвищений рівень деградованої форми цього протеїну [487]. Автори роботи вважають, що поява цієї форми протеїну пов'язана з протеолітичним розщепленням ізоформи N-CAM-180.

З іншого боку, за умов патології в сироватці хворих визначають аутоантитіла до нейрональних протеїнів [489]. За нормальних умов контакт нейроантигенів з імунокомпетентними клітинами практично відсутній, тому значної кількості аутоантитіл в сироватці не знаходять. За патологічних умов та при вікових змінах цілісність гематоенцефалічного бар'єру порушується і стає можливою поява аутоантитіл до нейрональних протеїнів. Ці аутоантитіла потрапляють до тканини мозку, поширюються в міжклітинному просторі й далі транспортуються аксональним током до структур мозку, інактивуючи нейроантигени. За таких умов нервова тканина зазнає значного ушкодження. Так, у дітей хворих на аутизм в сироватці визначалися аутоантитіла до основного протеїну мієліну [490]. Виявлення аутоантитіл до певних адгезивних протеїнів у сироватці людей з нервово-психічними розладами є важливим етапом в цьому напрямку [327]. В нашій роботі проведено дослідження метою яких було визначення наявності аутоантитіл до протеїну N-CAM1 у сироватці хворих з гострою формою шизофренії. В сироватці крові хворих з гострою формою шизофренії було виявлено аутоантитіла, що реагують з поліпептидами N-CAM1 з молекулярними масами 140 та 180 кДа, а в сироватці крові здорових людей ці аутоантитіла не визначаються.

Роль адгезивних протеїнів в процесі формування пам'яті активно досліджується з 90-х років минулого століття. В першу чергу це стосується протеїнів клітинної адгезії імуноглобулінового родини - N-CAM1 та L1. Але представники кадгерінового родини та інтегрини теж можуть бути залучені до процесів формування пам'яті. Вважають, що існують дві важливі біохімічні фази пов'язані з навчанням: рання фаза, протягом якої відбувається модифікація вже існуючих синапсів та пізня фаза, коли синтезуються протеїни *de novo* та формуються нові синапси. Показано, що інтегрини

залучені саме до другої фази [491]. В роботі було зроблено спробу виявити роль нейронального протеїну кадгерінового родини (N-кадгерину) в процесі формування навичу у щурів. Основою для цього була присутність цього протеїну в синаптичних мембранних фракціях мозку, а асоційований з цим кадгеріном бета-катенін є необхідним для консолідації пам'яті у тварин [359, 360]. Проте при використанні моделі формування умовного рефлексу пасивного уникнення не показано критичної ролі N-кадгерину в процесі навчання. В той же час показано, що процесі довгострокової потенціації на структурах гіпокампу цей протеїн залучається до процесів формування пам'яті [363]. Тож остаточний висновок стосовно ролі цього протеїну у процесах формування пам'яті може бути зроблений після серії додаткових експериментів.

Якщо адгезивні зв'язки, що утворені за допомогою класичних кадгеринів характеризуються гомофільністю, а адгезивні протеїни імуноглобулінової родини здатні утворювати контакти як гомофільного так і гетерофільного характеру, то адгезивні протеїни інтегринової родини характеризуються наявністю множинних адгезивних лігандів. В нашій роботі було розглянуто вплив плазміногену на ефективність міжклітинних контактів, що забезпечуються завдяки тромбоцитарним інтегринам, зокрема  $\alpha IIb\beta 3$ . Подібне дослідження значною мірою спричинено повідомленням про те, що плазміноген може розглядатися як адгезивний ліганд при утворенні зв'язку за типом клітина-матрикс [8]. Ми вирішили дослідити роль плазміногену у взаємодіях за типом клітина-клітина, що відбуваються за агрегації тромбоцитів.

Нами вперше показано, що Lys-форма плазміногену, яка характеризується відкритою конформацією, здатна ефективно пригнічувати агрегацію тромбоцитів, активованих ADP, тромбіном та колагеном, тоді як нативна форма зимогену (Glu-плазміноген) не виявляє антиагрегаційної дії за умов експерименту. Інгібувальний ефект Lys-плазміногену виявляється переважно на другій необоротній стадії агрегації, що обумовлена секрецією

адгезивних протеїнів з  $\alpha$ -гранул тромбоцитів (фібриногену, вітронектину, тромбоспондину) та формуванням адгезивних контактів за участі інтегрину  $\alpha\text{IIb}\beta 3$ . Проведені нами експерименти свідчать, що ефект Lys-плазміногену обумовлено зв'язком лізин-зв'язуючих кринглових структур молекули з протеїнами, асоційованими з поверхнею тромбоцитів. Lys-плазміноген не чинить інгібувального впливу на адгезивні контакти, що забезпечуються глікопротеїном GP Ib-IX-V та фактором фон Віллебранду.

Тому молекула плазміногену може виступати в ролі множинного ліганду для адгезивних молекул, які забезпечують ефективну інтегрин-залежну агрегацію тромбоцитів. Відомо що, під час активації тромбоцитів із альфа-гранул секретуються адгезивні протеїни (фібриноген, фактор фон Віллебранда, фібронектин і вітронектин), кожен з яких може утворювати зв'язок з плазміногеном. Роль фібриногену в цьому процесі вважається доведеною, але може відбуватися формування тромбу навіть за відсутності цього протеїну. Вважають, що це є наслідком дії таких адгезивних молекул, як фібронектин та вітронектин. Ми перевірили, як буде впливати екзогенний плазміноген на експонування вітронектину на поверхні активованих тромбоцитів. Нами показано, що додавання Lys-плазміногену до суспензії відмитих тромбоцитів з наступною активацією тромбіном підсилювало експонування вітронектину на тромбоцитарній поверхні та збільшувало кількість вітронектин-позитивних клітин порівняно з ізольованою стимуляцією агоністом. Glu-плазміноген не спричиняв впливу на експонування вітронектину в разі інтактних та активованих тромбоцитів. Отриманні результати дають можливість припустити, що Lys-плазміноген, який порівняно з Glu-плазміногеном виявляє більшу афінність до тромбоцитарної поверхні, внаслідок агоніст-індукованої активації може як утворювати зв'язки з поверхнею тромбоцитів, так і виступати в ролі матриці для адгезивних протеїнів, що вивільняються з альфа-гранул тромбоцитів.

Проведені дослідження ефектів плазміногену на процес експонування Р-селектину на поверхні тромбоцитів за їх активації тромбіном показали, що

обробка інтактних тромбоцитів Lys-плазміногеном з наступною активацією тромбіном призводить до зниження кількості Р-селектин-експонуючих тромбоцитів, а передінкубація інтактних тромбоцитів з Glu-плазміногеном достовірного впливу не чинила. На базі отриманих даних, можна припустити таку послідовність подій. Lys-плазміноген через взаємодію з рецепторами на поверхні тромбоцитів викликає порушення реконструкції актинових мікрофіламентів і, як наслідок, перешкоджає секреції  $\alpha$ -гранул тромбоцитів, що знаходить відображення у зниженому експонуванні Р-селектину на поверхні активованих тромбоцитів [492].

Ми припустили, що модулюючий ефект різних форм плазміногену, який ми спостерігали в разі процесів агрегації та секреції, знайде своє відображення на експонування фосфатидилсерину на поверхні активованих тромбоцитів. Взаємозв'язок між асоціацією плазміногену з клітинами та експонуванням фосфатидилсерину добре відомий в науковій літературі [493]. За умов апоптозу екзогенний Glu-плазміноген сприяв підвищенню експонуванню фосфатидилсерину на поверхні клітин культури моноцитів [469]. Отримані нами результати дозволяють зробити висновок, що Glu-плазміноген здатен виступати в ролі костимулятора агоніст-індукованого формування прокоагулянтної поверхні тромбоцита. Ефекти Lys-плазміногену спрямовані на міжклітинні взаємодії і не пов'язані з агоніст-індукованими проапоптичними змінами [494]. До того ж, нами було показано, що Glu- та Lys-форми плазміногену створюють різний вплив на метаболічну активність тромбоцитів та утворення ними активних форм кисню [495].

Отримані в нашій роботі дані створюють передумови щодо практичного застосування двох форм плазміногену в клінічній практиці. Аутологічний Lys-плазміноген, очищений з плазми пацієнтів, в комплексі зі стрептокіназою розглядався як засіб для видалення епіретинальної мембрани [496]. До того ж введення екзогенного Glu-плазміногену призводило до кращого заживлення ран при хронічному діабеті на моделях гризунів [497]. Відомо також, що у хворих на діабет другого типу тромбоцити мають



підвищену адгезивність до ендотелію порівняно зі здоровими донорами [498]. Тому Lys-плазміноген, здатний перешкоджати адгезивним контактам між тромбоцитами, може виявитись перспективним агентом для запобігання тромбозів у таких хворих.

## ВИСНОВКИ

Виявлено поліфункціональну роль адгезивних протеїнів у створенні міжклітинних контактів та їх диференційовану експресію в онтогенезі та за патологічних станів, причому рівень експресії мРНК нейронального адгезивного протеїну (NCAM1) істотно змінюється протягом постнатального розвитку організму і супроводжується змінами в альтернативному сплайсингу, в той час як кальцій-залежна адгезія при цьому істотно не змінюється. Встановлено, що ефективність селектинової та інтегринової адгезії в міжтромбоцитарних контактах залежить від Lys-плазміногену, компонента плазміноген/плазмінової системи.

1. Показано зниження рівня експресії мРНК NCAM1 у скелетних та серцевих м'язах під час постнатального розвитку і підвищення у старих тварин зі змінами в альтернативному сплайсингу, причому як на рівні мРНК, так і протеїну.
2. Встановлено, що у серцевих м'язах рівень експресії альтернативного сплайс-варіанту мРНК NCAM1, що містить додатковий екзон VASE, є високим, проте у скелетних м'язах він не виявляється, що свідчить про тканиноспецифічний характер такого сплайсингу, хоча деякі сплайс-варіанти виявлені в обох типах м'язів.
3. Показано високий рівень експресії мРНК кадгерину CDH2 в тканинах різного генезу (головний мозок, печінка, нирки, легені, серцеві та скелетні м'язи), в той час як експресія мРНК CDH1 виявлена лише у печінці, нирках та легенях, а CDH3 переважно в нирках та легенях.
4. Виявлено вплив мілімолярних концентрацій іонів кальцію на протеолітичну деградацію цитоплазматичного домену CDH2, а за відсутності кальцію відбувається деградація екстрацелюлярного домену.

5. Встановлено, що CDH2 безпосередньо незадіяний у формуванні умовного рефлексу пасивного уникнення, що є важливим для з'ясування молекулярних механізмів формування пам'яті.
6. Виявлено інгібувальний ефект Lys-плазміногену при формуванні міжтромбоцитарного адгезивного зв'язку, причому інгібувальна дія проензиму реалізується завдяки лізин-зв'язуючим сайтам його кринглових структур.
7. Показано, що Lys-плазміноген стимулює експонування вітронектину на поверхні активованих тромбоцитів шляхом утворення бівалентного зв'язку з поверхневим рецептором тромбоцитів та вітронектином, який вивільняється з альфа-гранул внаслідок тромбоцитарної активації.
8. Встановлено, що зв'язування Lys-плазміногену з поверхневим рецептором тромбоцитів супроводжується порушенням актинових мікрофіламентів та зниженням експонування Р-селектину на поверхні активованих клітин.
9. Показано, що Lys-плазміноген перешкоджає адгезивним взаємодіям між тромбоцитами і розглядається як потенційний агент, що запобігає надмірному тромбогенезу.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Rønn LCB, Berezin V., & Bock E. (2000). The neural cell adhesion molecule in synaptic plasticity and ageing. Rønn LCB, Berezin & V, Bock E. *Int J Dev. Neurosci.*, 18 (2-3), 193-199с.
2. Березин В. А. (1993). Экспрессия нейроспецифических белков клеточной адгезии (N-CAM) и промежуточных филаментов (ГФКБ) в перевиваемых крысиных глиомах В. А. Березин [и др.] *Функции нейроглии. Тбилиси: Мецниереба*, 259 – 265.
3. Farahani E., Patra H. K., Jangamreddy J. R., Rashedi I., Kawalec M., Rao Pariti R. K., Batakis P., & Wiechec E. (2014). Cell adhesion molecules and their relation to (cancer) cell stemness. *Carcinogenesis*. Farahani E, Patra HK, Jangamreddy JR, Rashedi I, Kawalec M, Rao Pariti RK, Batakis P, & Wiechec E., 35 (4), 747-759.
4. Жерносеков Д. Д. Экспрессия нейроспецифических белков клеточной адгезии при опухолевом росте. (2001). *Біологічний вісник ХНУ ім. В.Н. Каразіна. Физиология и биохимия животных*, 5 (1-2), 92-94.
5. Becker C. G., Artola A., Garardy-Schahn R., Becker T., Welzl H., & Schachner M. (1996). The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation. Becker C. G., Artola A., Garardy-Schahn R., Becker T., Welzl H. & Schachner M. *J. Neurosci.Res*, 45 (2), 143-152.
6. Vawter M. P., Usen N., Thatcher L., Ladenheim B., Zhang P., VanderPutten D. M., Conaut K., Herman M. M., van Kammen D. P., Sedvall G., Garver D. L., & Freed W. J. (2001). Characterization of human cleaved N-CAM and association with schizophrenia. *Exp. Neurol.* 2001, 172 (1): 29-46.

7. Талаева Т. В. (2001). Механизмы взаимодействия клеток крови и сосудистой стенки в реализации воспалительного и иммунного ответов. *Укр. Ревматологічний журнал.*, 3-4 (5-6), 45-52.
8. Lishko V. K., Novokhatny V. V., Yakubenko V. P., Skomorovska-Prokvolit H. V., & Ugarova T. P. (2004). Characterization of plasminogen as an adhesive ligand for integrins  $\alpha_M \beta_2$  (Mac-1) and  $\alpha_5 \beta_1$  (VLA-5). *Blood*, 104 (3), 719-726.
9. Жерносеков Д.Д. (2007). Роль адгезивних білків у процесі нормального і патологічного тромбоутворення. *Лабораторна діагностика*, 2(40), 72–75.
10. Сопин Е. О., & Жерносеков Д. Д. (2005). Влияние тяжелых металлов на функцию белков клеточной адгезии в тканях млекопитающих. *Вісник Луганського національного педагогічного університету*, 86(6), 143–149.
11. Paessens L.C., Singh S.K., Fernandes R.J., & van Kooyk Y. (2008). Vascular cell adhesion molecule-1 (V-CAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (I-CAM-1) provide co-stimulation in positive selection along with survival of selected thymocytes. *significance Mol. Immunol*, 45(1), 42-48.
12. Gonzales-Amaro R., Diaz-Gonzales F., & Sanchez-Madrid F. (1998). Adhesion molecules in inflammatory diseases. *Drugs*, 56( 6), 977-988.
13. Dalva M.B., McClelland A.C., & Kayser M.C. (2007). Cell adhesion molecules: signalling functions at the synapse. *Nat. Rev. Neurosci*, 8(3), 206-220.
14. Pecina-Slaus N. (2003). Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell Int*, 3(1), 17.
15. Moh M.C., & Shen S. (2009). The roles of cell adhesion molecules in tumor suppression and cell migration. *Cell Adhesion and Migration*, 3(4), 334-336.
16. Heidenreich F., Arendt G., Jander S., Jablonowski H., & Stoll G. (1994). Serum and a cerebrospinal fluid levels of soluble intercellular adhesion

- molecule 1 (s I CAM-1) in patients with HIV-1 associated neurological diseases. *J.Neuroimmunology*, 52(2), 117-126.
17. Homrich M., Gotthard I., Wokst H., & Diestel S. (2016). Cell adhesion molecules and ubiquitination-functions and significance. *Biology*, 5(1), 1-41.
  18. Brummendorf T., & Rathjen F.G. (1996). Structure/function relationships of axon-associated adhesion receptors of the immunoglobulin superfamily. *Curr. Opin. Neurobiol*, 6(5), 584-593.
  19. Woodfin A, Voisin MB, & Nourshargh S. (2007). PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *//Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27(12), 25 14-23.
  20. Buckley CD1, Doyonnas R, Newton JP, Blystone SD, Brown EJ, Watt SM, & Simmons DL. (1996). Identification of alpha v beta 3 as a heterotypic ligand for CD31/PECAM-1. *J Cell Sci*, 109 ( Pt 2),437-45.
  21. Piali L, Hammel P., Uherek C., Bachmann F., Gisler R. H., Dunon D., & Imhof B. A. (1995). CD31/PECAM-1 is a ligand for alpha v beta 3 integrin involved in adhesion of leukocytes to endothelium. *J Cell Biol*, 130(2), 451-60.
  22. Huang MT, Larbi KY, Scheiermann C, Woodfin A, Gerwin N, Haskard DO, & Nourshargh S. (2006). ICAM-2 mediates neutrophil transmigration in vivo: evidence for stimulus specificity and a role in PECAM-1-independent transmigration. *Blood*, 107(12),4721-7.
  23. Cao G, O'Brien CD, Zhou Z, Sanders SM, Greenbaum JN, Makrigiannakis A, & DeLisser HM. (2002). Involvement of human PECAM-1 in angiogenesis and in vitro endothelial cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol*, 282(5), 1181-90.
  24. Zhou Z, Christofidou-Solomidou M, Garlanda C, & DeLisser HM. (1999). Antibody against murine PECAM-1 inhibits tumor angiogenesis in mice. *Angiogenesis*, 3(2), 181-8.
  25. Yang L, Froio RM, Sciuto TE, Dvorak AM, Alon R, & Luscinskas FW. (2005). ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of

- TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. *Blood*, 106(2), 584-92.
26. Bella J, Kolatkar PR, Marlor CW, Greve JM, & Rossmann MG. (1998). The structure of the two amino-terminal domains of human ICAM-1 suggests how it functions as a rhinovirus receptor and as an LFA-1 integrin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(8), 4140-5.
  27. de Fougerolles AR, & Springer TA. (1992). Intercellular adhesion molecule 3, a third adhesion counter-receptor for lymphocyte function-associated molecule 1 on resting lymphocytes. *J Exp Med*, 175(1), 185-90.
  28. Grumet M. (1991). Cell adhesion molecules and their subgroups in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol*, 1(3), 370-376.
  29. Edelman G.M. (1987). CAMs and Igs: cell adhesion and evolutionary origins of immunity. *Immun. Rev*, 100(1), 11-45.
  30. Jorgensen O. S., & Bock E. (1974). Brain specific synaptosomal membrane proteins demonstrated by crossed immunoelectrophoresis. *J. Neurochem*, 23(4), 879-880.
  31. Rutishauser U., Thiery J.P., Brackenbury R., Sela B.A., & Edelman G.M. (1976). Mechanism of adhesion among cells from neural tissues of the chick embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73(2), 577-581.
  32. Doherty P., & Walsh F.S. (1991). The contrasting roles of N-CAM and N-cadherin as neurite out growth promoting molecules. *J. Cell. Sci.*, 15, 13-21.
  33. Small S. J., & Akeson R. (1990). Expression of the unique NCAM VASE exon is independently regulated in distinct tissues during development. *Journal of Cell Biology*, 111(5), 2089-2096.
  34. Vawter M.P., Frye M.A., Hemperly J.J., Vander Putten D.M., Usen N., Doherty P., Saffell J.L., Issa F., Post R.M., & Wyatt R.J. et al. (2000). Elevated concentration of N-CAM VASE isoforms in schizophrenia patients. *J. Psychiatr. Res*, 34(1), 25-34.
  35. Thompson J., Dickson G., Moore S.E., Glower H.J., Putt W., Kenimer J.G., Barton C.H., & Walsh F.S. (1989). Alternative splicing of the neural cell

- adhesion molecule gene generates variant extracellular domain structure in skeletal muscle and brain. *Genes Development*, 3(3), 348-357.
36. Suzuki M., Angata K., Nakayama J., & Fukuda M. (2003). Polysialic acid and mucin type O-glycans on the neural cell adhesion molecule differentially regulate myoblast fusion. *J. Biol. Chem*, 278(49), 49459-49468.
  37. Persohn E., Pollerberg G.E., & Schachner M. (1989). Immunoelectron-microscopic localization of the 180 kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM in postsynaptic membranes. *J. Comp. Neurol*, 288, 92–100.
  38. Dityatev A., Dityateva G., & Schachner M. (2000). Synaptic strength as a function of post- versus presynaptic expression of the neural cell adhesion molecule NCAM. *Neuron*, 26, 207–217.
  39. Noble M., Albrechtsen M., Muller C., Lyles J., Bock E., Goridis C., Watanabe M., & Rutishauser U. (1985). Glial cells express N-CAM/D2-CAM-like polypeptides in vitro. *Nature*, 316, 725–728.
  40. Andersson, A.M.; Olsen, M.; Zhernosekov, D.; Gaardsvoll, H.; Krog, L.; Linnemann, & D.; Bock, E. (1993). Age-related changes in expression of the neural cell adhesion molecule in skeletal muscle: A comparative study of newborn, adult and aged rats. *Biochem. J.*, 290, 641–648.
  41. Gaardsvoll H., Krog L., Zhernosekov D., Andersson A. M., Edvardsen K., Olsen, M., Bock E., & Linnemann D. (1993). Age-related changes in expression of neural cell adhesion molecule (NCAM) in heart: A comparative study of newborn, adult and aged rats. *Eur. J. Cell Biol.*, 61, 100–107.
  42. Langley, O.K., Aletsee-Ufrecht, M.C., Grant, N.J., & Gratzl, M. (1989). Expression of the neural cell adhesion molecule NCAM in endocrine cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 37, 781–791.
  43. Moller, C.J., Christgau, S., Williamson M.R., Madsen O. D., Niu Z. P., Bock E., & Baekkeskov S. (1992). Differential expression of neural cell adhesion molecule and cadherins in pancreatic islets, glucagonomas, and insulinomas. *Mol. Endocrinol.* 6, 1332–1342.



44. Lanier L. L., Le, A. M., Civin C. I., Loken M. R., Phillips J. H. (1986). The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol*, 136, 4480–4486.
45. Walmod P. S., Kolkova K., Berezin V., & Bock E. (2004). Zippers make signals: NCAM-mediated molecular interactions and signal transduction. *Neurochem. Res.*, 29, 2015–2035.
46. Kiselyov V. V., Soroka V., Berezin V., & Bock E. (2005). Structural biology of NCAM homophilic binding and activation of FGFR. *J. Neurochem*, 94, 1169–1179.
47. Soroka, V., Kiryushko D., Novitskaya V., Ronn L. C., Poulsen F.M., Holm A., Bock E., & Berezin V. (2002). Induction of neuronal differentiation by a peptide corresponding to the homophilic binding site of the second Ig module of the neural cell adhesion molecule. *J. Biol. Chem.*, 277, 24676–24683.
48. Horstkorte R., Schachner M., Magyar J. P., Vorherr T., & Schmitz B. (1993). The fourth immunoglobulin-like domain of NCAM contains a carbohydrate recognition domain for oligomannosidic glycans implicated in association with L1 and neurite outgrowth. *J. Cell Biol*, 121, 1409–1421.
49. Cavallaro U., Niedermeyer, J., Fuxa M., & Christofori G. (2001). N-CAM modulates tumour-cell adhesion to matrix by inducing FGF-receptor signalling. *Nat. Cell Biol.* 3, 650–657.
50. Francavilla C., Loeffler S., Piccini D., Kren A., Christofori G., Cavallaro U. (2007). Neural cell adhesion molecule regulates the cellular response to fibroblast growth factor. *J. Cell Sci.*, 120, 4388–4394.
51. Leshchyns'ka, I., Sytnyk, V., Morrow, J. S., Schachner M. (2003). Neural cell adhesion molecule (NCAM) association with PKC  $\beta$ 2 via  $\beta$ 1 spectrin is implicated in NCAM-mediated neurite outgrowth. *J. Cell Biol.*, 161, 625–639.
52. Kolkova K., Novitskaya V., Pedersen N., Berezin V., Bock E. (2000). Neural cell adhesion molecule-stimulated neurite outgrowth depends on activation of

- protein kinase C and the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Neurosci.*, 20, 2238–2246.
53. Buttner B., Kannicht C., Reutter W., & Horstkorte R. (2005). Novel cytosolic binding partners of the neural cell adhesion molecule: Mapping the binding domains of PLC $\gamma$ , LANP, TOAD-64, Syndapin, PP1, and PP2A. *Biochemistry*, 44(18), 6938–6947.
  54. Jessen U., Novitskaya V., Pedersen N., Serup P., Berezin V., & Bock E. (2001). The transcription factors CREB and c-Fos play key roles in NCAM-mediated neuritogenesis in PC12-E2 cells. *J. Neurochem.*, 79, 1149–1160.
  55. Schmid R. S., Graff R. D., Schaller M. D., Chen S., Schachner M., Hemperly J. J., Maness P. F. (1999). NCAM stimulates the Ras-MAPK pathway and CREB phosphorylation in neuronal cells. *J. Neurobiol.*, 38, 542–558.
  56. Niethammer P., Delling M., Sytnyk V., Dityatev A., Fukami K., & Schachner M. (2002). Cosignaling of NCAM via lipid rafts and the FGF receptor is required for neuritogenesis. *J. Cell Biol*, 157, 521–532.
  57. Angst B. D., Marcozzi C., Magee A. (2001). The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J. Cell Science*, 114(4), 629-641.
  58. Жерносеков Д.Д. (1998). Білки клітинної адгезії нервової тканини під час нормального розвитку та при патології. *Монографія, вид-во Дніпропетровського національного університету*, 80.
  59. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., & Walter P. (2015). Molecular biology of the cell. *Garland Science, New York*, 1464.
  60. Halbleib J. M., & Nelson W. J. (2006). Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis // *Genes and Development*, 20(23), 3199-3214.
  61. Shirayoshi Y., Hatta K., Hosoda M., Tsunasawa S., Sakigama F., & Takeichi M. (1986). Cadherin cell adhesion molecules with distinct binding specificities share a common structure. *Eur. Mol. Biol. Organ. J.* 5, 2485-2488.

62. Grunwald G. B. (1993). The structural and functional analysis of cadherin calcium-dependent cell adhesion molecules. *Curr. Opin. in Cell. Biol*, 5, 797-805.
63. Ciatto C., Bahna F., Zampieri N., van Steenhouse H. C., Katsamba P. S., Ahlsen G., Harrison O. J., Brasch J., Jin X., Posy S., Vendome J., Ranscht B., Jessel T.M., Honiq B., & Shapiro L. (2010). T-structures reveal a novel adhesive binding mechanism. *Nat. Struct. Mol. Biol*, 17(3), 339-47.
64. Suzuki S. C., & Takeichi M. (2008). Cadherins in neuronal morphogenesis and function. *Dev. Growth Differ*, 50(Suppl. S.), 119-130.
65. Byers S., Amaya E., Munro S., & Blachuk J. (1992). Fibroblast growth factor receptors contain a conserved HAV region common to cadherins and influenza strain A hemagglutinins: a role in protein-protein interactions? *Dev. Biol*, 152, 411-414.
66. Frank M., & Kemler R. (2002). Protocadherins. *Curr. Opin. Cell. Biol*, 14(5), 557-562.
67. Ringwald M., Schuh R., Vestweber D., Eistetter Y., Lottspreich F., Engel J., Dolg R., Jahnig F., Epplen J., Mayer S., Muller C., & Kemler R. (1987). The structure of cell adhesion molecule uvomorulin. Insights into the molecular mechanism of Ca<sup>2</sup>-dependent cell adhesion. *Eur. Mol. Biol. Organ. J.* 6, 3647-3653.
68. Shan W.S., Tanaka H., Phillips G.R., Arndt K., Yoshida M., Colman D.R., & Shapiro L. (2000). Functional cis-heterodimers of N- and R-cadherins. // *J. Cell. Biol*, 148(N), 579-590.
69. Brash J., Harrison O.J., Honig B., & Shapiro L. (2012). Thinking outside the cell: how cadherins drive adhesion. *Trends. Cell. Biol*, 22(6), 299-310.
70. Ranscht B., & Dours-Zimmerman M. T. (1991). T-cadherin, a novel cadherin cell adhesion molecule in the nervous system lacks the conserved cytoplasmic region, *Neuron*, 7, 391-402.

71. Napolitano E. W., Venstrom K., Wheeler E. F., & Reichardt L. F. (1991). Molecular cloning and characterization of B-cadherin, a novel chick cadherin. *J. Cell. Biol*, 113(4), 893-905.
72. Koch P. J., Goldschmidt M. D., Zimbelmann R., Troyanovsky R., & Franke W. W. (1992). Complexity and expression patterns of the desmosomal cadherins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 89, 353-357.
73. Geiger B., Volberg T., Ginsberg D., Bitzur S., Sabanay I., & Hynes R. O. (1990). Broad spectrum pan-cadherin antibodies reactive with C-terminal 24 amino acid residues of N-cadherin. *J. Cell. Sci*, 97, 607-614.
74. Takeichi M. (1991). Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*, 251(5000), 1451-5.
75. Aberle H., Butz S., Stappert J., Weissig H., Kemler R., (1994). Hoschuetzky H. Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J. Cell. Sci*, 107, 3655-3663.
76. Nagafuchi A., & Takeichi M. (1989). Transmembrane control of cadherin-mediated cell adhesion: a 94 kDa protein functionally associated with a specific region of the cytoplasmic domain of E-cadherin. *Cell. Regul*, 1, 37-44.
77. Ozawa M., Ringwald M., & Kemler R. (1990). Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 87, 4246-4250.
78. Stappert J., & Kemler R. (1993). Intracellular associations of adhesion molecules. *Curr. Opin. Neurobiol*, 3, 60-66.
79. Kemler R. (1992). Classical cadherins. *Semin. Cell. Biol*, 3, 149-155.
80. Rubinfeld B., Souza B., Albert I., Muller O., Chamberlain S. H., Masiarz F. R., Munemitsu S., & Polakis P. (1993). Association of the APC gene product with  $\beta$ -catenin. *Science*, 262, 1731-1734.
81. Shibamoto S., Hayakawa M., Takeuchi K., Hori T., Oku N., Miyazawa K., Kitamura N., Takeuchi M., & Ito F. (1994). Tyrosine phosphorylation of  $\beta$ -

- catenin and plakoglobin enhanced by hepatocyte growth factor and epidermal growth factor in human carcinoma cells. *Cell. Adhes. Commun*, 1, 295-305.
82. Ozawa M., Baribault H., & Kemler R. (1989). The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J*, 8, 1711-1717.
  83. Burridge K., Fath K., Kelley T., Nuckolls G., & Turner C. (1988). Focal adhesion-transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell. Biol*, 4, 487-525.
  84. Franke W. W., Goldschmidt M. D., Zimbelmann R., Mueller H. M., Schiller D. L., & Cowin P. (1989). Molecular cloning and amino acid sequence of human plakoglobin, the common junctional plaque protein. *Biochemistry*, 86, 4027-4031.
  85. Cowin P., Kapprell H.-P., Franke W. W., Tamkun J., & Hynes R. O. (1986). Plakoglobin: a protein common to different kinds of intercellular adhering junctions. *Cell*, 46, 1063-1073.
  86. Peifer M., McCrea P. D., Green K. J., Wieschaus E., & Gumbiner B. M. (1992). The vertebrate adhesive junction proteins  $\beta$ -catenin and plakoglobin and the Drosophila segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties. *J. Cell. Biol*, 3, 681-691.
  87. Piepenhagen P. A., & Nelson W. J. (1993). Defining E-cadherin-associated protein complexes in epithelial cells: plakoglobin,  $\beta$ -catenin and  $\gamma$ -catenin are distinct components. *J. Cell. Sci*, 104, 751-762.
  88. Bauer G. E., Balsamo J., & Lilien J. (1992). Cadherin-mediated adhesion in pancreatic islet cells is modulated by a cell surface N-acetyl galactosaminophosphotransferase. *J. Cell. Sci*, 103, 1235-1241.
  89. Meyer R. A., Laird D. W., Revel J. P., & Johnson R. G. (1992). Inhibition of gap junction and adherens junction assembly by connexin and A-CAM antibodies. *J. Cell. Biol*, 119, 179-189.

90. Bronner-Fraser M., Wolf J. J., & Murray B. A. (1992). Effects of antibodies against N-cadherin and N-CAM on the cranial neural crest and neural tube. *Dev. Biol*, 153, 291-301.
91. Shimamura K., & Takeichi M. (1992). Local and transient expression of E-cadherin involved in mouse embryonic brain morphogenesis // *Development*, 116, 1011-1019.
92. Shimamura K., Takahashi T., & Takeichi M. (1992). E-cadherin expression in a particular subset of sensory neurons. *Dev. Biol*, 152, 242-254.
93. Ivanov O.B., Philippova M.P., & Tkachuk V.A. (2001). Structure and functions of classical cadherins. *Biochemistry (Moscow)*, 66(10), 1174-1186.
94. Lagunowich L. A., Schneider J. C., Chasen S., & Grunwald G. B. (1992). Immunohistochemical and biochemical analysis of N-cadherin expression during CNS development. *J. Neurosci. Res*, 32, 202-208.
95. Lemmon V., Burden S. M. Payne H. R., Elmslie G. J., & Hlavin M. L. (1992). Neurite growth on different substrates: permissive versus instructive influences and the role of adhesive strength. *J. Neurosci*, 12(3), 816-826.
96. Saffell J. L., Walsh F. S., & Doherty P. (1992). Direct activation of second messenger pathways mimics cell adhesion molecule-dependent neurite outgrowth. *J. Cell. Biol*, 118, 663-670.
97. Paradies N. E., & Grunwald G. B. (1993). Purification and characterization of N-cad-90, a soluble endogenous form of N-cadherin, which is generated by proteolysis during retinal development and retains adhesive and neurite-promoting function. *J. Neurosci. Res*, 36, 33-45.
98. Doherty P., Aahnton S. V., Skaper S. D., Leon A., & Walsh F. S. Ganglioside modulation of neural cell adhesion molecule and N-cadherin-dependent neurite outgrowth. *J. Cell. Biol*, 117, 1093-1099.
99. Doherty P., Skaper S. D., Moore S. E., Leon A., & Walsh F. S. (1992). A developmentally regulated switch in neuronal responsiveness to N-CAM and N-cadherin in the rat hippocampus. *Development*, 115, 885-892.

100. Mege R. M., Goudon D., Diaz C., Nicolet M., Garcia L., Geraud G., & Rieger F. (1992). N-cadherin and N-CAM in myoblast fusion: compared localization and effect of blockade by peptides and antibodies. *J. Cell. Sci*, 103, 897-906.
101. Hahn C., & Covault J. (1992). Neural regulation of N-cadherin gene expression in developing and adult skeletal muscle. *J. Neurosci*, 12, 4677-4687.
102. Uchida N., Honjo Y., Johnson K. R., Wheelock M. J., & Takeichi M. (1996). The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *J. Cell Biol*, 135(3), 767-79.
103. Tanaka H., Shan W. S., Phillips G. R., Arndt K., Bozdagi O., Shapiro L., Huntley G. W., Benson D. L., & Colman D. R. (2000). Molecular modification of N-cadherin in response to synaptic activity. *Neuron*, 25(1), 93-107.
104. Hynes R.O. (1994). The impact of molecular biology on models for cell adhesion. *BioEssays*, 16(9), 663-669.
105. Жерносеков Д. Д., & Недзвецкий В. С. (1998). Взаємодія білків адгезії зі структурними складовими цитоскелета тваринних клітин. *Укр. Біохім. Журн.* 70(1), 3-15.
106. Kansas G.S. (1996). Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood*, 88(9), 3259-3287.
107. Ley K. (2003). The role of selectins in inflammation and disease. *TRENDS in Mol.Medicine*, 9(6), 263-268.
108. Zarbock A., Ley K., Mc Ever R.P., & Hidalgo A. (2011). Leucocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood*, 118(26), 6743-51.
109. Albelda S. M., Smith C. W., & Ward P. A. (1994). Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J.* Vol(8), 504-512.
110. Жерносеков Д. Д. (2007). Адгезивные белки в процессе воспаления. *Біополімери і клітина*, 23(6) 483-488.

111. Струкова С. М. (2004). Роль тромбоцитов и сериновых протеиназ в сопряжении свертывания крови и воспаления. *Биохимия*, 69(10), 1314-31.
112. Brenner B., Kadel S., Birle A., & Linderkamp O. (2001). L-selectin tyrosine phosphorylates cb 1 and induces association of tyrosine phosphorylated cb 1 with crk 1 and grh 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 282(N), 41-47.
113. Green C. E., Pearson D. N., Christensen N. B., & Simon S. I. (2003). Topographic requirement and dynamics of signaling via L-selectin on neutrophils. *Amer. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 284, 705-717.
114. Humby F., Manzo A., & Pitzalis C. (2006). Chemokines in arthritis: key molecules in pathogenesis and potential therapeutic targets. *Fut. Rheum*, 1, 53-66.
115. Lindner J. R., Song J., Christiansen J., Klibanov A. L., Xu F., & Ley K. (2001). Ultrasound assessment of inflammation and renal tissue injury with microbubbles targeted to P-selectin. *Circulation*, 104(17), 2107-12.
116. Merten M., & Thiagarajan P. (2000). P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates. *Circulation*, 102(16), 1931-36.
117. Сироткина О. В., Боганькова Н. А., Ласковец А. Б., Кухарчик Г. А., Гайковая Л. Б., & Вавилова Т. В. (2010). Иммунологические методы в оценке функциональной активности тромбоцитов у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями. // Мед. иммунология, 12(3), 213-18.
118. Hynes RO. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69, 11–25.
119. Hynes RO. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110, 673–687.
120. Faull RJ, Du X, & Ginsberg M. H. (1994). Receptors on platelets. *Methods Enzymol*, 245, 183–194.



121. Philippeaux M. M, Vesin C, Tacchini-Cottier F, & Piguet P. F. (1996). Activated human platelets express beta2 integrin. *Eur J Haematol*, 56, 130–137.
122. Springer TA. (2002). Predicted and experimental structures of integrins and beta-propellers. *Curr Opin Struct Biol*, 12, 802–813.
123. Springer T. A. (1997). Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin alpha-subunits into a beta-propeller domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 65–72.
124. Peter K, Schwarz M, & Conradt C, et al. (1999). Heparin inhibits ligand binding to the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *Circulation*, 100, 1533–1539.
125. Diamond M. S., Garcia-Aguilar J, Bickford J. K, Corbi A. L, & Springer T. A. (1993). The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands. *J. Cell Biol*, 120, 1031–1043.
126. Travis M. A., Humphries J. D., & Humphries M. J. (2003). An unraveling tale of how integrins are activated from within. *Trends Pharmacol Sci*, 24, 192–197.
127. Puzon-McLaughlin W, Kamata T, & Takada Y. (2000). Multiple discontinuous ligand-mimetic antibody binding sites define a ligand binding pocket in integrin alpha(IIb)beta(3). *J Biol Chem*, 275, 7795–7802.
128. Liu S, Calderwood D. A., & Ginsberg M. H. (2000). Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci*, 113, 3563–3571.
129. Roka-Moya Y. M., Bilous V. L., Zhernossekov D. D., & Grinenko T. V. (2014). Novel aspects of platelet aggregation. *Biopolymers and Cell*, 30(1), 10-15.
130. Versteeg H. H. (2013). New fundamentals in hemostasis. [et al.] *Physiological reviews*, 93(1), 327-358.
131. Tadokoro S. (2003). Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation [et al.] *Science*, 302(5642), 103–106.

132. Shattil S. J., Kim C., & Ginsberg M. H. (2010). The final steps of integrin activation: the end game. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(4), 288–300.
133. Law D., Nannizzi-Alaimo L., & Phillips D. (1996). Outside-in integrin signal transduction.  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-(GP IIb IIIa) tyrosine phosphorylation induced by platelet aggregation. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(18), 10811–10815.
134. Obergfell A. (2002). Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *The Journal of Cell Biology*, 157(2), 265–275.
135. Nieswandt B, & Watson S. P. (2003). Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood*, 102, 449–461.
136. Bennett J. S, Chan C, Vilaire G, Mousa S. A, & DeGrado W. F. (1997). Agonist-activated alpha v beta 3 on platelets and lymphocytes binds to the matrix protein osteopontin. *J Biol. Chem*, 272, 8137–8140.
137. Hindriks G, Ijsseldijk M. J., Sonnenberg A, Sixma J. J., & de Groot P. G. (1992). Platelet adhesion to laminin: role of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> ions, shear rate, and platelet-membrane glycoproteins. *Blood*, 79, 928–935.
138. Piguet P. F, Vesin C, & Rochat A. (2001). Beta2 integrin modulates platelet caspase activation and life span in mice. *Eur J Cell Biol*, 80, 171–177.
139. Wagner C. L., Mascelli M. A., Neblock D. S., Weisman H. F., Collier B. S., & Jordan R. E. (1996). Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood*, 88, 907–914.
140. Calvete J. J. (1999). Platelet Integrin GPIIb/IIIa: Structure-function correlations. An update and lessons from other integrins. *Proc Soc Exp Biol Med*, 222, 29–38.
141. Kamata T, & Takada Y. (2001). Platelet integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-ligand interactions: what can we learn from the structure? *Int J Hematol*, 74, 382–389.

142. Smith J. W, Ruggeri Z. M., & Kunicki T. J. (1990). Interaction of integrin alpha v beta 3 and glycoprotein IIbIIIa with fibrinogen. Differential peptide recognition accounts for distinct binding sites. *J. Biol. Chem.*, 265, 12267-12271.
143. Suehiro K, Mizuguchi J, Nishiyama K, Iwanaga S, Farrell D. H, & Ohtaki S. (2000). Fibrinogen binds to integrin alpha(5)beta(1) via the carboxyl-terminal RGD site of the Aalpha-chain. *J Biochem*, 128(4), 705-10.
144. Springer T. A., Zhu J., & Xiao T. (2008). Structural basis for distinctive recognition of fibrinogen by the platelet integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *J. Cell Biol*, 182, 791-800.
145. Marguerie G. A., Edgington T. S., & Plow E. F. (1980). Interaction of fibrinogen with its platelet receptor as a part of multistep reaction in ADP-induced platelet aggregation. *J.Biol.Chem*, 255, 154-161.
146. Torti M., Festetics E. T, Bertoni A, Sinigaglia F, & Balduini C. (1996). Agonist-induced actin polymerization is required for the irreversibility of platelet aggregation. *Thromb Haemost*, 76(3), 444-9.
147. Simmons S. R., & Albrecht R. M. (1996). Self-association of bound fibrinogen on platelet surfaces. *J Lab Clin Med*, 128(1), 39-50.
148. Andrieux A, Hudry-Clergeon G, & Ryckewaert J, (1989). Amino acid sequences in fibrinogen mediating its interaction with its platelet receptor, GPIIbIIIa. *J Biol. Chem*, 264, 9258–9265.
149. Liu Q, Matsueda G, Brown E, & Frojmovic M. (1997). The AGDV residues on the gamma chain carboxyl terminus of platelet-bound fibrinogen are needed for platelet aggregation. *Biochim Biophys Acta*, 1343, 316–326.
150. Timmons S., Bednarek M. A., Kloczewiak M., & Hawiger J. (1989). Antiplatelet "hybrid" peptides analogous to receptor recognition domains on gamma and alpha chains of human fibrinogen. *Biochemistry*, 28(7), 2919-23.
151. Ruggeri Z. M. (2001). Structure of von Willebrand factor and its function in platelet adhesion and thrombus formation. *Best Pract Res Clin Haematol*, 14(2), 257-79.

152. Bonnefoy A., & Hoylaerts M. F. (2008). Thrombospondin-1 in von Willebrand factor function. *Curr Drug Targets*, 9(10), 822-32.
153. Gao A. G., Lindberg F. P., Finn M. B., Blystone S. D., Brown E. J., & Frazier W. A. (1996). Integrin-associated protein is a receptor for the C-terminal domain of thrombospondin. *J Biol Chem*, 271(1), 21-4.
154. Sun X., Skorstengaard K., & Mosher D. F. (1992). Disulfides modulate RGD-inhibitable cell adhesive activity of thrombospondin. *J.Cell.Biol.*, 118 (3), 693-670.
155. Lawler J., & Hynes R. O. (1989). An integrin receptor on normal and thrombasthenic platelets that binds thrombospondin. *Blood.*, 74(6), 2022-2027.
156. Aiken M. L., Ginsberg M. H., & Plow E. F. (1986). Identification of a new class of inducible receptors on platelets. Thrombospondin interacts with platelets via a GPIIb-IIIa-independent mechanism. *J Clin Invest.*, 78(6), 1713–1716.
157. Xu J., & Mosher D. (2011). Fibronectin and other adhesive glycoproteins. In: Mecham, RP., editor. *The Extracellular Matrix: An Overview. Springer-Verlag*, 43-55.
158. Mosher D. F. (1975). Cross linking of cold insoluble globulin by fibrin stabilizing factor. *Journal of Biological Chemistry*, 250, 6614-6621.
159. Moretti F. A., Chauhan A. K., Iaconcig A, Porro F, Baralle F. E., & Muro A. F. (2007). A major fraction of fibronectin present in the extracellular matrix of tissues is plasma-derived. *J Biol Chem.*, 282(38), 28057-62.
160. Wang Y., Reheman A., Spring C. M., Kalantari J., Marshall A. H., Wolberg A. S., Gross P. L., Weitz J. I., Rand M. L., Mosher D. F., Freedman J., & Ni H. (2014). Plasma fibronectin supports hemostasis and regulates thrombosis. *J. Clin. Invest.*, 124(10), 4281-4293.
161. Yang H., Reheman A., Chen P., Zhu G., Hynes R. O., Freedman J., Wagner D. D., & Ni H. (2006). Fibrinogen and von Willebrand factor-independent

- platelet aggregation in vitro and in vivo. *J. Thromb. Haemost.*, 4(10), 2230-2237.
162. Preissner K. T., & Seiffert D. (1998). Role of vitronectin and its receptors in haemostasis and vascular remodeling. *Thromb. Res.*, 89(1), 1-21.
  163. Жерносеков Д. Д., & Золотарева Э. Н. (2011). Структурно-функциональная характеристика витронектина и его роль в системе гемостаза. *Biopolymers and Cell.*, 27(4), 258-263.
  164. Ekmekci H., Sonmez H., Ekmekci O. B., Ozturk Z., Domanic N., & Kokoglu E. (2002). Plasma vitronectin levels in patients with coronary atherosclerosis are increased and correlate with extent of disease. *J. Thrombosis and Thrombolysis*, 14(3), 221-225.
  165. Рока-Мойя Я. М., Жерносеков Д. Д., Кондратюк А. С., & Гриненко Т. В. (2013). Розробка та оптимізація методів визначення активності інгібітора активатора плазміногену 1-го типу в крові людини. *Укр. Біохім. Журн.*, 85(4), 111-118.
  166. Xu D., Baburaj K., Peterson C. B., & Xu Y. (2001). Model for three dimensional structure of vitronectin: predictions for the multi-domain protein from threading and docking. *Proteins*, 44(3), 312-20.
  167. Suzuki S., Oldberg A., Hayman E. G., Pierschbacher M. D., & Ruoslahti E. (1985). Complete amino acid sequence of human vitronectin deduced from cDNA. Similarity of cell attachment sites in vitronectin and fibronectin. *EMBOJ.*, 4(10), 2519-2524.
  168. Standker L., Enger A., Schulz-Knappe P., Wohn K. D., Germer M., Raida M., Forssmann W. G., & Preissner K. T. (1996). Structural and functional characterization of vitronectin derived RGD-containing peptides from human hemofiltrate. *Eur.J.Biochem*, 241(2), 557-563.
  169. Deng G., Royle G., Wang S., Crain K., & Loskutoff D. J. (1996). Structural and functional analysis of the plasminogen activator inhibitor-1 binding motif in the somatomedin B domain of vitronectin. *J.Biol. Chem.*, 271(22), 12716-23.

170. D'Souza S. E., Ginsberg M. H., & Plow E. F. (1991). Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif. *Trends Biochem.Sci.*, 16(7), 246-250.
171. Stefansson S., & Laurence D. A. (1996). The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha V beta 3 binding to vitronectin. *Nature*, 383(6599), 441-443.
172. Жерносеков Д. Д., Золотарева Э. Н., & Кондратюк А. С. (2010). Структурно-функциональные особенности ингибитора активатора плазминогена ПАИ-1. *Biopolymers and Cell.*, 26(5), 255-264.
173. Lang I. M., & Schleef R. R. (1996). Calcium-dependent stabilization of type 1 plasminogen activator inhibitor within platelet alpha-granules. *J.Biol. Chem.* 271(5), 2754-61.
174. Seiffert D., & Schleef R. R. (1996). Two functionally distinct pools of vitronectin (Vn) in the blood circulation: identification of a heparin-binding competent population of Vn within platelet alpha-granules. *Blood*, 88(2), 552-560.
175. Podor T. J., Singh D., Chindemi P., Foulon D. M., Mc Kelvie R., Weitz J. I., Austin R., Boudreau G., & Davies R. (2002). Vimentin exposed on activated platelets and platelet microparticles localizes vitronectin and plasminogen activator inhibitor complexes on their surface. *J.Biol. Chem.*, 277(9), 7529-39.
176. Seiffert D., & Loskutoff D. J. (1991). Evidence that type 1 plasminogen activator inhibitor binds to the somatomedin B domain of vitronectin. *J.Biol. Chem.*, 266(5), 2824-30.
177. Okumura Y., Kamikubo Y., Curriden S. A., Wang J., Kiwada T., Futaki S., Kitagawa K., & Loskutoff D. J. (2002). Kinetic analysis of the interaction between vitronectin and the urokinase receptor. *J.Biol. Chem.*, 277(11), 9395-9404.
178. De Boer H. C., Preissner K. T., Bouma B. N., & de Groot P. G. (1992). Binding of vitronectin-thrombin-antithrombin III complex to human endothelial cells is mediated by the heparin binding site of vitronectin. *J.Biol. Chem.*, 267(4), 2264-2268.

179. Liang O. D., Rosenblatt S., Chhvatat G. S., & Preissner K. T. (1997). Identification of novel heparin-binding domains in vitronectin. *FEBS Lett.*, 407(2), 169-172.
180. Roger M., Hogasen K., Solum N. O., Mollnes T. E., & Hovig T. (1993). Vitronectin inhibits blood platelet aggregation. *Platelets*, 4(4), 225-229.
181. Rehemian A., Gross P., Yang H., Chen P., Allen D., Leytin V., Freedman J., & Ni H. (2005). Vitronectin stabilizes thrombi and vessel occlusion but plays a dual role in platelet aggregation. *J.Thromb. Haemost.*, 3(5), 875-883.
182. Schwartz I., Seger D., & Shaltiel S. (1999). Vitronectin. *Int.J. Biochem. Cell. Biol.*, 31(5), 539-44.
183. Seiffert D. (1995). Evidence that conformational changes upon the transition of the native to the modified form of vitronectin are not limited to the heparin binding domain. *FEBS Lett.*, 368(1), 155-159.
184. Stockmann A., Hess S., Declerck P., Timpl R., & Preissner K. T. (1993). Multimeric vitronectin. Identification and characterization of conformation-dependent self-association of the adhesive protein. *J.Biol. Chem.*, 268(30), 874-882.
185. Bharadwaj A., Bydoun M., Holloway R., & Waisman D. (2013). Annexin A2 heterotetramer: structure and function. *Int.J.Mol.Sci.*, 14(3), 6259-6305.
186. Lizarbe M. A., Barrasa J. I., Olmo N., Gavilanes F., & Turnay J. (2013). Annexin-phospholipid interactions. Functional implications. *Int. J. Mol.Sci.*, 14(2), 2652-2683.
187. Ishitsuka R., Kojima K., Utsumi M., Ogawa H., & Matsumoto I. (1998). Glycosaminoglycan binding properties of annexins IV, V and VI. *J.Biol.Chem.*, 273(16), 9935-9941.
188. Kassam G., Manro A., Braat C. E., Louie P., Fitzpatrick S. L., & Waisman D. M. (1997). Characterization of the heparin binding properties of annexin II tetramer. *J.Biol.Chem.*, 272(1), 15093-15100.
189. Gerke V., Creutz C. E., & Moss S. E. (2005). Annexins: Linking Ca<sup>2+</sup> signaling to membrane dynamics. *Nat.Rev. Mol. Cell Biol.*, 6(6), 449-461.

190. Gerke V., & Moss S. E. (2002). Annexins: from structure to function. *Physiol.Rev.*, 82(2), 331-371.
191. Petrishchev N. N., Vasina L. V., & Lugovaya A. V. (2008). Content of soluble markers of apoptosis and circulating V annexin-connected apoptosistic cells in the blood of patients with acute coronary syndrome. *Vestnik St. Petersburg state university*, 2(1), 14-23.
192. Ueki H., Mizushina T., Laoharatchatathanin T., Terashima R., Nishimura Y., Rieanrakwong D., Yonezawa T., Kurusu S., Hasegawa Y., Brachvogel B., Poschl E., & Kawaminami M. (2012). Loss of maternal annexin A5 increases the likelihood of placental platelet thrombosis and foetal loss. *Sci.Reports.*, 2, 827.
193. Rescher U., & Gerke V. (2004). Annexins – unique membrane binding proteins with diverse functions. *J.Cell.Sci.*, 117(13), 2631-2639.
194. Gavins F. N., Yona S., Kamal A. M., Flower R. J., & Peretti M. (2003). Leukocyte antiadhesive actions of annexin 1: ALXR-and FPR-related anti-inflammatory mechanisms. *Blood*, 101(10), 4140-4147.
195. Lu C., Jiang Q., Hu M., Tan C., Yu H., & Hua Z. (2015). Preliminary biological evaluation of <sup>18</sup>F-FBEM-Cys-annexin V a novel apoptosis imaging agent. *Molecules*, 20(3), 4902-4914.
196. Mouton H., Parolo C., Aranda-Ramos A., Merkoci A., & Nogues C. (2015). Annexin V/quantum dot probes for multimodal apoptosis monitoring in living cells: improving bioanalysis using electrochemistry. *Nanoscale*, 7(9), 4097-4104.
197. Wang J., He L., Chen D., Pi Y., Zhou W., Xiong X., Ren Y., Lai Y., & Hua Z. (2015). Quantitative analysis of annexin V-membrane interaction by flow cytometry. *Eur.Biophys. J.*, 44(5), 325-336.
198. Jakubowska A., & Kilis-Pstrusinska K. (2015). Importance of annexin V in kidney diseases. *Postepy Hig. Med. Dow.*, 69, 153-157.
199. Schurgers L. J., Burgmaier M., Ueland T., Schutters K., Aakhus S., Hofstra L., Gullestad L., Aukrust P., Hellmich M., Narula J., & Reutelingsperger C.P.



- (2016). Circulating annexin A5 predicts mortality in patients with heart failure. *J.Intern.Med.*, 279(1), 89-97.
200. Romisch J., Schuler E., Bastian B., Burger T., Dunkel F. G., Schwinn A., Hartmann A. A., & Paques E. P. (1992). Annexins I to VI: quantitative determination in different human cell types in plasma after myocardial infarction. *Blood Coagul. Fibrinolysis.*, 3(1), 11-17.
  201. Peng B., Guo C., Guan H., Liu S., & Sun M. Z. (2014). Annexin A5 as a potential marker in tumors. *Clin.Chim.Acta.*, 427, 42-48.
  202. Rand M. L., Wang H., Pluthero F. G., Stafford A. R., Vaezzadeh N., Allison A. C., Kahr W. H. A., Weitz J. I., & Gross P. L. (2012). Diannexin, an annexin A5 homodimer, binds phosphatidylserine with high affinity and is a potent inhibitor of platelet-mediated events during thrombus formation. *J.Thromb. Haemost.*, 10(6), 1109-1119.
  203. Kennedy J. R. (2015). Attenuating a sickle cell crisis with annexin V. *Med.Hypothesis*, 84(5), 434-436.
  204. Wang J., Zhang Y., Liu X., Ma J., Liu P., Mu C., & Zhang G. (2014). Annexin A5 inhibits diffuse large B-cell lymphoma cell invasion and chemoresistance through phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Oncol.Rep.*, 32(6), 2557-2563.
  205. Simak J., Holada K., & Vostal J. G. (2002). Release of annexin A5-binding membrane microparticles from cultured human umbilical vein endothelial cells after treatment with camptothecin. *BMC Cell Biol.*, 3, 11.
  206. Dormann D., Clementson K. J., & Kehrel B. E. (2000). The GP Ib thrombin-binding site is essential for thrombin-induced platelet procoagulant activity. *Blood.*, 96(7), 2469-2478.
  207. Heemskerk J. W., Bevers E. M., & Lindhout T. (2002). Platelet activation and blood coagulation. *Thromb. Haemost.*, 88(2), 186-193.
  208. Ramstrom S., O'Neill S., Dunne E., & Kenny D. (2010). Annexin V binding to platelets is agonist, time and temperature dependent. *Platelets.*, 21(4), 289-296.

209. Tait J. F., & Gibson D. (1992). Phospholipid binding of annexin V: effects of calcium and membrane phosphatidylserine content. *Arch.Biochem. Biophys.*, 298(1), 187-191.
210. Sun J., Bird P., & Salem H. H. (1993). Interaction of annexin V and platelets: effects on platelet function and protein S binding. *Thromb.Res.*, 69(3), 289-296.
211. Zhernossekov D. D., Roka Moiiia Y. M., Tykhomyrov A. O., Guzyk M. M., & Grinenko T. V. (2017). Glu- and Lys-forms of plasminogen differentially affect phosphatidylserine exposure on the platelet surface. *Ukr. Biochem. J.*, 89, special issue, 103-111.
212. Jackson S. P., & Schoenwaelder S. M. (2010). Procoagulant platelets are they necrotic? *Blood.*, 116(12), 2011-2018.
213. Albanyan A. M., Harrison P., & Murphy M. F. (2009). Markers of platelet activation and apoptosis during storage and apheresis and buffy coat-derived platelet concentrates for 7 days. *Transfusion.*, 49(1), 108-17.
214. Gyulkhandanyan A. V, Multu A., Freedman J., & Leytin V. (2013). Selective triggering of platelet apoptosis, platelet activation or both. *Brit.J.Haematol.*, 161(2), 245-254.
215. Das R., & Plow E. F. (2011). Phosphatidylserine as an anchor for plasminogen and its plasminogen receptor, histone H2B, to the macrophage surface. *J.Thromb. Haemost.*, 9(2), 339-349.
216. Zhernossekov D. D., Roka-Moiiia Y. M., & Grinenko T. V. (2016). Extracellular annexins in hemostasis system. *Biopolymers and Cell.*, 32(2), 98-104.
217. Roka-Moiiia Y. M., Korsia V. V., Guzyk M. M., Tykhomyrov A. O., & Zhernossekov D. D. (2016). Plasminogen modulates exogenic annexin V binding to human platelets. In *“Modern aspects of Biochemistry and Biotechnology” Kyiv, Sanchenko*, 40.

218. Parry M. A., Zhang X. C., & Boke W. (2000). Molecular mechanisms of plasminogen activation: bacterial cofactors provide clues. *Trends Biochem. Sci.*, 25(2), 53-59.
219. Жерносеков Д. Д., Юсова Е. И., & Гриненко Т. В. (2012). Роль плазминоген/плазмина в функционировании клеток крови. *Укр. біохім. журн.*, 84(4), 5-19.
220. Lijnen H. R., van Hoef B., & Collen D. (1981). On the role of carbohydrate side chains of human plasminogen in its interaction with  $\alpha$ -2-antiplasmin. *Eur. J. Biochem.* 120(1), 149-154.
221. Ponting C. P., Cederholm-Williams S. A., & Marshall J. M. (1992). Plasminogen: a structural review. *Blood Coagulation and Fibrinolysis.*, 3(3), 605–614.
222. Petersen T. E. (1990). Characterization of the gene for human plasminogen, a key proenzyme in the fibrinolytic system. *The Journal of Biological Chemistry.*, 265(11), 6104–6111.
223. Law R. H. (2012). The X-ray crystal structure of full-length human plasminogen. *Cell Reports.*, 1(3), 185–190.
224. Xue Y., Bodin C., & Olsson K. (2012). Crystal structure of the native plasminogen reveals an activation-resistant compact conformation. X-ray crystal structure of full-length human plasminogen. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.*, 10(7), 1385–1396.
225. Miles L. A. Castellino F. J., & Gong Y. (2003). Critical role for conversion of Glu-plasminogen to Lys-plasminogen for optimal stimulation of plasminogen activation on cell surfaces. *Trends in Cardiovascular Medicine.*, 13(1), 21–30.
226. Hoylaerts M. (1982). Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *The Journal of Biological Chemistry.*, 257(6), 2912–2919.
227. Fears R., Hibbs M. J., & Smith R. A. (1985). Kinetic studies on the interaction of streptokinase and other plasminogen activators with plasminogen and fibrin. *Biochemical Journal.*, 229(5), 555–558.

228. Гриненко Т. В. (2002). Особливості взаємодії  $\alpha$ -2-антиплазміну з плазміногеном/плазміном. *Український біохімічний журнал.*, 74(6), 83–90.
229. Herren T., Swaisgood C., & Plow E. F. (2003). Regulation of plasminogen receptors. *Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library.*, 8. (D), 1–8.
230. Knudsen B. S. (1986). Binding of plasminogen to extracellular matrix. *The Journal of Biological Chemistry.*, 261(23), 10765–10771.
231. Kim P. Y. (2012). A high affinity interaction of plasminogen with fibrin is not essential for efficient activation by tissue plasminogen activator. *The Journal of Biological Chemistry.*, 287(7), 4652–4661.
232. Mathews I. I. (1996). Crystal structures of the recombinant kringle 1 domain of human plasminogen in complexes with the ligands  $\epsilon$ -aminocaproic acid and trans-4-(aminomethyl) cyclohexane-1-carboxylic acid. *Biochemistry.*, 35(8), 2567–2576.
233. Geiger J. H., & Cnudde S. E. (2004). What the structure of angiostatin may tell us about its mechanism of action. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.*, 2(1), 23–34.
234. Cristen M. T., Franc P., & Llinas M. (2010). Human plasminogen kringle 3: solution, structure, functional insights, phylogenetic landscape. *Biochemistry.*, 49(33), 7131–7150.
235. Law R. H., Abu-Ssaydeh D., & Whisstock J. C. (2013). New insights into the structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Current Opinion in Structural Biology.*, 23(6), 836–841.
236. Warejcka D. J., & Twining S. S. (2005). Specific conformation changes of plasminogen induced by chloride ions, 6-aminohexanoic acid and benzamidine, but not the overall openness of plasminogen regulate, production of biologically active angiostatins. *Biochemical Journal.*, 392, 703–712.

237. Madoiwa S. (1997). A battery of monoclonal antibodies that induce unique conformations to evolve cryptic but constitutive functions of plasminogen. *Journal of Biochemistry.*, 121(2), 278–287.
238. Wang X. (1998). Crystal structure of the catalytic domain of human plasmin complexed with streptokinase. *Science.*, 28(5383), 1662–1665.
239. Werb Z. (1997). ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell.*, 91(4), 439–442.
240. Ma J., Li C., Shao C., Gao G., & Yang X. (2012). Decreased K5 receptor expression in the retina, a potential pathogenic mechanism for diabetic retinopathy. *Mol. Vision.*, 18(2), 330–336.
241. Santos I. C. (2010). Angiostatic activity of human plasminogen fragments is highly dependent on glycosylation. *Cancer Science.*, 101(2), 453–459.
242. Miles L. A., & Plow E. F. (1985). Binding and activation of plasminogen on the platelet surface. *The Journal of Biological Chemistry.*, 260(7), 4303–4311.
243. Horne III M. K., Merryman P. K., & Cuillinane. (2005). Plasminogen interaction with platelets: the importance of carboxyterminal lysines. *Thrombosis Research.*, 116(6), 499–507.
244. George J. N., Lyons R. M., & Morgan R. K. (1980). Exposure of actin on the platelet surface after thrombin-induced secretion. *J. Clin. Invest.*, 66(1), 1–9.
245. Tykhomyrov A. A. (2014). Dynamics of thrombin-induced exposition of actin on the platelet surface. *Укр. біохім. журн.*, 86(5), 74–81.
246. Stack S, Gonzalez-Gronow M, & Pizzo S. V. (1990). Regulation of plasminogen activation by components of the extracellular matrix. *Biochemistry.*, 29(20), 4966–70.
247. Stack M. S., & Pizzo S. V. (1994). The effect of substituted laminin A chain-derived peptides on the conformation and activation kinetics of plasminogen. *Arch Biochem Biophys.*, 309(1), 117–22.
248. Yakubenko V. P., Lishko V. K., Lam S. C. T., & Ugarova T. P. (2002). A molecular basis for integrin  $\alpha M\beta 2$  in ligand binding promiscuity. *J Biol Chem.*, 277, 48635–48642.

249. Suehiro K, Gailit J, & Plow E. F. (1997). Fibrinogen is a ligand for integrin  $\alpha 5\beta 1$  on endothelial cells. *J. Biol Chem.*, 272, 5360-5366.
250. Podolnikova N. P., Yakubenko V. P., Volkov G. L., Plow E. F., & Ugarova T.P. (2003). Identification of a novel binding site for platelet integrins alpha IIb beta 3 (GPIIbIIIa) and alpha 5 beta 1 in the gamma C-domain of fibrinogen. *J Biol Chem.*, 278(34), 32251-8.
251. Tarui T. (2002). Plasmin-induced migration of endothelial cells: a potential target for the anti-angiogenic action of angiostatin. *The Journal of Biological Chemistry.*, 277(37), 33564–33570.
252. Adelman B., Rizk A., & Hanners E. (1988). Plasminogen interactions with platelets in plasma. *Blood.*, 72(5), 1530–1535.
253. Miles L. A. (1986). Plasminogen interacts with human platelets through two distinct mechanisms. *The Journal of Clinical Investigation.*, 77(6), 2001–2009.
254. Santoni M. J. (1989). Differential exon usage involving an unusual splicing mechanism generates at least eight types of NCAM cDNA in mouse brain. *The Journal of the European Molecular Biology Organization.*, 8(2), 385-392.
255. Dickson G. (1987). Human muscle neural cell adhesion molecule (N-CAM): identification of a muscle-specific sequence in the extracellular domain. *Cell.*, 25(7), 1119-1130.
256. Andersson A. M. (1990) Characterization of rat brain NCAM mRNA using DNA oligonucleotide probes. *FEBS Letters.*, 263, 385–388.
257. Miyatani S, Shimamura K., Hatta M., Nagafuchi A., Nose A., Matsunaga M., Hatta T., & Takeichi M. (1989). Neural cadherin: role in selective cell-cell adhesion. *Science.*, 245(4918), 631-635.
258. Nagafuchi A., Shirayoshi Y., Okazaki K., Yasuda K., & Takeichi M. (1987). Transformation of cell adhesion properties by exogenously introduced E-cadherin cDNA. *Nature.*, 329, 341-343.

259. Nose A., Nagafuchi A., & Takeichi M. (1987). Isolation of placental cadherin cDNA: identification of a novel gene family of cell adhesion molecules. *Eur. Mol. Biol. Org. J.*, 6, 3655-3661.
260. Devereux J., Haeberly P., & Smithies O. (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.*, 12, 3687-395.
261. Gozes I, Bodner M., Shaini Y., & Fridkin M. (1984). Detection of mRNAs containing regulatory peptide coding sequences using synthetic oligodeoxynucleotides. *J.Cell. Biochem.*, 26, 147-156.
262. Aviv H., & Leder P. (1972). Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad.Sci.USA.*, 69(6), 1408-1412.
263. Rasmussen S., Ramlau J., Axelsen N. H, & Bock E. (1982). Purification of the synaptic membrane glycoprotein D2 from brain. *Scand. J. Immun.*, 15, 179-185.
264. Neil J., & Barnstable C. J. (1990). Expression of the cell surface antigens RET-PE2 and N-CAM by rat retinal pigment epithelial cells during development and in tissue culture. *Exp.Eye.Res.*, 51(5), 573-583.
265. Haymerle H., Herz J., Bressan G. M., Frank R., & Stanley K. K. (1986). Efficient construction of c DNA libraries in plasmid expression vectors using an adaptor strategy. *Nucleic Acids Res.*, 14, 8615-
266. Doorbar J., Campbell D., Grand R. J. L., & Gallimore P. H. (1985). Identification of the human papilloma virus/1a gene products. *EMBO J.*, 5, 355-362
267. Harboe N. M. G., & Ingrid A. (1973). Immunization, isolation of immunoglobulins, estimation of antibody titre. // In Axelsen N.H., Kroll J., Weeke B. (eds.) A manual of quantitative immunoelectrophoresis. *Methods and Applications – Universitetsforlaget Oslo.*, 161-164.
268. Laemmli U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.*, 227(5259), 680-685.

269. Munsick R. A. (1984). Human fetal extremity lengths in the interval from 9 to 21 menstrual weeks of pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 149, 883-887.
270. Ibsen S., Berezin V., Norgaard-Pedersen B., & Bock E. (1983). Enzyme-linked immunosorbent assay of the D2 glycoprotein. *J. Neurochem.*, 41, 356-362.
271. Deutsch D. G., & Mertz E. T. (1970). Plasminogen: purification from human plasma by affinity chromatography. *Science.*, 170(3962), 1095-1096.
272. Paniel S., & Chalkey R. (1969). High resolution acrilamide gel electrophoresis of histones *Arch. Biochem. Biophys.*, 130(1-2), 337-346.
273. Robbins K. C., & Summaria L. (1976). Plasminogen and plasmin. *Methods in Enzymology.*, 45, 257-273.
274. Norrman B., Wallen P., & Randy M. (1985). Fibrinolysis mediated by plasminogen activator. Disclosure of a kinetic transition. *European Journal of Biochemistry.*, 149(1), 193-200.
275. March S. C., Parikh I., & Cuatrecasas P. A. (1974). A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. *Analytical Biochemistry.*, 60(1), 149-150.
276. Sottrup-Jensen L., & Davidson F. (1977). The primary structure of human plasminogen: isolation of two lysine-binding fragment and one "mini-plasminogen" (M.W. 38000) by elastase catalyzed specific limited proteolysis. *Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis. New-York: Raven Press*, 3, 191-209.
277. Новохатний В. В. (1985). *Исследование доменной организации молекулы плазминогена: дис. на соискание степени кандидата биол. наук: 03.00.03. Киев*, 111 с.
278. Novokhatny V. V., Kudinov S. A., & Privalov P. L. (1984). Domains in human plasminogen. *Journal of Molecular Biology.*, 179(2), 215-232.
279. Thewes T. (1987). Isolation, purification and <sup>1</sup>H-NMR characterization of a kringle 5 domain fragment from human plasminogen. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 912(2), 254-269.



280. Варецька Т. В., Лосева А., & Яценко В. (1961). Одержання фібриногену з плазми крові фракціонуванням сульфату натрію. *Український біохімічний журнал.*, 33, 657–666.
281. Mukherjee M., Sembhi K., & Kakkar V. V. (1996). Interference of an activity assay of tissue-type plasminogen activator in human plasma by endogenous factors. *Blood Coagul. Fibrinolysis.*, 7(4), 491-496.
282. Кондратюк А. С., Юсова О. І., & Гриненко Т. В. (2011). Визначення активності тканинного активатора плазміногену в плазмі крові. *Лаб. діагностика.*, 3(57), 3-9.
283. Неплох Е. Г. (1979). Определение концентрации тромбоцитов и времени фибринообразования на анализаторе агрегации тромбоцитов. *Новости медицинской техники.*, С. 33–34.
284. Gear A. R. L. (2001). Adenosine diphosphate strongly potentiates the ability of the chemokines MDC, TARC, and SDF-1 to stimulate platelet function. *Blood.*, 97(4), 937–945.
285. Зубовская Е. Т., & Светлицкая С. Г. (2010). Система гемостаза. Теоретические основы и методы исследования. *Минск: БГУФК*, 310 с.
286. Баркаган З. С., & Момот А. П. (2008). Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. *Ньюдиамед.*, 289 с.
287. Silvain J. (2011). Composition of coronary thrombus in acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology.*, 57(12), 1359–1367.
288. Díaz-Ricart M. (2000). Abnormal platelet cytoskeletal assembly in hemodialyzed patients results in deficient tyrosine phosphorylation signaling. *Kidney International.*, 57(5), 1905–1914.
289. Brunso L, Segura D., Monreal L., Escolar G., White J. G., & Diaz-Ricart M. (2010). The secretory mechanisms in equine platelets are independent of cytoskeletal polymerization and occur through membrane fusion. *Platelets.*, 21(8), 658-666.

290. Towbin H, Staehelin T., & Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 76(9), 4350-4354.
291. Hollender M., & Wolf D. (1983). *Nonparametric statistical methods*. Moscow: Finances and statistics.
292. Roka-Moya Y. M., Zhernossekov D. D., & Grinenko T. V. (2012). Plasminogen/plasmin influence on platelet aggregation. *Biopolym. Cell.*, 28(5), 352-356.
293. Kinlough-Rathbone R. L., Perry D. W., Rand M. L., & Packham M. A. (1997). Pretreatment of human platelets with plasmin inhibits responses to thrombin, but potentiates responses to low concentrations of aggregating agents, including the thrombin receptor activating peptide, SFLLRN. *Thromb. Haemost.*, 77(4), 741-747.
294. Тихомиров А. О., Жерносеков Д. Д., Рока-Мойя Я. М., Діордієва С. І., & Гриненко Т. В. (2015). Вплив Lys-плазміногену на секрецію тромбоцитів людини. *Фізіол. журн.*, 61(6), 26-34.
295. Fidzianska A., & Kaminska A. (1995). Neural cell adhesion molecule (N-CAM) as a marker of muscle tissue alternations. Review of the literature and own observations. *Folia Neuropathol.* 33(3), 125-8.
296. Cashman N. R, Covault J., Wollman R. L., & Sanes J. R. (1987). Neural cell adhesion molecule in normal, denervated, and myopathic human muscle. *Ann Neurol.*, 21(5), 481-9.
297. Chipman P. H., Franz C. K., Nelson A., Schachner M., & Rafuse V. F. (2010). Neural cell adhesion molecule is required for stability of reinnervated neuromuscular junctions. *Eur J Neurosci.*, 31(2), 238-49.
298. Rafuse V. F., Polo-Parada L., & Landmesser L. T. (2000). Structural and functional alterations of neuromuscular junctions in NCAM-deficient mice. *J Neurosci.*, 20(17), 6529-39.

299. Reyes A. A. Small S. J., & Akeson R. (1991). At least 27 alternatively spliced forms of the neural cell adhesion molecule mRNA are expressed during rat heart development. *Journal of Molecular Cell Biology.*, 11(3), 1654-1661.
300. Hamshire M., Dickson G., & Eperon I. (1991). The muscle specific domain of mouse N-CAM: structure and alternative splicing patterns. *Nucleic Acids Research.*, 19(11), 4709-4716.
301. Finne J., Finne U., Deagostini-Bazin H., & Goridis C. (1983). Occurrence of alpha 2-8 linked polysialosyl units in a neural cell adhesion molecule. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, 112(29), 482-487.
302. Linnemann D., Lyles J. M., & Bock E. (1985). A developmental study of the biosynthesis of the neural cell adhesion molecule. *Journal of Developmental Neuroscience.*, 7(4), 230-238
303. Krog L. (1992). Characterization of soluble neural cell adhesion molecule in rat brain, CSF, and plasma. *Journal of Neurochemistry.*, 59(3), 838-847.
304. Moore S. E. (1987). Skeletal muscle neural cell adhesion molecule (N-CAM): changes in protein and mRNA species during myogenesis of muscle cell lines. *Journal of Cell Biology.*, 105(3), 1377-1386.
305. Tassin A. M. (1991). Modulation of expression and cell surface distribution of N-CAM during myogenesis in vitro. *Neurochemistry International Journal.*, 18(1), 97-106.
306. He H. T., Finne J., & Goridis C. (1987). Biosynthesis, membrane association, and release of N-CAM-120, a phosphatidylinositol-linked form of the neural cell adhesion molecule. *Journal of Cell Biology.*, 105(6), 2489-2500.
307. Covault J., & Sanes J. R. (1986). Distribution of N-CAM in synaptic and extrasynaptic portions of developing and adult skeletal muscle. *Journal of Cell Biology.*, 102(3), 716-730.
308. Daniloff, J. K., Levi, G., Grumet, M., Rieger, F., & Edelman, G. M. (1986). Altered expression of neuronal cell adhesion molecules induced by nerve injury and repair. *J. Cell Biol.*, 103, 929-945.

309. Covault J., & Sanes J. R. (1985). Neural cell adhesion molecule (N-CAM) accumulates in denervated and paralyzed skeletal muscles. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.*, 82(13), 4544-4548.
310. Moore S. E., & Walsh F. S. (1986). Nerve dependent regulation of neural cell adhesion molecule expression in skeletal muscle. *Neuroscience.*, 18(2), 499-505.
311. Rieger F., Grumet M, & Edelman G. M. (1985). N-CAM at the vertebrate neuromuscular junction. *Journal of Cell Biology.*, 101(1), 285-293.
312. Wernig A., & Dorlochter M. (1989). Plasticity of the nerve muscle junction. In *Progress in Zoology. Fundamentals of Memory Formation: Neuronal Plasticity and Brain Function. Gustav Fischer, Stuttgart.*, 37, 83-99.
313. Ansved T., & Larsson L. (1989). Effects of ageing on enzyme-histochemical, morphometrical and contractile properties of the soleus muscle in the rat. *Journal of Developmental Neuroscience.*, 93(1), 105-124.
314. Caccia M. R., Harris J. B., & Johnson M. A. (1979). Morphology and physiology of skeletal muscle in aging rodents. *Muscle Nerve.*, 2(3), 202-212.
315. Edström L., & Larsson L. (1987). Effects of age on contractile and enzyme-histochemical properties of fast- and slow-twitch single motor units in the rat. *The Journal of Physiology.*, 392, 129-145.
316. Drahota Z., & Gutmann E. (1961). The influence of age on the course of reinnervation of muscle. *Gerontologia.*, 5, 88-109.
317. Kitzman D. W., & Edwards W. D. (1990). Age-related changes in the anatomy of the normal human heart. *J. Gerontol.*, 45, 33-39.
318. Anversa P., Hiler B., Ricci R., Guideri G., & Olivetti G. (1986). Myocyte cell loss and myocyte hypertrophy in the aging rat heart. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 8, 1441-1448.
319. Gordon L., Wharton J., Moore E. E., Flanigan T. P., Gulbenkian S., Walsh F. S., David-Ferreira J. F., Winter R. J. D., & Polak J. M. (1990). Expression of neural cell adhesion molecule immunoreactivity in hypertrophic myocardium. *Life Sci.*, 47, 601-609.

320. Pizzey J. A., Rowett L. H., Barton C. H., Dickson G., & Walsh F. S. (1989). Intercellular adhesion mediated by human muscle neural cell adhesion molecule: effects of alternative exon use. *J. Cell Biol.*, 109, 3465-3476.
321. Linnemann D., Gaardsvoll H., Olsen M., & Bock E. (1993). Expression of N-CAM mRNA and polypeptides in aging rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 11(1), 71-78.
322. Prediger E. A., Hoffman S., Edelman G. M., & Cunningham B. A. (1988). Four exons encode a 93-base-pair insert in three neural cell adhesion molecule mRNAs specific for chicken heart and skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85, 9616-9620.
323. Lakatta E. G., & Yin F. C. P. (1982). Myocardial aging: functional alterations and related cellular mechanisms. *Am. J. Physiol.*, 242(Heart Circ. Physiol. 11), H927-H941.
324. Mueser K. T., & McGurk S. R. (2004). Schizophrenia. *Lancet.*, 363(N), 2063-2072.
325. Selemon L. D., & Goldman-Rakis P. S. (1999). The reduced neuropil hypothesis: a circuit based model of schizophrenia. *Biological psychiatry.*, 45(N), 17-25.
326. Redies C, Hertel N, & Hübner C. A. (2012). Cadherins and neuropsychiatric disorders. *Brain Res.*, 1470, 130-44.
327. Honer W. G., Falkai P., Young C., Wang T., Xie J., Bonner J., & Buolianne G. L. (1997). Cingulate cortex synaptic terminal proteins and neural cell adhesion molecule in schizophrenia. *Exp. Neurol.*, 78(1), 99-110.
328. Спіріна І. Д., Фенева Я. Є., Бреславська Ю. М., Жерносеков Д.Д., & Недзвецький В. С. (1999). Наявність аутоантіл до нейроспецифічних білків у сироватці хворих з різними формами шизофренії. *Медичні перспективи*, 4(2), 46-47.
329. Недзвецький В. С., Жерносеков Д. Д., Кириченко С. В., Спіріна І. Д., & Фенева Я. Є. (2000). Ідентифікація аутоантитіл, які реагують з

цитоскелетними і мембранними білками при нервово-психічних розладах. *Вісник Дніпр. університету.*, 7, 246-250.

330. Недзвецкий В. С., Березин В. А., Оберняк Т. И., & Жмарева Е. Н. (1986). Характеристика бспецифических белков промежуточных филаментов в опухолях головного мозга человека. *Биохимия.*, 51(11), 1843-1850.
331. Mecocci P., Parnetti L., Romano G., Scarelli A., Chionne F., Cechetti R., Polidori M. C., & Palumbo B. (1995). Serum anti-GFAP and anti S-100 autoantibodies in brain aging, Alzheimer's disease and vascular dementia. *J of Neuroimmunol.*, 57(1), 165-170.
332. Todaro L., Puricelli L., Gioseffi H., Guadalupe Palotta M., Lastiri J., Bal de Kier J. E., Varela M., & Sacerdote de Lustig E. (2004). Neural cell adhesion molecule in human serum. Increased level in dementia of the Alzheimer type. *Neurobiol. Dis.*, 15, 387-393.
333. Hoffmann C., Zong S., Mane-Damas M., Molenaar P., Losen M., & Martinez-Martinez P. (2016). Autoantibodies in neuropsychiatric disorders. *Antibodies.*, 5(9), 1-28.
334. Zandi M. S. Irani S. R., Lang B., Waters P., Jones P. B., Mc Kenna P., Coles A. J., & Vincent A. (2011). Disease-relevant autoantibodies in first episode schizophrenia. *J of Neurology.*, 258(4), 686-688.
335. Miyatani S., Shimamura K., Hatta M., Nagafuchi A., Nose A., Matsunaga M., Hatta K., & Takeichi M. (1989). Neural cadherin: role in selective cell-cell adhesion. *Science.*, 245, 631-635.
336. Dalseg A. M., Andersson A-M., & Bock E. (1990). Characterization of N-cadherin m RNA in chicken brain and heart by means of oligonucleotide probes. *Lett.*, 262, 234-236.
337. Liaw C. W., Cannon C., Power M. D., Kiboneka P. K., & Rubin L. L. (1990). Identification and cloning of two species of cadherins in bovine endothelial cells. *Eur. molec. Biol. Org. J.*, 9, 2701-2708.
338. Linnemann D., Gaardsvoll H., Dalseg A-M., Zhernosekov D., Lundgren T., Edvardsen K., & Bock E. (1994). Characterization of N-cadherin messenger

- RNA and polypeptide expression in rat. *Int. J. Devl. Neuroscience.*, 12(5), 441-450.
339. Inuzuka H., Miyatani S., & Takeichi M. (1991). R-cadherin: a novel  $\text{Ca}^{2+}$  - dependent cell-cell adhesion molecule expressing in retina. *Neuron.*, 7, 69-79.
  340. Covault J., Liu Q. Y., & El D. S. (1991). Calcium-activated proteolysis of intracellular domains in the cell adhesion molecules N-CAM and N-cadherin. *Molec. Brain Res.*, 11, 11-16.
  341. Konze S. A., van Diepen L., Schroder A., Olmer R., Moller H., Pich A., Weißmann R., Kuss A. W., Zweigerdt R., & Buettner F. F. (2014). Cleavage of E-cadherin and  $\beta$ -catenin by calpain affects Wnt signaling and spheroid formation in suspension cultures of human pluripotent stem cells. *Molec. Cell. Proteomics.*, 13(4), 990-1007.
  342. Reiss K., Maretzky T., Ludwig A., Tousseyn T., de Strooper B., Hartmann D., & Saftig P. (2005). Adam 10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signaling. *EMBO J.*, 24(4), 742-752.
  343. Jang Y-N., Jung Y-S., Lee S. H., Moon C-H., Kim C-H., & Baik E. J. (2009). Calpain-mediated N-cadherin proteolytic processing in brain injury. *J. Neurosci.*, 29(18), 5974-5984.
  344. Teitelman G., & Lee G. K. (1987). Cell lineage analysis of pancreatic islet cell development; glucagon and insulin cells arise from catecholaminergic precursor present in the pancreatic duct. *Dev. Biol.*, 121, 454-466.
  345. Sheppard M. N., Marango P. J., Bloom S. R., & Polak J. M. (1984). Neuron specific enolase: a marker for the early development of nerves and endocrine cells in the human lung. *Life. Sci.*, 34(3), 454-466.
  346. Жерносеков Д. Д., Гайдар Ю. А., Тихомиров А. Е., Колесниченко В. С., & Черная В. И. (1995). Иммуногистохимическое изучение N-кадгерина в ткани развивающейся поджелудочной железы. *Современные тенденции в развитии медицины и здравоохранения. Днепрпетровский государственный университет., Днепрпетровск*, 67-68.

347. Жерносеков Д. Д. (1998). Білки клітинної адгезії нервової тканини під час нормального розвитку та при патології. *Монографія, вид-во Дніпропетровського національного університету*, 80 С.
348. Gaidar Y. A., Lepekhin E. A., Sheichetova G. A., & Witt M. (1998). Distribution of N-cadherin and N-CAM in neurons and endocrine cells of the human embryonic and fetal gastroenteropancreatic system. *Acta Histochemica.*, 100, 83-97.
349. Johansson J. K., Voss U., Kesavan G., Kostetskii I., Wierup N., Radice G. L., & Semb H. (2010). N-cadherin is dispensable for pancreas development but required for beta-cells granule turnover. *Genesis.*, 48(6), 374-381.
350. Nakajima S., Doi R., Toyoda E., Tsuji S., Wada M., Koizumi M., Tulachan S. S., Ito D., Kami K., Mori T., Kawaguchi Y., Fujimoto K., Hosotani R., & Imamura M. (2004). N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma. *Clin.Cancer. Res.*, 10(12 Pt 1), 4125-4133.
351. Marambaud P., Wen P. H., Dutt A., Shioi J., Takashima A., Siman R., & Robakis N. K. (2003). A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations. *Cell*, 114, 635-645.
352. Uemura K, Kihara T., Kuzuya A., Okawa K., Nishimoto T., Ninomiya H., Sugimoto H., Kinoshita A., & Shimohama S. (2006). Characterization of sequential N-cadherin cleavage by ADAM-10 and PS1. *Neurosci Lett.*, 402(3), 278-283.
353. Rami A. (2003). Ischemic neuronal death in the rat hippocampus; the calpain calpastatin-caspase hypothesis. *Neurobiol Dis.*, 13, 75-88.
354. Suzuki K., Sorimachi H. A novel aspect of calpain activation. *FEBS Lett.*, 433(1-2), 1-4.
355. Huang Y., & Wang K. K. (2001). The calpain family and human disease. *Trends Mol. Med.*, 7(8), 355-362.
356. Жерносеков Д. Д. (1999). Структурно-функціональні особливості нейроспецифічних адгезивних білків



- иммуноглобулинового сімейства. *Биополимеры и клетка.*, 15(62), 143 – 147.
357. Жерносеков Д. Д. (2002). Действие стрессовых факторов на процесс обучения животных. *Вісник Луганського національного педагогічного університету.*, 51(7), 58–62.
358. Жерносеков Д. Д. (2000). Нейроспецифічні білки та пам'ять. *Нейрофизиология*, 32(5), 397-402.
359. Bruses J. L. (2006). N-cadherin signaling in synapse formation and neuronal physiology. *Mol. Neurobiol.*, 33(3), 237-252.
360. Maguschak K. A., & Ressler K. J. (2008). Beta-catenin is required for memory consolidation. *Nat. Neurosci.*, 11(11), 1319-1326.
361. Жерносеков Д. Д., & Неруш П. А. (2000). Роль белков клеточной адгезии N-CAM и N-кадгерина при выработке реакции избегания у крыс. *Нейрофизиология*, 32(6), 421-423.
362. Bures I., Petran M., & Zachar I. (1967). Electrophysiological methods in biological research. *Academia, Prague.*, 653-731.
363. Bozdagi O., Shan W., Tanaka H., Benson D. L., & Huntley G. W. (2000). Increasing numbers of synaptic puncta during late-phase LTP: N-cadherin is synthesized, recruited to synaptic sites, and required for potentiation. *Neuron.*, 28(1), 245-259.
364. Рока-Мойя Я., Жерносеков Д., Золотарьова Е., & Гриненко Т. (2011). Вплив екзогенного Ліз-плазміногену на АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів. *Вісник КНУ ім. Т. Шевченка.*, Біологія(58), 34–46.
365. Rand M. L., Sangrar W., Hancock M. A., Taylor D. M., Marcovina S. M., Packham M. A., & Koschinsky M. L. (1998). Apolipoprotein (a) enhances platelet responses to the thrombin receptor-activating peptide SFLLRN. *Thromb. Vasc. Biol.*, 18, 1393-1399.

366. Lezhen T. I., Kudinov S. A., & Medved' L. V. (1986). Plasminogen binding site of the thermostable region of fibrinogen fragment D. *FEBS Lett.*, 197(1-2), 59-62.
367. Lucas M. A., Fretto L. J., & McKee P. A. (1983). The binding of human plasminogen to fibrin and fibrinogen. *Journal of Biological Chemistry.*, 258(7), 4249–4256.
368. Y. Gong. (2001). Conversion of Glu-plasminogen to Lys-plasminogen is necessary for optimal stimulation of plasminogen activation on the endothelial cell surface. *Journal of Biological Chemistry.*, 276(22), 19078–19083
369. Holvoet P., Lijnen H. R., & Collen D. (1985). A monoclonal antibody specific for Lys-plasminogen. Application to the study of the activation pathways of plasminogen in vivo. *Journal of Biological Chemistry.*, 260(22), 12106–12111.
370. Silverstein R. L. (1988). Binding of Lys-plasminogen to monocytes/macrophages. *The Journal of Clinical Investigation.*, 85(2), 1948–1955.
371. Hajjar K. A., & Nachman R. L. (1988). Endothelial cell-mediated conversion of Glu-plasminogen to Lys-plasminogen. Further evidence for assembly of the fibrinolytic system on the endothelial cell surface. *The Journal of Clinical Investigation.*, 82(5), 1769–1778.
372. Юсова Е. И., Савчук О. В., & Рыбачук В. Н. (2016). Превращение Glu-плазминогена в Lys-плазминоген на поверхности тромбоцитов. // *Сборник научн.статей «Современные проблемы биохимии»*, 105-111.
373. Рока-Мойя Я. М., Жерносеков Д. Д., & Гриненко Т. В. (2012). Вплив плазміногену/плазміну на агрегаційну здатність тромбоцитів. *Biopolimers and Cell.*, 28(5), 352–356.
374. Schafer A. I., Maas A. K., Ware J. A., Johnson P. C., Rittenhouse S. E., & Salzman W. (1986). Platelet protein phosphorylation, elevation of cytosolic

- calcium, and inositol phospholipid breakdown in platelet activation induced by plasmin. *J.Clin. Invest.*, 78(1), 73-79.
375. Schafer A. I., & Adelman B. (1985). Plasmin inhibition of platelet function and of arachidonic acid metabolism. *J.Clin. Invest.*, 75(2), 456-461.
  376. Ervin A. L., & Peerschke E. I. (2001). Platelet activation by sustained exposure to low-dose plasmin. *Blood Coagul.Fibrinolysis.*, 12(6), 415-425.
  377. Quinton T. M., Kim S., Derian C. K., Jin J., & Kunapuli S. P. (2004). Plasmin-mediated activation of platelets occurs by cleavage of protease-activated receptor 4. *J.Biol. Chem.*, 279(18), 18434-18439.
  378. Gouin I., Lecompte T., Morel M-C., Lebrazi J., Modderman P. W., Kaplan C., & Meyer-Samama M. (1992). In vitro effect of plasmin on human platelet function in plasma. Inhibition of aggregation caused by fibrinogenolysis. *Circulation.*, 85(3), 935-941.
  379. Watabe A., Ohta M., Matsuyama N., Mizuno K., el Borai N., Tanimoto T., Kawanishi T., & Hayakawa T. (1997). Characterization of plasmin-induced platelet aggregation. *Res.Commun.Mol.Pathol.Pharmacol.*, 96(3), 341-352.
  380. Lu H., Soria C., Li H., Soria J., Lijnen H. R., Perrot J. Y., & Caen J. P. (1991). Role of active center and lysine binding sites of plasmin in plasmin-induced platelet activation and disaggregation. *Thromb.Haemost.*, 65(1), 67-72.
  381. Pasche B. (1994). Structural changes in platelet glycoprotein IIb/IIIa by plasmin: determinants and functional consequences. *Blood.*, 83(2), 404-414.
  382. Takada Y. (2012). Potential role of kringle-integrin interaction in plasmin and uPA actions (a hypothesis). *Journal of Biomedicine and Biotechnology.*, 2012, 8.
  383. Rabhi-Sabile S., & Pidard D. (1995). Exposure of human platelets to plasmin results in the expression of irreversibly active fibrinogen receptors. *Thromb. Haemost.*, 73(4), 693-701.
  384. Kost C., Benner K., Stockmann A, Linder D., & Preissner K. T. (1996). Limited plasmin proteolysis of vitronectin. Characterization of the adhesion

- protein as morpho-regulatory and angiostatin-binding factor. *Eur. J. Biochem.*, 236, 682-688.
385. Hotte S. J., Winquist E. W., Stitt L., Wilson S., & Chambers A. F. (2002). Plasma osteopontin. Associations with survival and metastasis to bone in men with hormone-refractory prostate carcinoma. *Cancer.*, 95(3), 506-512.
386. Mazzone A., Parri M. S., Giannesi D., Ravani M., Vagnetti M., Altieri P., Casalino L., Maltinti M., Balbi M., Barsotti A., & Berti S. (2011). Osteopontin plasma levels and accelerated atherosclerosis in patients with CAD undergoing PCI: a prospective clinical study. *Coron. Arter. Dis.*, 22(3), 179-187.
387. Miles L. A. Dahlberg C. M., & Plow E. F. (1988). The cell-binding domains of plasminogen and their function in plasma. *Journal of Biological Chemistry.*, 263(24), 11928–11934.
388. O'Reilly M. S. (1994). Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell.*, 79(2), 315–328.
389. Cao Y. (1996). Kringle domains of human angiostatin. Characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry.*, 271(46), 29461–29467.
390. Cao R. (1999). Suppression of angiogenesis and tumor growth by the inhibitor K1-5 generated by plasmin-mediated proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.*, 96(10), 5728–5733.
391. Radziwon-Balicka A., Moncada de la Rosa C., & Jurasz P. (2012). Platelet-associated angiogenesis regulating factors: a pharmacological perspective. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 90, 679-688.
392. Weidong-Richard J. I. (1998). Characterization of kringle domains of angiostatin as antagonists of endothelial cell migration, an important process in angiogenesis. *FASEB Journal.*, 12(15), 1731–1738.

393. Benelli R. (2002). Neutrophils as a key cellular target for angiostatin: implications for regulation of angiogenesis and inflammation. *FASEB Journal.*, 16(2), 267–269.
394. Perri S. R. (2005). Plasminogen kringle 5–engineered glioma cells block migration of tumor-associated macrophages and suppress tumor vascularization and progression. *Cancer Research.*, 65(18), 8359–8365.
395. Italiano J. E., Richardson J. L., Patel-Hett S., Battinelli E., Zaslavsky A., Short S., Ryeom S., Folkman J., & Klement G. L. (2008). Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood.*, 111(3), 1227–33.
396. Jurasz P. (2006). Generation of platelet angiostatin mediated by urokinase plasminogen activator: effects on angiogenesis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.*, 4(5), 1095–1106.
397. Roka-Moya Y. M., Kapustianenko L. G., Zhernossekov D. D., Yusova E. I., & Grinenko T. V. (2013). Plasminogen kringle 5 abolishes the inhibitory effect of Lys-plasminogen on platelet aggregation. *IX Jakub K. Parnas Conference «Proteins from birth to death», Jerusalem, Israel, 29 September – 2 October 2013: Program&Abstract Book*, 65- 94.
398. Білоус В. Л. Рока-Мойя Я. М., Жерносеков Д. Д., Юсова О. І., Капустяненко Л. Г., & Гриненко Т. В. (2013). Вплив плазміногену та його фрагментів на агрегаційну здатність тромбоцитів. *«Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології»: 2-га Міжнародна наукова конференція, м. Дніпропетровськ, Україна, 24-25 вересня 2013: Матеріали конференції.*, 76.
399. Рока-Мойя Я. М. (2014). Роль доменів плазміногену в забезпеченні інгібування Lys-плазміногеном агрегації тромбоцитів. *Матеріали XI Українського біохімічного конгресу Київ.*, 76.
400. Roka-Moya Y. M., Zhernossekov D. D., Yusova E. I., Kapustianenko L. G., & Grinenko T. V. (2014). The study of the sites of plasminogen molecule

which are responsible for inhibitory effect of Lys-plasminogen on platelet aggregation. *Ukrainian Biochemical Journal.*, 86(5), 80–87.

401. Bonnefoy A. (2001). A Model of Platelet Aggregation Involving Multiple Interactions of Thrombospondin-1, Fibrinogen, and GPIIbIIIa Receptor. *The Journal of Biological Chemistry.*, 276(8), 5605–5612.
402. De Poli P. (1989). Thrombospondin interaction with plasminogen. Evidence for binding to a specific region of the kringle structure of plasminogen. *Blood.*, 73(4), 976–982.
403. Lishko K. (2013). A novel mechanism controlling the growth of hemostatic thrombi. *Ukrainian Biochemical Journal.*, 85(6), 94–105.
404. Tarui T., Miles L. A., & Takada Y. (2001). Specific interaction of angiostatin with integrin  $\alpha v \beta 3$  in endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry.*, 276(43), 39562–39568.
405. Majumdar M. (2004). Plasmin-induced migration requires signaling through protease-activated receptor 1 and integrin  $\alpha 9 \beta 1$ . *Journal of Biological Chemistry.*, 279(36), 37528–37534.
406. Edelberg J. M., & Pizzo S. V. (1990). Kinetic analysis of the effects of heparin and lipoproteins on tissue plasminogen activator mediated plasminogen activation. *Biochem.*, 29(25), 5906-5911.
407. Andrade-Gordon P., & Strickland S. (1986). Interaction of heparin with plasminogen activators and plasminogen: effects on the activation of plasminogen. *Biochem.*, 25(14), 4033-4040.
408. Paques E. P., Stohr H. A., & Heimbürger N. (1986). Study on the mechanism of action of heparin and related substances on the fibrinolytic system: relationship between plasminogen activators and heparin. *Thromb. Res.*, 42(6), 797-807.
409. Kawamura H., Watanabe I., Urano T., Takada Y. & Takada A. (1991). The effects of polysaccharides on plasminogen activation by single chain- and two chain-tissue plasminogen activator. *Thromb. Res.*, 62(5), 481-490.

410. Edelberg J. M., Weissler M., & Pizzo S. V. (1991). Kinetic analysis of the effects of glycosaminoglycans and lipoproteins on urokinase-mediated plasminogen activation. *Biochem.J.*, 276(3), 785-791.
411. Liang J. F., Li Y., & Yang V. C. (2000). The potential mechanism for the effect of heparin on tissue plasminogen activator-mediated plasminogen activation. *Thromb. Res.*, 97(5), 349-358.
412. Rijken D. C., de Munk G. A., & Jie A. F. (1993). Interaction of plasminogen activators and plasminogen with heparin: effect of ionic strength. *Thromb. Haemost.*, 70(5), 867-872.
413. Guinn L., Johnson J., & Doctor V. M. (2003). Ionic modulation of the effects of heparin and 6-aminohexanoic acid on plasminogen activation by streptokinase: The role of ionic strength, divalent cations and chloride. *Eur. J. Drug metabolism and pharmacokinetics.*, 8(2), 161-166.
414. Andrade-Gordon P., & Strickland S. (1989). Anticoagulant low molecular weight heparin does not enhance the activation of plasminogen by tissue plasminogen activator. *J. Biol. Chem.*, 264(26), 15177-15181.
415. Fujimura Y., Titani K., Holland L. Z., Roberts J. R., Kostel P., Ruggeri Z. M., & Zimmerman T. S. (1987). A heparin-binding domain of human von Willebrand factor: characterization and localization to a tryptic fragment extending from amino acid residue Val 449 to Lys 728. *J. Biol. Chem.*, 262(4), 1734-1739.
416. Yu H., Tyrrell D., Cashel J., Guo N. H., Vogel T., Sipes J. M., Lam L., Fillit H. M., Hartman J., Mendelovitz S., Panel A., & Roberts D. D. (2000). Specificities of heparin-binding sites from amino-terminus and type 1 repeats of thrombospondin -1. *Arch. Biochem. Biophys.*, 374(1), 13-23.
417. Edens R. E., Le Brun L. A., Linhardt R. J., Kaul P. R., & Weiler J. M. (2001). Certain high molecular weight heparin chains have high affinity for vitronectin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 391(2), 278-285.

418. Sobel M, Soler D. F, Kermode J. C, & Harris R. B. (1992). Localization and characterization of a heparin binding domain peptide of human von Willebrand factor. *J Biol Chem.*, 267(13), 8857-8862.
419. Reininger A. J. (2008). Function of von Willebrand factor in haemostasis and thrombosis. *Haemophila.*, 14(5), 11-26.
420. Borthakur G, Cruz M. A, Dong J. F, McIntire L, Li F, Lopez J. A, & Thiagarajan P. (2003). Sulfatides inhibit platelet adhesion to von Willebrand factor in flowing blood. *J Thromb Haemost.*, 1(6), 1288-1295.
421. Sobel, M., Bird, K. E., Tyler–Cross, R., Marques D, Toma N, Conrad E, & Harris R. B. (1996). Heparins designed to specifically inhibit platelet interactions with von Willebrand factor. *Circulation.*, 93, 992–999.
422. Gao C. (2011). Heparin promotes platelet responsiveness by potentiating  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -mediated outside-in signaling. *Blood.*, 117(18), 4946–4952.
423. Yagi M. (2012). Heparin modulates the conformation and signaling of platelet integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ . *Thrombosis Research.*, 129(6), 743–749.
424. Logash M. V., Dzhalilova E. A., & Zhernosiekov D. D. (2017). Dose-dependence of morphological changes and platelet aggregation after nalbuphine administration on rats. *International research and practice conference “Innovative technology in medicine: experience of Poland and Ukraine”*, Lublin, Poland, 168.
425. Рока-Мойя Я. М., Жерносеков Д. Д., Рыбачук В. Н., & Гриненко Т. В. (2013). Влияние антикоагулянтных препаратов на основе гепарина на агрегацию и секрецию тромбоцитов. «Молодые ученые в решении актуальных проблем науки»: IV Научно-практическая конференция, Владикавказ, РФ, 17-18 июня 2013 г.: Материалы конференции, Часть 1. – Владикавказ, 247–251.
426. Білоус В. Л., Рока-Мойя Я., & Жерносеков Д. Д. (2013). Ефекти плазміногену та гепарину на агрегацію та секрецію тромбоцитів людини. Матеріали IX Міжнародної наукової конференції «Молодь і поступ біології», Львів., 33-34.



427. Hirsh J., Anand S. S., Halperin J. L., & Fuster V. (2001). Mechanism of action and pharmacology of unfractionated heparin. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 21(7), 1094–1096.
428. Берковский А. Л. (2011). Методы определения активности гепарина: [метод. руководство]. Изд-во Гематолог. научн. центра, 55 с.
429. Quaranta M., Erez O., Mastrolia S. A., Koifman A., Leron E., Eshkoli T., Mazor M., & Holcberg G. (2015) The physiologic and therapeutic role of heparin in implantation and placentation.
430. Tapson V. F., & Hyers T. M. (2005). Antithrombotic therapy practices in us hospitals in an era of practice guidelines. *Archives of Internal Medicine*., 165(13), 1458–1464.
431. Макаров В. А. (1998). Применение гепаринов в клинической практике [Электронный ресурс]. *Гастроэнтерология, кардиология, гематология*. – М.: Издательский дом "РМЖ", 1998. – № 3. – Режим доступа: <http://rmj.ru>, свободный. – Загл. с экрана.
432. Messmore H.L. (1989). In vitro studies of the interaction of heparin, low molecular weight heparin and heparinoids with platelets. *Annals of the New York Academy of Sciences*., 556(1), 217–232.
433. Iwase H. (2012). Platelet aggregation in humans and nonhuman primates: relevance to xenotransplantation. *Xenotransplantation*., 19(4), 233–243.
434. Paolucci F. (2001). In vitro protein binding of Org31540/SR90107A in human plasma and purified antithrombin III [Electronic resource]. *Thrombosis and Haemostasis*., July (Suppl), Abstract P3095. Available on CD-ROM published by Excerpta Medica Medical Communications.
435. Blair P., Rex S., Vitseva O., Beaulieu L., Tanriverdi K., Chakrabarti S., Hayashi C., Genco C. A., Iafrati M., & Freedman J. E. (2009). Stimulation of Toll-like receptor 2 in human platelets induces a thromboinflammatory response through activation of phosphoinositide 3-kinase. *Circ Res*., 104(3), 346–54.

436. Xiao Z. (1998). Platelet activation with unfractionated heparin at therapeutic concentrations and comparisons with a low-molecular-weight heparin and with a direct thrombin inhibitor. *Circulation.*, 97(3), 251–256.
437. Boldin S. (2005). Integrin-dependent interaction of lipid rafts with the actin cytoskeleton in activated human platelets. *Journal of Cell Science.*, 118(4), 759–769.
438. Díaz-Ricart M. (2002). Inhibition of cytoskeletal assembly by cytochalasin B prevents signaling through tyrosine phosphorylation and secretion triggered by collagen but not by thrombin. *The American Journal of Pathology.*, 160(1), 329–337.
439. Carlsson L. (1979). Reorganization of actin in platelets stimulated by thrombin as measured by the DNase I inhibition assay (actin assay/platelet actin polymerization during stimulation/Ca<sup>2+</sup> effects on actin in extracts). *Cell Biology.*, 76(12), 6376–6380.
440. Cerecedo D. (2006). In-vitro model for the ultrastructural study of the formation of thrombi in human platelets. *Blood Coagulation and Fibrinolysis.*, 17(2), 161–164.
441. Nakata T., & Hirokawa N. (1987). Cytoskeletal reorganization of human platelets after stimulation revealed by the quick-freeze deep-etch technique. *The Journal of Cell Biology.*, 105(4), 1771–1780.
442. Hartwig J. H. (1992). Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation. *The Journal of Cell Biology.*, 118(6), 1421–1442.
443. Shattil S. J., & Newman P. J. (2004). Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood.*, 104(6), 1606–1615.
444. Bennet J. S. (1999). The platelet cytoskeleton regulates the affinity of the integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 for fibrinogen. *The Journal of Biological Chemistry.*, 274(36), 25301–25307.
445. Perri S. R., Annabi B., & Galipeau J. (2007). Angiostatin inhibits monocyte/macrophage migration via disruption of actin cytoskeleton. *FASEB Journal.*, 21(14), 3928–3936.

446. Thiagarajan P., & Kelly K. L. (1988). Exposure of binding sites for vitronectin on platelets following stimulation. *J.Biol.Chem.*, 263, 3035-3038.
447. Asch E., & Podack E. (1990). Vitronectin binds to activated human platelets and plays a role in platelet aggregation. *J.Clin. Invest.*, 85(5), 1372-1378.
448. Preissner K. T. (1990). Specific binding of plasminogen to vitronectin. Evidence for a modulatory role of vitronectin on fibrin(ogen)-induced plasmin formation by tissue plasminogen activator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 168(3), 966-971.
449. Kost C., Stuber W., Ehrlich H. J., Pannekoek H., & Preissner K. T. (1992). Mapping of binding sites for heparin, plasminogen activator inhibitor-1, and plasminogen to vitronectin's heparin-binding region reveals a novel vitronectin-dependent feedback mechanism for the control of plasmin formation. *J.Biol.Chem.*, 267(17), 12098-12105.
450. Morgenstern E., Gnad U., Preissner K. T., Dierichs R., Belleli A., Chestukhin A., Schwartz I., & Shaltiel S. (2001). Localization of protein kinase A and vitronectin in resting platelets and their translocation onto fibrin fibers during clot formation. *Eur. J. Cell.Biol.*, 80(1), 87-98.
451. Leytin V., Mody M., Semple J. W., Garvey B., & Freedman J. (2000). Quantification of platelet activation status by analyzing P-selectin expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 273(2), 565-570.
452. Parker C. J., Stone O. L., White V. F., & Bernshaw N. J. (1989). Vitronectin (S protein) is associated with platelets. *Brit. J. Haematol.*, 71(2), 245-252.
453. Roka-Moya Y. M., Zhernossekov D. D., Yusova E. I., Kapustianenko L. G., & Grinenko T. V. (2014). Study of the sites of plasminogen molecule which are responsible for inhibitory effect of Lys-plasminogen on platelet aggregation. *Ukr. Biochem. J.*, 86(5), 82-88.
454. Tykhomyrov A. O., Zhernossekov D. D., & Grinenko T. V. (2017). Surface-exposed actin binds plasminogen on the membrane of agonist-activated platelets: a flow cytometry study. *Biopolymers and Cell.*, 33(3), 172-182.

455. Zhernossekov D. D., Roka-Moya Y. M., Tykhomyrov A. A., & Grinenko T.V. (2015). Lys-plasminogen stimulates vitronectin exposure on the platelet surface. *Biopolimers and Cells.*, 31(2), 104-108.
456. Frenette P. S., Denis C. V., & Weiss L. (2000). P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J.Exp. Med.*, 191, 1413-1422.
457. Norman K. E., Moore K. L., & McEver R. P. (1995). Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood.*, 86, 4417-4421.
458. Romo G. M., Dong J. F., & Schade A. J. (1999). The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J.Exp.Med.*, 190, 803-814.
459. Cooling L. L., Zhang D. S., & Walker K. E. (1995). Detection in human blood platelets of sialyl Lewix X gangliosides, potential ligands for CD 62 and other selectins. *Glycobiology.*, 6, 571-581.
460. Wang C. T., & Schick P. K. (1981). The effect of thrombin on the organization of human platelet membrane glycosphingolipids: the sphingosine composition of platelet glycolipids and ceramides. *J. Biol.Chem.*, 256, 752-756.
461. Ferroni P., Lenti L., & Martini F. (1997). Ganglioside content of human platelets: differences in resting and activated platelets. *Thromb Haemost.*, 77., 548-554.
462. Alon R., Hammer D. A., & Springer T. A. (1995). Lifetime of the P-selectin-carbohydrate bond and its response to tensile force in hydrodynamic flow. *Nature.*, 74, 539-542.
463. Шумаков В. А., & Бабий Л. Н. (2007). Антитромботическая терапия у больных с острым коронарным синдромом. *Укр.кардіол. журн.*, 1, 29-35.

464. Тихомиров А. О., Жерносеков Д. Д., Рока-Мойя Я. М., Діордієва С. І., & Гриненко Т. В. (2014). Вплив Lys-форми плазміногену на реконструкцію актинового цитоскелету тромбоцитів / А. О. Тихомиров, *Фізіол. журн.*, 60(1), 25–33.
465. Cocco L., Follo M. Y., Manzoli L., & Suh P-G. (2015). Phosphoinositide-specific phospholipase C health and disease. *J. Lipid. Res.*, 56(10), 1853-1860.
466. Lishko V. K., Yermolenko I. S., & Ugarova T. P. (2010). Plasminogen on the surfaces of fibrin clots prevents adhesion of leucocytes and platelets. *J. Thromb. Haemost.*, 8(4), 799-807.
467. Жерносеков Д. Д., & Куркіна Т.В. (2008). Протеїн С: механізми функціонування та методи одержання. *Біотехнологія Український біохімічний журнал.*, 1(4), 9-17.
468. Blair P., & Flaumenhaft R. (2009). Platelet alpha-granules basic biology and clinical correlates. *Blood Rev.*, 23(4), 177-189.
469. O'Mullane M. J., & Baker M. S. (1999). Elevated plasminogen receptor expression occurs as a degradative phase event in cellular apoptosis. *Immun. Cell Biol.*, 77(3), 249-2478.
470. Brown M. C., Jansen J. K., & van Essen D. (1976). Polyneuronal innervation of skeletal muscle in newborn rats and its elimination during maturation. *J. Physiol.*, 261(2), 387-422.
471. Тамбовцева Р. В. (2010). Развитие мышечной ткани в онтогенезе. *Новые исследования.*, 1(23), 81-93.
472. Жерносеков Д. Д. (2003). Экспрессия нейронального белка клеточной адгезии N-CAM при старении. *Збірник наукових праць Луганського національного аграрного університету.*, 37(25), 72–73.
473. Saffell J. L., Walsh F. S., & Doherty P. (1994). Expression of N-CAM containing VASE in neurons can account for a developmental loss in their neurite outgrowth response to N-CAM in a cellular substratum. *J. Cell. Biol.*, 125(2), 2089-2096.

474. Walsh F. S., & Dickson G. (1989). Generation of multiple N-CAM polypeptides from a single gene. *Bioessays.*, 11, 83-88.
475. Walsh F. S., Parekh R. B., Moore S. E., Dickson G., Barton C. H., Gower H. J., Dwek R. A., & Rademacher T. W. (1989). Tissue specific O-linked glycosylation of the neural cell adhesion molecule N-CAM. *Development.*, 105, 803-811
476. Watanabe M. (1998). The neural cell adhesion molecule and heart development: what is N-CAM doing in heart? *Basic. Appl. Myol.*, 8(4), 277-291.
477. Kozarsky K., Kingsley D., & Krieger M. (1988). Use of a mutant cell line to study the kinetics and function of O-linked glycosylation of low density lipoprotein receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 85, 4335-4339.
478. Charlton C. A., Mohler W. A., & Blau H. M. (2000), Neural cell adhesion molecule (NCAM) and myoblast fusion. *Dev Biol.*, 221, 112–9.
479. Krauss R. S., Cole F., Gaio U., Takaesu G., Zhang W., & Kang J. S. (2005). Close encounters: regulation of vertebrate skeletal myogenesis by cell-cell contact. *J Cell Sci.*, 118, 2355–62
480. Capkovic K. L., Stevenson S., Johnson M. C., Thelen J. J., & Cornelison D. D. (2008). Neural cell adhesion molecule (NCAM) marks adult myogenic cells committed to differentiation. *Exp Cell Res.*, 314(7), 1553-65.
481. Byeon M. K., Sugi Y., Markwald R. R., Hoffrnan S. (1995). NCAM polypeptides in heart development: association with Z discs of forms that contain the muscle-specific domain. *J Cell Biol.*, 128(1-2), 209-221.
482. Polo-Parada L., Bose C. M., Plattner F., & Landmesser L. T. (2004). Distinct roles of different neural cell adhesion molecule (N-CAM) isoforms in synaptic maturation revealed by analysis of N-CAM 180 kDa isoform-deficient mice. *J. Neurosci.*, 24(8), 1852-1864.
483. Schoch S., Castillo P. E., Jo T., Mukherjee K., Geppert M., Wang Y., Schmitz F., Malenka R. C., & Sudhof T. C. (2002). RIM $\alpha$  forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone. *Nature.*, 415, 321-326.

484. Urbanchek M. G., Picken E. B., Kalliainen L. K., & Kuzon Jr. W. M. (2001). Specific force deficit in skeletal muscles of old rats is partially explained by the existence of denervated muscle fibers. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, 56(5), 191-197.
485. Cavallaro U., & Christofori G. (2004). Cell adhesion and signaling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature Reviews Cancer.*, 4, 118-132.
486. Hansen S.M., Berezin V., & Bock E. (2008). Signaling mechanisms of neurite outgrowth induced by the cell adhesion molecules N-CAM and N-cadherin. *Cellular and Molecular Life Science.*, 65(23), 3809-3821.
487. Vawter M. P. (2000). Dysregulation of the neural cell adhesion molecule and neuropsychiatric disorders. *Eur. J. Pharmacol.*, 405, 385-395.
488. Barbeau D., Liang J. J., Robitaille Y., Quirion R., & Srivastara L. K. (1995). Decreased expression of the embryonic form of the neural cell adhesion molecule in schizophrenic brains. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 2785-2789.
489. Полетаев А. Б., Карлов В. А., Помочаева М. В., & Селифанова О.П. (1985). Иммуноферментный анализ антигенной направленности антимозговых антител сыворотки крови больных эпилепсией. *Ж. Невропатол. Психиатрии им. С.С.Корсакова.*, 85(6), 831-833.
490. Wills S., Cabanlit M., Bennett J., Ashwood P., Amaral D., & van de Water J. (2007). Autoantibodies in autism spectrum disorders (ASD). *Ann.N.Y. Acad. Sci.*, 1107, 79-91.
491. Wu X., & Reddy D. S. (2012). Integrins as receptor targets for neurological disorders. *Pharmacol Ther.*, 134(1), 68–81.
492. Тихомиров А. О., Жерносеков Д. Д., Рока-Мойя Я. М., Діордієва С. І., & Гриненко Т. В. (2014). Вплив Lys-форми плазміногену на реконструкцію актинового цитоскелету тромбоцитів. *Фізіол. журн.*, 60(1), 25–33.
493. Whyte C. S., Swieringa F., Mastenbroek T. G., Lionikiene A. S., Lance M. D., van der Meijden P. E. J., Heemskerk J. W. M., & Mutch N. J. (2015).

Plasminogen associates with phosphatidylserine -exposing platelets and contributes to thrombus lysis under flow. *Blood.*, 125, 2568-2578.

494. Чещевик В. Т., & Жерносеков Д. Д. (2017). Тромбоцитарная агрегация. Механизм участия адгезивных молекул и митохондрий. *Веснік Палескага дзярж. ун-та. Серыя прыродазнаўчых навук.*, 2, 51–61.
495. Tykhomyrov A.A., Zhernosekov D.D., Guzyk M.M., Korsa V.V., Grinenko T.V. Plasminogen modulates formation of reactive oxygen species in human platelets. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2018. 90(6):31–40.
496. Williams J. G., Trese M. T., Williams G. A., Hartzler M. K., (2001). Autologous plasmin enzyme in the surgical management of diabetic retinopathy. *Ophtalmology.*, 108(10), 1902-1905.
497. Shen Y., Guo Y., Mikus P., Sulninte R., Wilczynska M., Ny T., & Li J. (2012). Plasminogen is a key proinflammatory regulator that accelerates the healing of acute and diabetic wounds. *Blood.*, 119, 5879-87.
498. Vinik A. I., Erbas T., Park T. S., Nolan R., & Pittenger G. L. (2001). Platelet dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care.*, 24, 1476-1485.