

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

**ЖЕРНОСЄКОВ ДМИТРО ДАНИЛОВИЧ**

УДК 616.155.2+576.522+616.155.2

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

03.00.04 – біохімія

**АВТОРЕФЕРАТ**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора біологічних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України та на кафедрі біохімії Дніпровського національного університету

**Науковий консультант:** доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник  
**Гриненко Тетяна Вікторівна,**  
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,  
завідувач відділу хімії та біохімії ферментів

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук,  
**Калачнюк Лілія Григорівна,**  
ДУ «Національний університет біоресурсів і  
природокористування України»,  
професор кафедри біохімії та фізіології ім. акад.  
М.Ф. Гулого.

доктор біологічних наук, професор  
**Варбанець Людмила Дмитрівна,**  
Завідувач відділу біохімії мікроорганізмів Інституту  
мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН  
України.

доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник  
**Верьовка Сергій Вікторович,**  
ДУ «Інститут отоларингології  
ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України»,  
завідувач лабораторії біохімії.

Захист відбудеться “ 28 ” січня 2019 р. о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.240.01 в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України за адресою: 01030, м. Київ, вул. Леонтовича, 9

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України за адресою: 01030, м. Київ, вул. Леонтовича, 9

Автореферат розісланий “ \_\_\_\_\_ ” грудня 2018 р.

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради,  
кандидат біологічних наук

Н.П. Карлова

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** 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 [Ronn L.C.V. et al., 2000]. Експресія АП на поверхні клітин змінюється при онкогенезі і може вважатися маркером цього процесу [Farahani E. et al., 2014].

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 адгезивного протеїну кадгеринової родини CDH2, на відміну від нейрональних протеїнів імуноглобулінової родини, залишається неясною його роль в процесі формування пам'яті [Becker C.G. 1996]. 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.

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 екопатогенних 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 патологій» (№ ДР 0113U003203, 2013-2017 рр.).

**Мета і завдання дослідження.** 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. 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. Вивчити тканиноспецифічну експресію матричних РНК та поліпептидних ізоформ протеїнів кадгерінової родини.
3. Виявити роль протеїну клітинної адгезії кадгерінової родини CDH2 в процесі навчання при застосуванні експериментальної моделі.
4. Виявити модулюючий вплив компонентів плазміноген-плазмінової системи на формування адгезивних зв'язків між тромбоцитами.

*Об'єкти дослідження* – протеїни клітинної адгезії та їх ліганди.

*Предмет дослідження* – зміни в експонуванні АП, що належать до різних класів адгезивних рецепторів та їх лігандів за норми та при патології.

*Методи дослідження.* У роботі використано нозерн-блот та вестерн-блот-аналіз, імуноферментний аналіз, протокова цитофлуориметрія, електрофорез в ПААГ, модель умовного рефлексу пасивного уникнення, статистичний аналіз.

**Наукова новизна отриманих 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 з додатковими екзонами (екзону VASE та м'язово-специфічних екзонів) у скелетних та серцевих м'язах щурів. Таким чином, експресія мРНК протеїну N-CAM1 є відображенням компенсаторних механізмів, що відбуваються у м'язовій тканині під час старіння ссавців.

Показана специфічна експресія мРНК кадгерінових 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.

Досліджено вплив іонів кальцію на протеолітичну деградацію CDH2. За наявності в середовищі мікромольних концентрацій кальцію, що є характерним для патологічного стану тканин, відбувається деградація цитоплазматичного домену CDH2, в той час як за умов відсутності кальцію має місце деградація екстрацелюлярного домену.

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.

Введення антитіл до протеїну N-CAM1 в структури гіпокампу та кори головного мозку щурів приводило до втрати виробленого навичку, 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 модель, яка пояснює 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 P-селектину на поверхні активованих тромбоцитів.

**Практичне значення одержаних результатів.** Отримані результати можуть бути використані при розробці оптимальних методів фармакологічної корекції патологічного тромбоутворення за серцево-судинних захворювань, кількість яких невідомо 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-Мойєю 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-Мойєю Я.М. Дослідження АП в сироватці хворих на шизофренію проводили спільно з д.б.н. Недзвецким В.С. Імуногістохімічні дослідження експресії протеїну CDH2 в тканині підшлункової залози проведено спільно з д.б.н. Гайдаром Ю.А., дослідження ролі протеїнів клітинної адгезії імуноглобулінової та кадгерінової родини при виробленні реакції уникнення у щурів було проведено спільно з проф. Нерушем П.О. Дослідження експресії протеїнів адгезії N-CAM1 та протеїну CDH2 проводилися в Протеїн лабораторії Копенгагенського університету під керівництвом проф. Е.Бок.

Всі положення і висновки роботи сформульовано особисто автором дисертації. Основні положення 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 IHPBA Congress “Athens 95” (Афіни, Греція, 1995), VII Український біохімічний з’їзд (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 наукова конференція «Молодь та поступ біології» (м. Львів, 2012 та 2013, Науково-практична конференція «Aktualne problemy nowoczesnych nauk» (м. Перемишль, Польща, 2012), 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), 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 та одна монографія, 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 обсяг 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 318 сторінках друкованого тексту, проілюстровано 75 рисунками, 5 таблицями. **Перелік умовних скорочень.** N-CAM1 – neural cell adhesion molecule, нейрональна молекула клітинної адгезії; VASE – variable-domain alternatively spliced exon, варіабельний домен, що утворюється завдяки альтернативному сплайсингу; PMSF - фенілметилсульфоніл фторид, vWF - фактор фон Віллебранда, ADP – аденозиндифосфат, GP – глікопротеїн, PLC - фосфоліпаза C, G-актин - глобулярний актин, F-актин - філаментний актин, MC-актин - актин мембранного кортексу, K1-K5 кринглові домени плазміногену 1-5, LBS – лізинзв'язувальні сайти, tPA – тканинний активатор плазміногену, 6-АГК – 6-аміногексанова кислота, БТП – безтромбоцитарна плазма, ЗТП – збагачена тромбоцитами плазма, T540 nm– світлопропускання за  $\lambda = 540$  нм, ЕДТА - етилендіамінотетраацетат, S 2251(Н-D-Val-L-Leu-L-Lys-p-нітроанілід дигідрохлорид) - хромогенний субстрат плазміну. АП – адгезивні протеїни, ПААГ – поліакриламідний гель, SDS – додецилсульфат натрію, FITC– фенілізотіоціанат.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

### Вступ.

У вступі висвітлено наукову проблему, обґрунтовано актуальність теми роботи, сформульовано мету і завдання дослідження, окреслено наукову новизну і практичне значення результатів, надано загальні відомості про обсяг дисертації.

### Огляд літератури.

В огляді літератури систематизовано сучасні дані стосовно структурно-функціональних особливостей основних класів молекул клітинної адгезії, а саме – представників імуноглобулінової родини, кадгерінової родини, селективів та інтегринів. Показана модулююча роль плазміноген/плазміну у взаємодіях клітина-клітина та клітина-матрикс.

### Матеріали та методи досліджень.

Олігонуклеотиди специфічні для матричних РНК протеїну N-CAM1 були побудовані на базі відомих послідовностей клонів к-ДНК протеїну N-CAM1 [Small S.J., 1987]. Відповідність проб олігонуклеотидним послідовностям певних екзонів описана в роботі [Andersson A-M, 1993]. Проби N-cad I та N-cad II розроблені на базі послідовності, що кодує регіон протеїну CDH2, який відокремлюється від зрілого поліпептиду. Проба N-cad II мала найменшу гомологію з E-кадгеріном (44 %) та P-кадгеріном. Олігонуклеотиди E-cad I та E-cad II синтезовані на базі к-ДНК E-кадгеріну миші [Nagafuchi A., 1987]. Ці проби відповідали послідовностям, що кодують екстрацелюлярний та цитоплазматичний домени відповідно. Олігонуклеотиди синтезовані на базі к-ДНК P-кадгеріну миші P-cad I та P-cad II [Nose A., 1987] відповідали

послідовностям, що кодують екстрацелюлярний та цитоплазматичний домени відповідно. Відсоток гомології між олігонуклеотидними пробами протеїну CDH2 та кДНК послідовностями E- та P-кадгерину визначали як рекомендовано в роботі [Devereux J., 1984].

Нозерн-блот аналіз проведений як описано в роботі Andersson A-M, 1993. Препарат матричних РНК отримували за допомогою фенол-хлороформного методу, за основу покладено методику [Gozes I, 1984]. Електрофоретичне розділення мРНК, прегібридизацію та гібридизацію проводили згідно методики, описаної в роботі Andersson A-M, 1993. Моноклональні мишачі антитіла OB11, які специфічні до цитоплазматичного епітопу ізоформ N-CAM1, були люб'язно надані доктором Harry Langbeheim, Ізраїль. Всі інші антитіла, які використовували в дослідженнях з протеїном N-CAM1 були отримані від фірми Dakopatts, США. Отримання поліклональних антитіл до протеїну CDH2 anti-N-cad-cyt докладно описано в роботі Linnemann D, 1994. Поліклональні антитіла до протеїну CDH2 R-156 були люб'язно надані доктором Benjamin Geiger, інститут Вейсмана, Ізраїль.

Вестерн-блот аналіз протеїнів клітинної адгезії проводили за методиками, детально описаними в роботах Linnemann D, 1994; Andersson A-M, 1993; Gaardsvoll, 1993. При інкубації з антитілами OB11 проводили доочищення препарату N-CAM1 до проведення електрофорезу як описано в роботі [Andersson A-M, 1993]. Для отримання препарату протеїну N-CAM1 з серцевих м'язів використовували методику описану в роботі [Gaardsvoll H., 1993]. Препарат ендосіалідази N був люб'язно наданий доктором Jurgen Roth, Цюріхський університет, Швейцарія. Кількість протеїну N-CAM1 визначали методом імуноферментного аналізу як описано в роботі [Ibsen S., 1983]. Статистичну обробку результатів проводили із використанням t-тесту Ст'юдента, різницю між середніми значеннями у різних групах вважали вірогідною при  $P < 0,05$ . Для проведення імуноблотингу при визначенні кадгеринів та визначення ефектів кальцію на стабільність N-кадгеринового поліпептиду використовували методику описану в роботі [Linnemann D., 1994]. Ефекти кальцію на стабільність N-кадгеринового поліпептиду досліджували за допомогою імуноблотингу, використовуючи поліклональні антитіла anti-N-cad-cyt. або поліклональні антитіла R-156. Для проведення імуногістохімічного дослідження експресії протеїну CDH2 під час ембріонального розвитку підшлункової залози використовували підшлункову залозу людини 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», 1996 р.

При проведенні досліджень модулюючого впливу плазміногену на агрегаційну здатність тромбоцитів використовували кров умовно здорових донорів з військового клінічного шпиталю Міністерства оборони України. Кров бика була надана ЗВП «Хутровик» (м. Узин, Україна). Glu-плазміноген людини одержували з цитратної плазми крові людини методом афінної хроматографії



на лізин-сефарозі 4В [Deutsch, 1970]. Lys-плазміноген людини отримували за аналогічною методикою із фракції III<sub>2,3</sub> плазми крові за Коном. Плазмін одержували за методикою [Norman, 1985]. Фрагменти плазміногену крингли 1-3 (K1-3), крингл 4 (K4), крингл 5 (K5) та мініплазміноген отримували як описано в роботі Roka-Moya Y.M et al., 2014. Для ідентифікації Glu- та Lys-форм плазміногену застосовували електрофорез в ПААГ [Panium, 1969]. Активність плазміну та потенційну активність плазміногену визначали за швидкістю вивільнення *n*-нітроаніліну з хромогенного субстрату S2251. Зразки ЗТП отримували як описано в роботі [Рока-Моя, 2012]. Агрегацію тромбоцитів досліджували у препаратах ЗТП крові та у суспензії відмитих тромбоцитів людини на оптичному агрегометрі «SOLAR AT-02» (Білорусь) за протоколом [Зубовская, 2010]. Аналіз даних агрегометрії проводили із використанням пакету програм «Агрегометр 2.01», ступінь та швидкість агрегації реєструвалися автоматично. Ступінь агрегації (Tmax) визначали як максимальне значення світлопропускання (T,  $\lambda = 540$  нм) реакційної суміші, що досягається через 5 хв після додавання індуктора агрегації. Перед внесенням агоніста агрегації зразки передінкубували з Glu-, Lys-плазміногеном, плазміном, фрагментами плазміногену (K1-3, K4, K5, мініплазміноген) протягом 3 хв для забезпечення їх взаємодії з клітинною поверхнею.

Протеїнові фракції тромбоцитів, що містять різні пули актину, отримували після руйнуванням клітин за допомогою детергентвмісного буфера та наступного диференційного центрифугування, як описано в роботі [Díaz-Ricart, 2000]. Детекцію пулів актину у складі протеїнових фракцій тромбоцитів проводили методом імуноблотингу відповідно до загальноприйнятої методики [Towbin, 1979]. Відносний вміст різних пулів актину у тромбоцитах оцінювали денситометрично із використанням програми «Total Lab - 120» (США) і виражали у відсотках від кількості фібрилярного актину у досліджуваній групі клітин.

Для оцінки впливу різних форм плазміногену на експонування вітронектину тромбоцитами було використано метод протокової цитофлуориметрії з використанням антитіл до вітронектину та вторинних FITC-кон'югованих антитіл (SigmaAldrich, США). Детально методику роботи викладено в роботі [Zhernossekov D.D. et al. 2015]. 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. Детекція була проведена за каналом FL1 (515-535 нм). Кількісні зміни флуоресценції були виражені в 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. Графічне зображення результатів отримували за допомогою програми FCS Express V3 (De Novo Software, США).

Для дослідження впливу різних форм плазміногену на експонування P-селектину використовували відмиті тромбоцити людини та антитіла до

P-селектину кон'юговані з фікоеритрином. Групи клітин використаних для експериментів, аналогічні тим, що використовували при дослідженні з вітронектином. Детекція була проведена за каналом FL3 (620-630 нм). Графічне зображення результатів отримували за допомогою програми FCS Express V3 («De Novo Software», США).

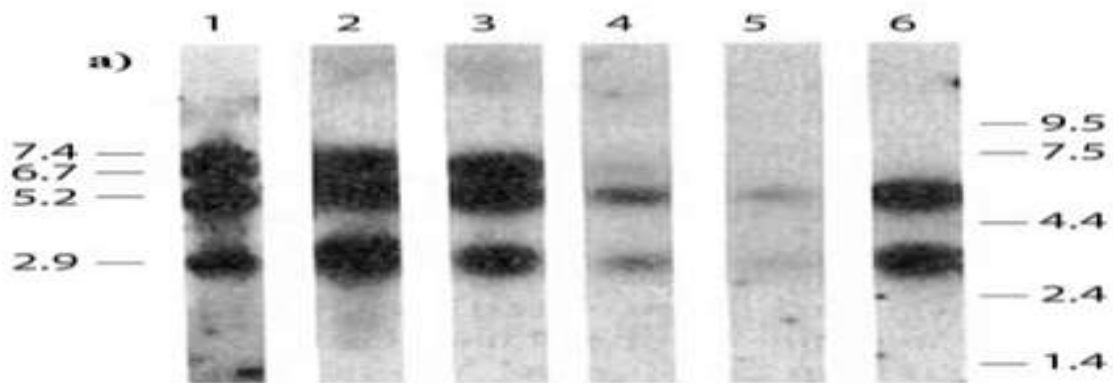
Статистичну обробку результатів проводили із використанням критерію *t* Ст'юдента, різницю між середніми значеннями у різних групах вважали вірогідною при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

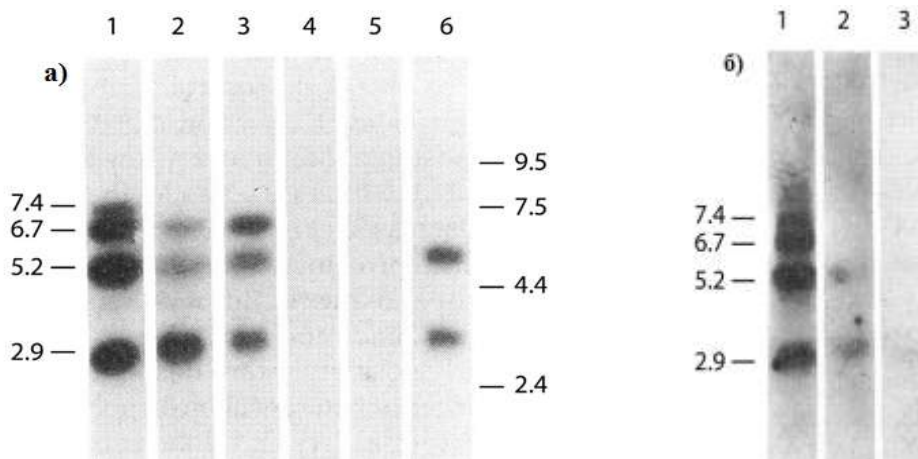
**Експресія нейронального протеїну клітинної адгезії N-CAM1 в скелетних та серцевих м'язах під час постнатального розвитку та старіння щурів.** Особливості експресії протеїнів клітинної адгезії імуноглобулінової родини розглянуто на прикладі протеїну N-CAM1. У м'язах дорослих ссавців N-CAM1 сконцентрований в регіоні нервово- м'язових з'єднань та сателітних клітин [Cashman N.R., 1987]. Нами проведено дослідження експресії сплайс-варіантів мРНК протеїну N-CAM1 з певними екзонами в скелетних та серцевих м'язах під час постнатального розвитку та старіння щурів, а також визначення поліпептидних ізоформ цього протеїну в м'язовій тканині. Експресію мРНК протеїну N-CAM1 в скелетних м'язах під час постнатального розвитку та старіння щурів визначали за допомогою нозерн-блотингу та відповідних олігонуклеотидних проб. Синтезовані проби призначені впізнавати відповідні екзони та комбінації екзонів у складі мРНК . Три типи мРНК N-CAM1 (6,7; 5,2 та 2,9 кб) гібридизуються з пробою E7 в скелетних м'язах щура (Рис. 1.). В препаратах скелетних м'язів щура під час раннього постнатального розвитку (перший та десятий день) виявляються всі три типи мРНК N-CAM1 в приблизно однаковій кількості (треки 2 та 3). В препаратах скелетних м'язів дорослих тварин загальна кількість мРНК N-CAM1 знижена і мРНК N-CAM1 розміром 5,2 та 2,9 кб більш виражені ніж м-РНК 6,7 кб (трек 4). В скелетних м'язах дев'ятимісячних щурів м-РНК протеїну N-CAM дуже слабо виражені, в той час як на 730-й день в скелетних м'язах виражена експресія м-РНК розміром 5,2 та 2,9 кб (треки 5 та 6).

Таким чином, під час старіння щурів у м'язах відбуваються зміни не тільки в кількості мРНК N-CAM1, але й змінюється експресія певних мРНК цього протеїну. Альтернативний сплайсинг екзонів 7/8 та екзону VASE в мРНК протеїну N-CAM1 скелетних м'язів вивчали за допомогою проб E 7/8 та E VASE. Проблема E 7/8 гібридизується з мРНК N-CAM1, що не має послідовності альтернативно сплайсованого екзону VASE. Як видно з даних нозерн-блотингу (рис. 2.), в скелетних м'язах більшість мРНК протеїну N-CAM1 не мають у своєму складі послідовності VASE. Тільки слабка експресія цього сплайс-варіанту спостерігається у препаратах скелетних м'язів на 1-й день постнатального розвитку та у м'язах старих тварин. Гібридизація з цим екзоном характерна для мРНК N-CAM1 розміру 5, 2 та 2,9 кб. Порівняно з експресією

сплайс-варіанту з екзоном VASE у головному мозку щура, експресію цього сплайс-варіанту у скелетних м'язах можна вважати незначною.



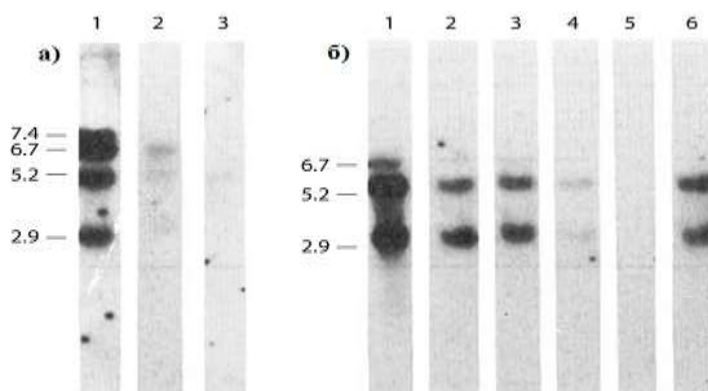
**Рис.1.** Експресія мРНК протеїну N-CAM1 в скелетних м'язах щура під час нормального розвитку та старіння тварин (E7). Нозерн-блотінг: **а** – проба E7: 1 – препарат головного мозку дорослого щура, 2-6 –препарати м'язів: 2 – 1-й день, 3 – 10-й день, 4 – 40-й день, 5 – 270-й день, 6 – 730-й день.



**Рис. 2.** Експресія мРНК протеїну N-CAM1 в скелетних м'язах щура під час нормального розвитку та старіння тварин (E7/8 та EVASE). Нозерн-блотінг: **а** – проба E7/8: 1 – препарат головного мозку дорослого щура, 2-6- препарати скелетних м'язів 2 – 1-й день, 3 – 10-й день, 4 – 40-й день, 5 – 270-й день, 6 – 730-й день; **б** – проба EVASE: 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.

Дані стосовно альтернативного сплайсингу між 12 та 13 екзонами представлені на Рис. 3. Матричні РНК протеїну N-CAM1, які не підлягали альтернативному сплайсингу між 12-м та 13-м екзонами, належали до мРНК розміром 6,7 кб. Проби, що відповідають альтернативно сплайсованим додатковим екзонам гібридизуються головним чином з мРНК N-CAM1 розміром 5,2 та 2,9 кб. Гібридизація з пробою E12/a/AAG/13 виявляє експресію сплайс-варіанту з комбінацією екзонів 12-а-AAG-13 у разі постнатальних скелетних м'язів (Рис. 3, б). Ця екзонна комбінація присутня в мРНК N-CAM1, які забезпечують синтез ізоформ протеїну, що прикріплюються до мембрани

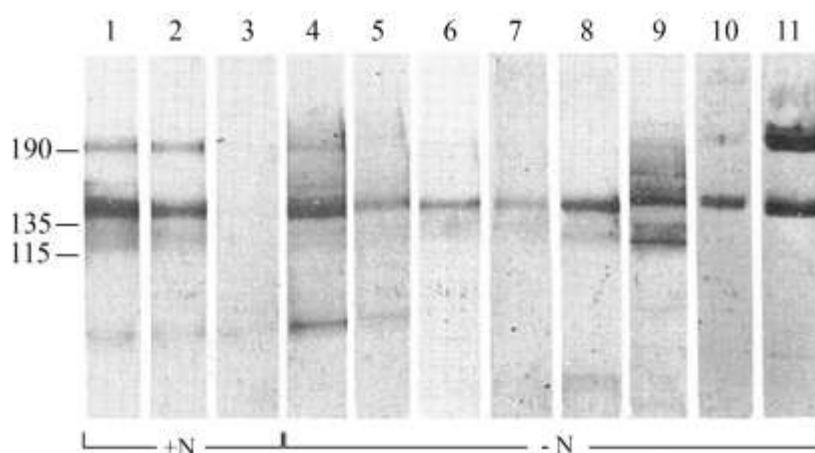
завдяки фосфатидилінозітоловому якорю. Можна відзначити, що експресія мРНК протеїну N-CAM1 в скелетних м'язах характеризується певними змінами під час постнатального розвитку та при старінні тварин.



**Рис. 3.** Експресія мРНК протеїну N-CAM1 в скелетних м'язах щура під час нормального розвитку та старіння тварин (E12/13, E12/a/AAG/13). Нозерн-блотінг: **а** – проба E12/13: 1 – препарат головного мозку дорослого щура, 2 – 10-й день, 3 – 730-й день; **б** – проба E12/a/AAG/13: 1 – препарат головного мозку дорослого щура, 2 – препарат скелетних м'язів, отриманий в 1-й день постнатального розвитку щура, 3 – 10-й день; 4-40-й день, 5-270-й день, 6-730-й день постнатального розвитку щура.

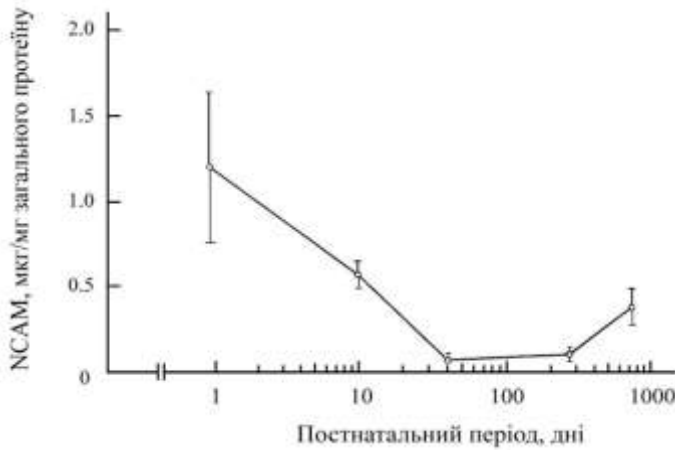
Матричні РНК N-CAM1 розміром 6,7, 5,2 та 2,9 кб мають чітку вираженість в скелетних м'язах в період раннього постнатального розвитку, але в препаратах м'язів дорослих тварин їх експресія знижена. У м'язах старих щурів спостерігається реекспресія мРНК N-CAM1 розміру 5,2 та 2,9 кб, експресія мРНК 6,7 кб залишається на невисокому рівні. Екзон VASE, який має вираженість в мРНК N-CAM1 при постнатальному розвитку головного мозку щура [Small, 1990], в препаратах мРНК скелетних м'язів майже не виявляється. Слід зазначити, що в тканинах з високим рівнем регенерації, ізоформи N-CAM1 є VASE-негативними [Saffell J.L., 1994].

Визначення ізоформ протеїну N-CAM1 в скелетних м'язах проводили з використанням поліклональних антитіл, що впізнавали всі ізоформи цього протеїну. Результати дослідження приведено на Рис. 4. Гомогенати скелетних м'язів містять значну кількість міозину, який заважає електрофоретичному розділенню цільових протеїнів і дає неспецифічну реакцію зв'язування з антитілами. Щоб уникнути цього нами для експериментів було використано фракцію супернатанту, отриманого при високих обертах (100 000 g, 1,5 години) та тритоновий солюбілізат. В тритонових солюбілізатах скелетних м'язів визначаються чотири ізоформи N-CAM1 з молекулярними масами 200, 145, 125 та 120 кДа. Ізоформа N-CAM1-145 є домінуючою у всіх препаратах незалежно від віку тварини (Рис. 4., треки 4-8). Слід зазначити, що вираженість поліпептидних зон змінюється залежно від віку: чітка експресія під час раннього постнатального розвитку м'язів, далі – мінімальна вираженість у препаратах м'язів дорослого щура (треки 3 та 6), і реекспресія протеїну N-CAM1 в препаратах м'язів старих тварин (треки 6-8).



**Рис. 4.** Імуноблотинг ізоформ протеїну N-CAM1 в скелетних м'язах щура під час розвитку та старіння. 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. Кількість протеїну на трек - 13 мкг (трек 1-5, 7 та 8), 60 мкг в треку 6 та 110 мкг в треку 9.

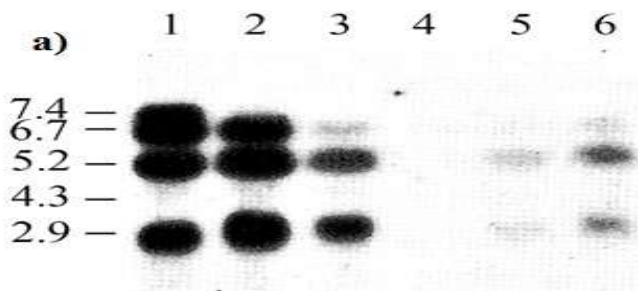
В препаратах м'язів на ранніх стадіях постнатального розвитку спостерігається дифузне забарвлення поблизу поліпептидних зон 200 та 145 кДа та вище області 120-125 кДа. Таке явище може бути викликане присутністю полісиалюваних поліпептидів N-CAM1. Для видалення залишків сілової кислоти проби обробляли ендосиалідазою N (треки 1-3). В препаратах м'язів старих тварин дифузне забарвлення відсутнє, що вказує на факт, що в скелетних м'язах дорослих та старих тварин ізоформи N-CAM1 або мають мінорне полісиалювання, або позбавлені його взагалі. Згідно отриманим даним, ізоформа N-CAM1-145 є більш вираженою у скелетних м'язах старих тварин ніж у м'язах дорослого щура. Проте виявлений 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-CAM1-145, або, навпаки, трансляційна швидкість мРНК 6,7 кб підвищена порівняно з мРНК розміром 5,2 та 2,9 кб. Трансмембранні ізоформи N-CAM1 скелетних м'язів визначали за допомогою моноклональних антитіл OB11, які реагували з цитоплазматичним епітопом, що мав спільність з трансмембранними ізоформами N-CAM1-190 та N-CAM1-135 з головного мозку щурів (Рис. 4, трек 11). Як свідчать наведені дані, в скелетних м'язах щура ізоформи N-CAM1 з молекулярними масами 200 та 145 кДа мають у своєму складі цитоплазматичний епітоп. Визначення кількості протеїну N-CAM1 в препаратах скелетних м'язів проводили з використанням імуноферментного аналізу (Рис. 5).



**Рис. 5.** Кількість протеїну N-CAM1 в скелетних м'язах щура в різні періоди постнатального розвитку. Результати імуоферментного аналізу виражені в мкг/мг загального протеїну.

протеїну N-CAM1 була підвищена, і складала  $0,37 \pm 0,011$  мкг/мг загального протеїну на 730 день постнатального розвитку тварин. Вважають, що денервовані м'язи та старі м'язи характеризуються схожими змінами стосовно властивостей міофібрил. Під час старіння м'язів спостерігають втрату цілих моторних одиниць та неповну реіннервацію денервованих м'язових фібрил моторними нейронами, які залишилися. Вважають, що у старих щурів має місце порушення аксональної регенерації. Підвищений рівень протеїну N-CAM1 у скелетних м'язах старих тварин, який ми спостерігаємо, повністю відповідає такому поясненню.

Особливості експресії мРНК N-CAM1 в серцевих м'язах визначали з пробами, які були використані для аналізу скелетних м'язів. Як видно з рис. 6, проба E7 гібридизується з трьома типами мРНК N-CAM1 в серцевих м'язах – 6,7; 5,2 та 2,9 кб.



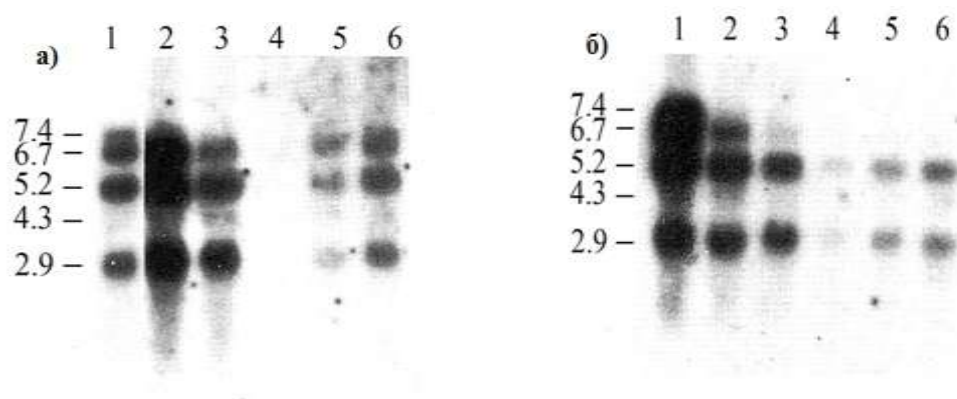
**Рис. 6.** Експресія мРНК протеїну N-CAM1 в серцевих м'язах щура під час нормальногорозвитку та старіння щура (гібридизація з пробою E7). а – проба E7, що гібридизується з мРНК препаратів головного мозку дорослих щурів (1) та серцевих м'язів в різні періоди постнатального розвитку щура (2-6): 2 – 1-й день, 3 – 10-й день, 4 – 40-й день, 5 – 270-й день, 6 – 730-й день.

Як свідчать приведені дані, кількість протеїну N-CAM1 знижується протягом постнатального розвитку м'язів, досягаючи мінімального значення у препаратах скелетних м'язів дорослих щурів. На перший день постнатального розвитку щура кількість протеїну N-CAM1 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-CAM1 була підвищена, і складала  $0,37 \pm 0,011$  мкг/мг загального протеїну на 730 день постнатального розвитку тварин. Вважають, що денервовані м'язи та старі м'язи характеризуються схожими змінами стосовно властивостей міофібрил. Під час старіння м'язів спостерігають втрату цілих моторних одиниць та неповну реіннервацію денервованих м'язових фібрил моторними нейронами, які залишилися. Вважають, що у старих щурів має місце порушення аксональної регенерації. Підвищений рівень протеїну N-CAM1 у скелетних м'язах старих тварин, який ми спостерігаємо, повністю відповідає такому поясненню.

В деяких треках спостерігається дуже слабка експресія мРНК 4,3 кб. В перший день постнатального розвитку всі три типи мРНК протеїну N-CAM1 присутні в приблизно однаковій кількості (трек 2). Надалі, під час постнатального розвитку та старіння м'язів, мРНК N-CAM1 розміром 5,2 та 2,9 кб мають значно більшу вираженість порівняно з мРНК 6,7 кб (треки 3-6).

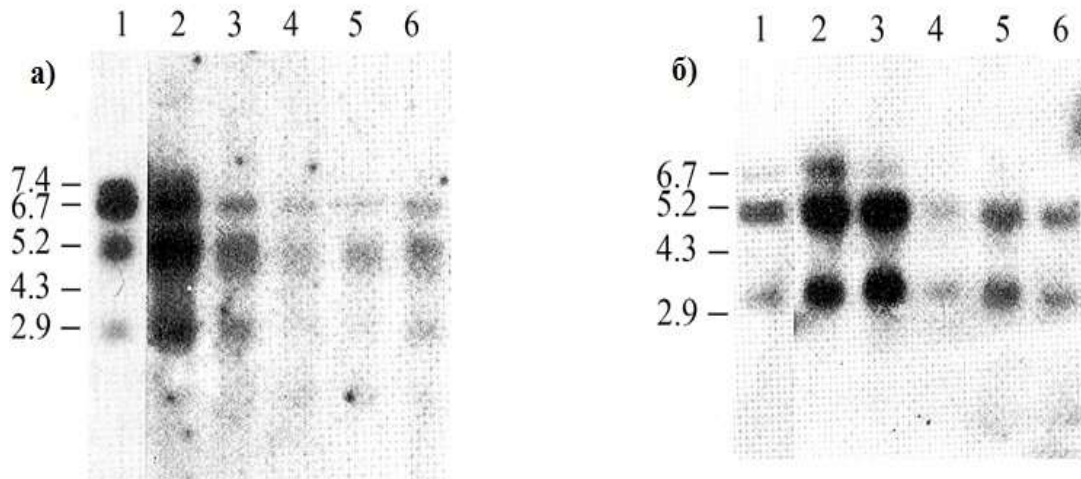
Загальна кількість мРНК, які кодують протеїн N-CAM1, знижується під час постнатального розвитку, досягаючи мінімального значення у серцевих м'язах дорослих тварин на 40-й день постнатального розвитку.

В серцевих м'язах старих щурів, як і у випадку скелетних м'язів, спостерігається реекспресія мРНК протеїну N-CAM1, причому, виражена експресія для всіх типів. На відміну від скелетних м'язів, в серцевих м'язах спостерігається виражена гібридизація EVASE з відповідними матричними РНК протеїну N-CAM1, а саме – 6,7; 5,2 та 2,9 кб (Рис. 7).



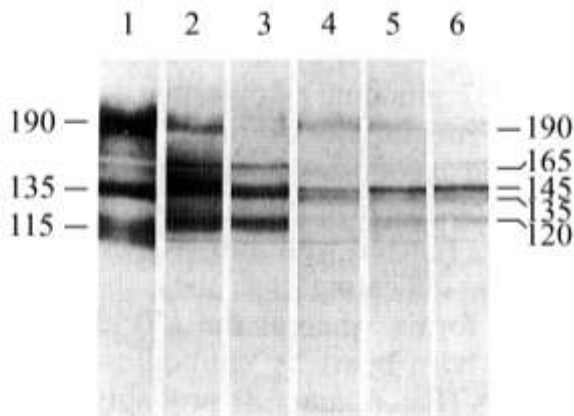
**Рис. 7.** Експресія мРНК протеїну N-CAM1 в серцевих м'язах щура під час нормального розвитку та старіння щура (гібридизація з пробами E7/8 та EVASE). а) – проба E7/8, що гібридується з мРНК препаратів головного мозку дорослого щура (1) та серцевих м'язів в різні періоди постнатального розвитку щура (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 знижується під час постнатального розвитку серцевих м'язів, в той час як кількість мРНК 5,2 та 2,9 кб зберігається на досить високому рівні і під час постнатального розвитку, і при старінні. Для дослідження експресії сплайс-варіантів з м'язово-специфічними екзонами в препаратах серцевих м'язів було використано проби E12/13 та E12/a/AAG/13. Як видно з наведених даних (Рис. 8), проба E12/13 впізнає три типи мРНК N-CAM1 (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 сплайс-варіантів мРНК 6,7 кб з додатковими м'язово-специфічними екзонами знижується під час постнатального розвитку, а для сплайс-варіантів мРНК розміром 5,2 та 2,9 кб таких виражених змін не зареєстровано (рис. 8.б). Аналізуючи отримані дані, можна сказати, що в скелетних та серцевих м'язах, на відміну від головного мозку, практично не визначається клас мРНК N-CAM1 розміром 7,4 кб. Однак, відповідна ізоформа протеїну N-CAM1 визначається методом імуноблотингу. Імовірно, що мРНК 7,4 кб знаходиться в такій невеликій кількості в скелетних та серцевих м'язах, що не реєструється методом



**Рис. 8.** Експресія мРНК протеїну N-CAM1 в серцевих м'язах щура під час нормального розвитку та старіння (гібридизація з пробами E12/13 та E12/a/AAG/13). а – проба E12/13, що гібридується 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.



**Рис. 9.** Імуноблотінг ізоформ N-CAM1; препарати серцевих м'язів щура. 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. Молекулярні маси ізоформ протеїну N-CAM1 з головного мозку зліва, молекулярні маси ізоформ з серцевих м'язів – справа.

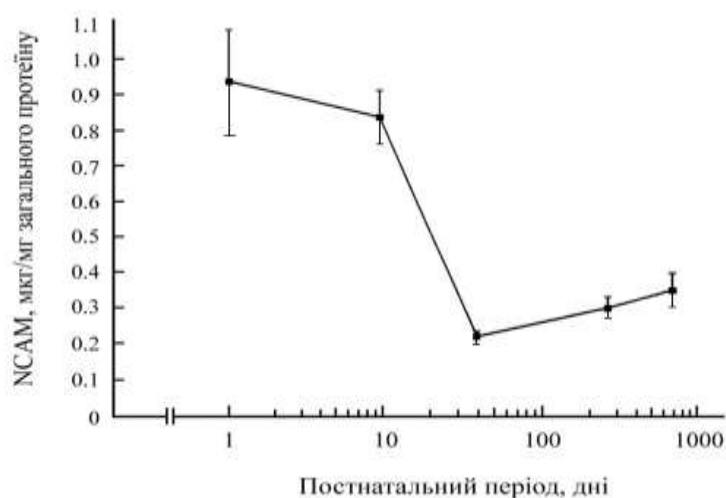
нозерн-блоттінгу. Експресія сплайс-варіанту мРНК з екзоном VASE була найбільш вираженою в серцевих м'язах раннього постнатального періоду. Нами показано, що експресія сплайс-варіантів мРНК N-CAM1 розміром 5,2 та 2,9 кб з додатковими екзонами а та ААG є більш вираженою, ніж для варіанта мРНК 6,7 кб. Наявність екзону а в сплайс-варіантах мРНК забезпечує появу ізоформи протеїну з додатковою послідовністю пролинових залишків, що впливає на адгезивні властивості N-CAM1.

Результати дослідження молекулярних ізоформ протеїну N-CAM1 в серцевих м'язах щура приведено на рис. 9. Показано, що в препаратах серцевих м'язів, отриманих на різних стадіях постнатального



розвитку, спостерігаються три головні ізоформи з молекулярними масами 190, 145 та 120 кДа. Причому, ізоформа N-CAM1-145 має найкращу вираженість (треки 2-6). В деяких пробах спостерігається ізоформа з молекулярною масою 165 кДа.

Визначення кількості протеїну N-CAM1 в препаратах серцевих м'язів проводили з використанням імуноферментного аналізу (Рис. 10). Згідно наведених даних, кількість протеїну N-CAM1 знижується протягом постнатального розвитку м'язів, досягаючи мінімального значення у препаратах скелетних м'язів дорослих щурів. На перший день постнатального розвитку щура кількість протеїну N-CAM1 в скелетних м'язах складає  $0,93 \pm 0,14$  мкг/мг загального протеїну, на сороковий день –  $0,21 \pm 0,01$  мкг/мг загального протеїну. В м'язах старих щурів кількість протеїну N-CAM1



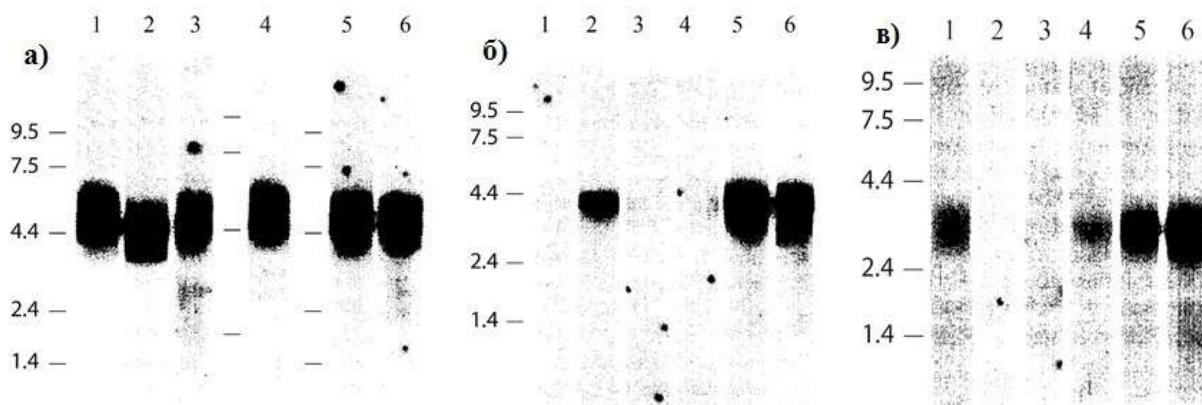
**Рис. 10.** Кількість протеїну N-CAM1 в серцевих м'язах в різні періоди постнатального розвитку щура. Результати імуноферментного аналізу виражені в мкг/мг загального протеїну.

підвищена, і складає  $0,34 \pm 0,05$  мкг/мг загального протеїну на 730 день постнатального розвитку тварин. Отримані результати стосовно експресії N-CAM1 в серцевих м'язах показують високий рівень експресії цього протеїну в період раннього постнатального розвитку, мінімальний рівень в період дорослого стану тварини і підвищений вміст при старінні.

Таким чином, наведені дані свідчать, що протеїн N-CAM1 залучається до компенсаторних механізмів, що мають місце у м'язовій тканині під час старіння тварин.

**Тканиноспецифічна експресія мРНК та поліпептидних ізоформ нейронального протеїну кадгеринової родини.** Розглядаючи експресію АП кадгеринової родини, ми знайшли певні відмінності від адгезивних молекул імуноглобулінової родини. Проведений аналіз експресії мРНК поліпептиду CDH2 під час розвитку та старіння тканин печінки, скелетних та серцевих м'язів, нирок та легенів з пробою N-cad II не виявив значних відмінностей (якісних або кількісних) в експресії мРНК цього протеїну. Разом з тим нами виявлено, що експресія близькородинних кадгеринів (N-, E-, та P) в головному мозку, м'язах, легенях, нирках та печінці забезпечується специфічним набором матричних РНК. Типові результати нозерн-блотингу з відповідними пробами представлено на рис. 11. Як свідчать результати експериментів, експресія протеїну CDH2 в головному мозку та скелетних м'язах щура пов'язана з мРНК розміром 5,2 та 4,4-4,3 кб (Рис.11 а, треки 1 та 3). Для печінкової тканини

характерні матричні РНК 4,4-4,3 кб та 3,5 кб (Рис. 11а, трек 2). В серцевих м'язах, нирках та легенях спостерігаються всі три типи матричних РНК CDH2 (Рис. 11 а, треки 4-6). Оскільки для експерименту було взято приблизно однакову кількість препаратів матричних РНК, то можна стверджувати, що найбільшим рівнем експресії протеїну CDH2 характеризуються тканини головного мозку, печінки та серцевих м'язів.



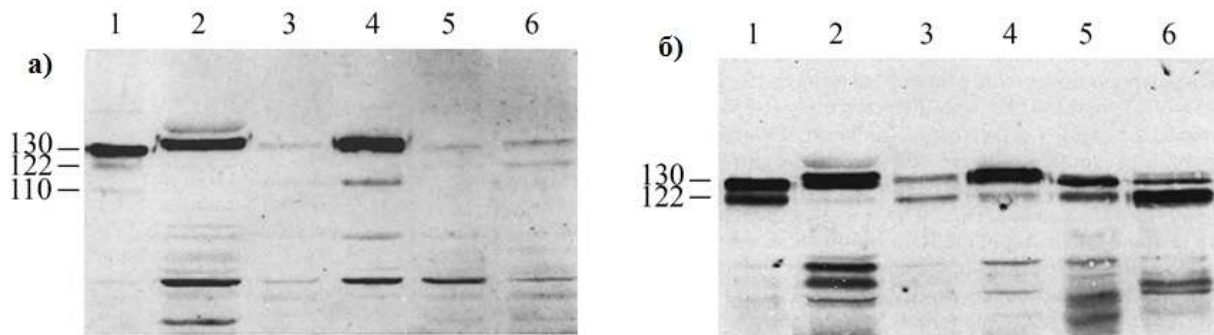
**Рис.11** Нозерн-блотинг препаратів мРНК тканин щура (4-10 доба постнатального розвитку) з використанням зондів N-cad II (а), E-cad I (б) та P-cad I (в). 1 - препарат з головного мозку, 2 - препарат печінки, 3 – препарат скелетних м'язів, 4 – препарат серцевих м'язів, 5 – препарат ниркової тканини, 6 – препарат тканини легенів. В (а) позиції 5 та 6 отримані після тривалої експозиції. Зліва позначені розміри матричних РНК.

Матричні РНК Е-кадгерину (4,3 кб) виявлялися в печінці, нирках та легенях, але їх не було в головному мозку, скелетних м'язах або серцевих м'язах (рис.11б). Матричні РНК Р-кадгерину (CDH3) розміром 3,5 кб спостерігаються в тканинах нирок та легенів, слабка експресія цих РНК характерна для головного мозку та серцевих м'язів (Рис. 11 в, треки 1 та 4), в тканинах печінки та в скелетних м'язах експресія Р-кадгеринових матричних РНК не зафіксована (Рис. 11в, треки 2 та 3).

Для аналізу експонування N-кадгеринового поліпептиду в різних тканинах щура було використано два різновиди антитіл – поліклональні антитіла R-156, спрямовані проти послідовності 24 С-кінцевих амінокислот протеїну CDH2 курчати та поліклональні антитіла N-cad-cyt, вироблені проти повної послідовності протеїну CDH2 курчати. Перші антитіла реагували з широким спектром кадгеринів, включаючи Е- та Р-кадгерини [Geiger В., 1990]. Результати імуноблотингу представлено на рис. 12. За результатами імуноблотингу 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 протеїну CDH2. 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 протеїну CDH2 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 впізнається як антитілами анти-N-cad-cyt, так і антитілами R-156. Цей поліпептид може бути наслідком дії протеїнази, яка відокремлює фрагмент екстрацелюлярного N-кінцевого домену від поліпептиду з молекулярною масою 130 кДа, або це – інший кадгерин, що має високий ступінь гомології з N-кадгерином. Оскільки немає кореляції між протеолітичною деградацією протеїну CDH2 з молекулярною масою 130 кДа, та появою фрагменту з молекулярною масою 122 кДа, то перший варіант - малоймовірний. Виявлення поліпептиду 122 кДа за допомогою антитіл R-156 дає можливість стверджувати, що у цього кадгерину висока гомологія послідовності С-кінцевої частини цитоплазматичного домену з такою послідовністю в молекулі протеїну CDH2. Цілком імовірно, що це – R-кадгерин, у якого С-кінцева послідовність цитоплазматичного домену відрізняється від С-кінцевої послідовності протеїну CDH2 лише трьома амінокислотами. Молекулярна маса R-кадгерину становить близько 122 кДа [Inuzuka H., 1991]. Наявність поліпептиду з молекулярною масою 110 кДа можна пояснити дією кальпаїнової протеази, яка розщеплює N-кадгерин з утворенням поліпептиду з масою 110 кДа. Вважають, що ця протеаза порушує зв'язок цитоскелетних протеїнів з кадгеринами, що призводить до втрати останніми адгезивних властивостей [Konze S.A., 2014].



**Рис.12.** Імуноблотінг з антитілами анти-N-cad-cyt (а) та R-156 (б). 1 – головний мозок, 2 – печінка, 3 – скелетні м'язи, 4 – серцеві м'язи, 5- нирки, 6 – легені. Молекулярні маси позначено справа. Щури віком 4 доби після народження.

### **Протеолітична деградація N-кадгеринового поліпептиду**

Нами було також досліджено ефект іонів кальцію на протеолітичну деградацію поліпептиду CDH2 з використанням поліклональних антитіл anti-N-cad-cyt та поліклональних антитіл R-156. 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. 13. В присутності 10 мМ ЕДТА чотири поліпептидні зони з молекулярними масами 130, 122, 95 та 85 кДа були визначені з використанням двох видів антитіл, треки 1 та 3. Це свідчить про те, що поліпептиди мають всі

або майже всі амінокислотні залишки С-кінцевої послідовності поліпептиду CDH2. 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 присутності 10 мМ хлориду кальцію поліпептиди з молекулярними масами 130, 95 та 85 кДа антитілами R-156 не визначалися (трек 4). Як зазначалося раніше, поліпептид з молекулярною масою 122 кДа може бути близькородинним кадгерином, наприклад R-кадгерином, який має високу гомологію з С-кінцевою послідовністю поліпептиду CDH2. Отримані дані дозволяють припустити, що за умов експерименту, коли в середовищі концентрація іонів кальцію становила 10 мМ, деградація N-кадгеринового поліпептиду відбувається завдяки дії  $\mu$ -кальпаїнового ензиму, який, на відміну від  $\mu$ -кальпаїну, активується мілімолярними концентраціями хлориду кальцію. В цьому випадку має місце деградація екстрацелюлярного домену CDH2, про що свідчить поява

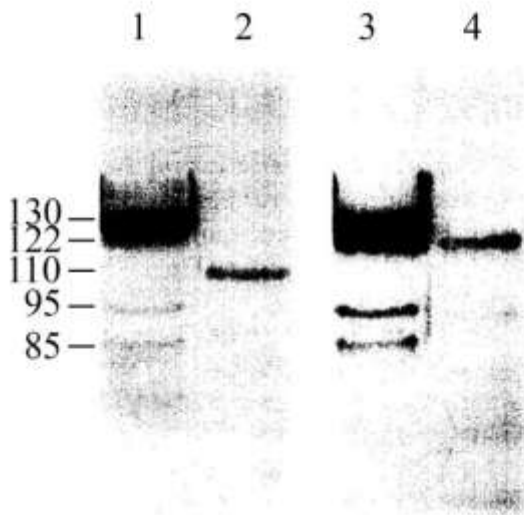


Рис. 13 Вплив іонів кальцію на стабільність поліпептиду CDH2. 1, 3 – препарати головного мозку щурів на базі гомогенатів в буфері, що містив 10 мМ ЕДТА.

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.

поліпептидної зони з молекулярною масою 110 кДа. За умов відсутності кальцію має місце деградація екстрацелюлярного домену, оскільки поліпептиди молекулярними масами 130, 122, 95 та 85 кДа впізнавалися обома типами антитіл.

Як свідчать отримані експериментальні дані, експресія протеїну N-CAM1 може виступати в якості маркера нормального постнатального розвитку та старіння серцевих та скелетних м'язів організму ссавців. Кадгеринова експресія за цих умов не набуває істотних змін. Разом з цим, експонування кадгеринів на поверхні клітин під час ембріогенезу можна розглядати як маркер нормального розвитку певного органу. Нами проведено дослідження експонування протеїну CDH2 під час ембріонального розвитку підшлункової залози людини з використанням імуногістохімічного методу. Визначено, що на 8 тижні

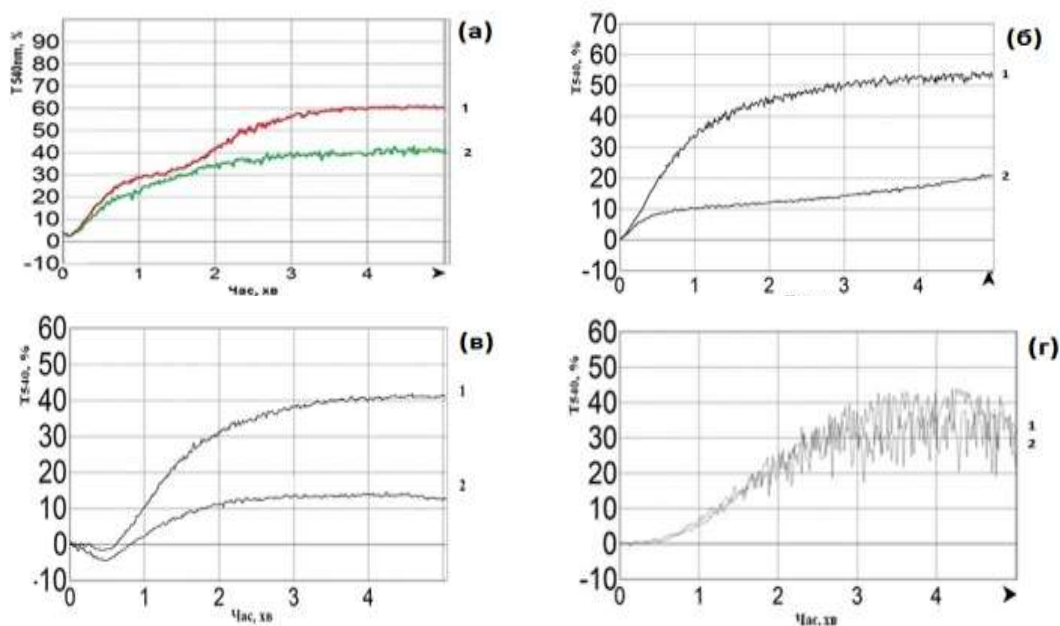
ембріонального розвитку підшлункової залози експресія протеїну CDH2 пов'язана здебільше з протоковими клітинами і периферійними регіонами островків Лангерганса. На дванадцятому тижні ембріонального розвитку підшлункової залози, коли островкові клітини набувають чіткої локалізації, в них теж можна спостерігати експонування протеїну CDH2.

**Роль протеїнів клітинної адгезії імуноглобулінової та кадгерінової родин при формуванні реакції пасивного уникнення у щурів.** Молекули клітинної адгезії є також надзвичайно важливими в процесі формування пам'яті. Закріплення здобутого навика у ссавців пов'язано з підвищенням експресії АП в зоні неокортекса та гіпокампа [Becker C.G. 1996]. Але якщо для АП Ig-родини участь у процесі формування пам'яті вважається доведеною, то роль кадгерінових протеїнів в цьому процесі тривалий час залишалася нез'ясованою [Жерносеков Д.Д., 2000]. На користь залучення протеїну CDH2 до процесу навчання свідчить той факт, що цей протеїн у значній кількості присутній в синаптичних мембранних фракціях мозку, а асоційований з цим кадгеріном бета-катенін є необхідним для консолідації пам'яті у тварин [Bruses J.L., 2006, Maguschak K.A., 2008].

Нами було зроблено спробу висвітлити роль протеїну CDH2 під час формування умовного рефлексу пасивного уникнення (УРПУ). Для вироблення УРПУ була використана модель експерименту, що детально описана в роботі [Жерносеков Д.Д., Неруш П.А. 2000]. Тварин було поділено на 4 групи, котра з яких складалася з двох контрольних та чотирьох експериментальних щурів. 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 протеїну CDH2 (друга група) в соматосенсорну зону кори головного мозку. Експериментальним щурам двох інших груп вводили відповідні антитіла в дорсальну область гіпокампа (третья група – антитіла до N-CAM1, четверта група – антитіла до протеїну CDH2). Тестування придбаного навика тестували через добу після вироблення УРПУ. Результати експерименту показали, що введення антитіл до протеїну N-CAM1 через 6 годин після вироблення реакції пасивного уникнення викликало повну втрату навика у експериментальних тварин першої та третьої груп. Амнезивний ефект у цих тварин зберігався протягом трьох діб. У всіх контрольних тварин цих груп навик уникнення зберігався повністю і тварини не робили спробу зайти в неосвітлену частину камери. Виявилось повне зберігання навика. У всіх експериментальних тварин другої та четвертої груп, яким вводили антитіла до протеїну CDH2 в соматосенсорну зону кори головного мозку та в гіпокамп виявилось повне зберігання навика. Відсутність ефекту N-кадгерінових антитіл можна пояснити наступним чином. Як було зазначено в роботі Maguschak K.A. et al, 2008, зміни, що стосуються бета-катеніну та його асоціації з відповідним кадгеріном є характерними для процесу консолідації пам'яті, проте, як свідчать отримані нами результати, експонування протеїну CDH2 в синаптичних структурах мозку не є критичним для формування навика.

**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 [Lishko V.K., 2004]. При активації тромбоцитів кількість плазміногену, що зв'язується з цими клітинами зростає в декілька разів [Miles L.A., 1985]. До того ж плазміноген здатний утворювати зв'язки з адгезивними протеїнами, що секретуються під час активації та залишаються зв'язаними з тромбоцитарною поверхнею, і, таким чином, може створювати модулюючий вплив на утворення міжклітинних контактів. Glu-плазміноген специфічно зв'язується з плазматичною мембраною різних типів клітин, перетворюється в Lys-форму, що є необхідним як для прискорення швидкості активації, так і виконання ним біологічних функцій. Утворення плазміну на поверхні клітин є універсальним механізмом для всіх типів клітин і забезпечує міграцію, проліферацію, інвазію, гідроліз протеїнів екстрацелюлярного матриксу (ЕСМ), активацію металопротеїназ і факторів росту. Плазміноген/плазмінова система грає вирішальну роль в ремоделюванні клітинної поверхні і протеїнів ЕСМ і тому залучається до регуляції міжклітинних адгезивних контактів та контактів клітина-міжклітинний матрикс. В науковій літературі запропоновано механізми, за якими плазміноген/плазмінова система здатна створювати вплив на адгезивні контакти. Серед них – інгібування адгезії шляхом гідролізу під дією плазміну ламініну, фібрину та фібронектину; сприяння утворенню нових міжклітинних контактів, забезпечуючи міграцію клітин внаслідок протеолітичної дії плазміну; разом з тим Glu- плазміноген здатен приймати участь в міжклітинних контактах в якості полівалентного ліганду [Deryugina E.I., 2012];

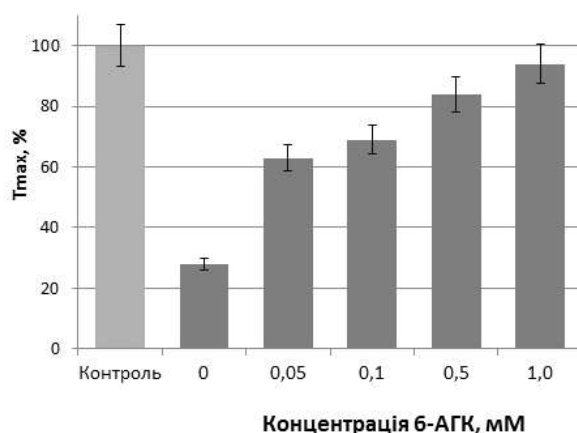
Нами проведено дослідження впливу Glu- та Lys-форм плазміногену на агрегацію тромбоцитів, стимульовану різними агоністами. Ефекти плазміногену на агрегацію тромбоцитів людини досліджували методом оптичної агрегометрії із використанням 2-х модельних систем – ЗТП крові та відмитих тромбоцитів. На рис. 14 наведено типові агрегатограми тромбоцитарної агрегації індуковані різними агоністами в присутності Lys-плазміногену. Додавання до інкубаційної суміші Lys-плазміногену у концентрації 1,2 мкМ, призводить до пригнічення тромбін- та колаген-індукованої агрегації препарату відмитих тромбоцитів.



**Рис. 14.** Вплив Lys-плазміногену на агрегацію тромбоцитів людини, стимульованих різними агоністами (ADP, тромбін, колаген, ристоміцин відповідно): 1 – контрольна агрегація, 2 – Lys-Plg: (а) 6 мкМ, (б-г) 1,2 мкМ.

В обох випадках ступінь та швидкість агрегації знижується приблизно вдвічі. Разом з тим аглютинація тромбоцитів, індукована ристоміцином, не пригнічується Lys-плазміногеном. Таким чином, цей ліганд не чинить інгібувального впливу на адгезивні контакти, що забезпечуються глікопротеїном GP Іb-ІХ-V та фактором фон Віллебранда. Дія Lys-плазміногену спрямована на контакти, які опосередковані взаємодією  $\beta 3$ -інтегринів з їх лігандами. Міжпротеїнові взаємодії плазміногену зазвичай реалізуються за участі LBS, розташованих у 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. Встановлено, 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. 15).

6-АГК виявляє подібний ефект на інгібування Lys-плазміногеном агрегації тромбоцитів, стимульованих колагеном. При цьому, 6-АГК у вказаних концентраціях не впливає власне на процес агоніст-індукованої агрегації. Щоб оцінити внесок серинпротеїназного домену плазміногену в реалізацію



**Рис. 15.** Інгібування Lys-плазміногеном (1,2 мкМ) тромбін-індукованої агрегації відмитих тромбоцитів за присутності 6-аміногексанової кислоти (n = 3). Контроль – тромбін-індукована агрегація.

антиагрегаційного ефекту Lys-плазміногену було проведено серію експериментів з інгібітором серинових протеїназ, апротиніном. Інгібітор використовували в концентрації 5,5 МО/мл. Обрана концентрація апротиніну інгібує активність наномолярної концентрації плазміну в середовищі агрегації, проте не пригнічує власне процес агрегації тромбоцитів, стимульованих тромбіном.

За даними літератури апротинін здатний 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 апротиніну (табл. 1).

Якщо інгібувальний вплив Lys-плазміногену на агрегацію тромбоцитів не обумовлений дією серин-протеазного домену, то цілком імовірно, що така дія опосередковується крингльмісними доменами зимогену. В роботі вивчалася дія крингльмісних 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, визначеній як найбільш ефективна для Lys-плазміногену (1,2 мкМ), а також в 5-кратному надлишку (з огляду на меншу кількість LBS у складі кожного кринглу, порівняно с цілісною молекулою, та їх функціональні відмінності). Використовували крингльмісні фрагменти молекули в якості конкурентів Lys-плазміногену в середовищі агрегації. Для цього перед внесенням Lys-плазміногену (1,2 мкМ) та тромбіну (1 од. NIH/мл) суспензію неактивованих тромбоцитів інкубували протягом 1 хв із препаратами K1-3, K4 або K5 у концентраціях 0,12 - 1,2 мкМ.

Таблиця 1

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

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

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

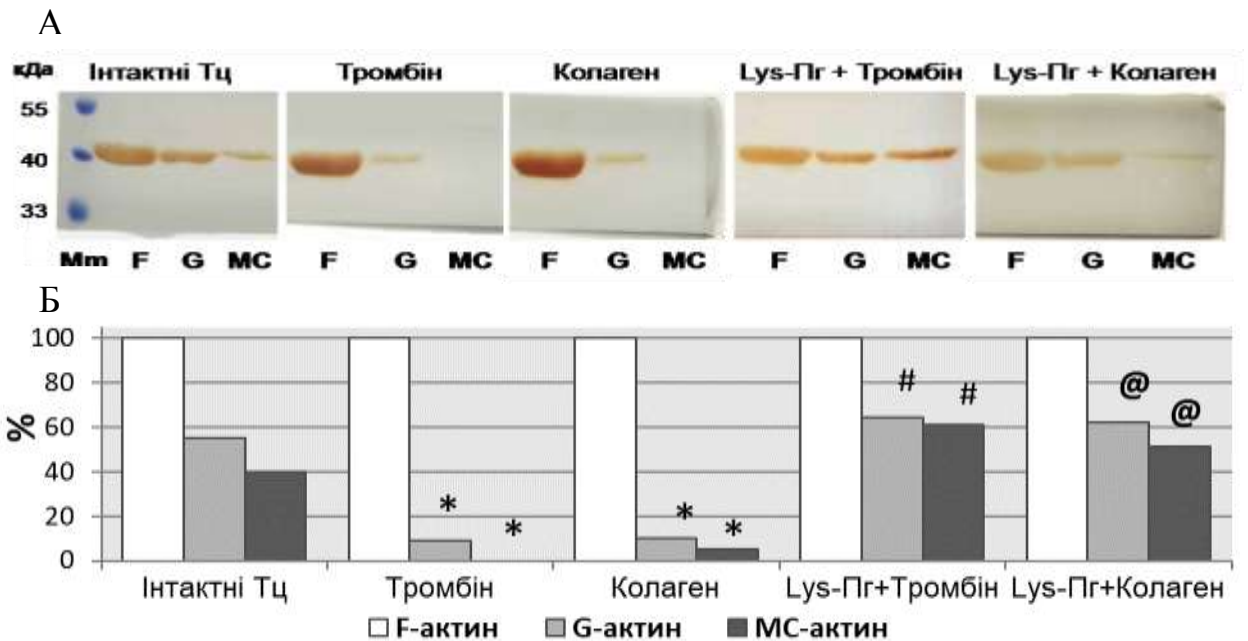
\* - порівняно з показниками «Контрольної агрегації».

Виявилося, що фрагмент плазміногену K5 є найбільш потужним при відновленні агрегації тромбоцитів, яка пригнічувалась Lys-плазміногеном. Крім того, в присутності еквімолярних концентрацій K5 та Lys-плазміногену спостерігається тенденція до незначної стимуляції агрегації. Конкурентна здатність крингльмісних фрагментів плазміногену є свідченням тотожності їх сайтів зв'язування з такими для Lys-плазміногену та, можливо, між собою.



Таким чином, Lys-плазміноген, який на відміну від Glu-форми має відкриту конформацію, виявляє інгібувальну дію на агрегацію тромбоцитів, індуковану ADP, тромбіном та колагеном. Інгібувальний ефект Lys-форми зимогену опосередкований LBS його кринглових структур і є специфічним, оскільки не визначається в разі адгезивних контактів, що забезпечуються глікопротеїном GP Ib-IX-V та фактором фон Віллебранда.

**Вплив плазміногену на перебудову актинового цитоскелету тромбоцитів за їх активації.** 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 сигналіngu, а також бере участь у реалізації означених процесів клітинної відповіді. Особливу роль у ході



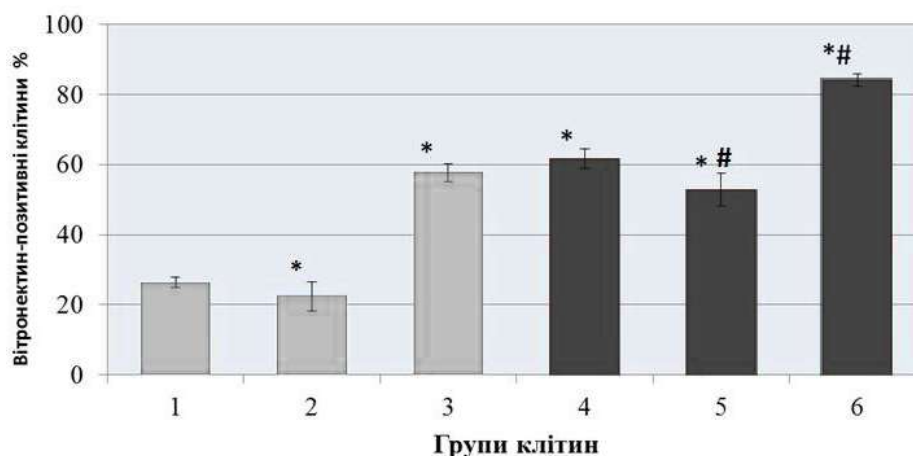
**Рис. 16.** Вплив Lys-плазміногену на перебудову актинового цитоскелету тромбоцитів за їх активації тромбіном і колагеном: **А** – імуноблот активних протеїнових фракцій інтактних та активованих тромбоцитів, **Б** – відносний вміст форм актину тромбоцитів у протеїнових фракціях (\* –  $P < 0,05$  порівняно з групою «Інтактні Тц»; # –  $P < 0,05$  порівняно з групою «Тромбін»; @ –  $P < 0,05$  порівняно з групою «Колаген»), Мт – маркери молекулярної маси; F – філаментний актин; G – глобулярний актин; MC – актин мембранного кортексу, Тц – тромбоцити.

активації і агрегації тромбоцитів відіграє мембранний кортекс, сформований з коротких актинових філаментів у комплексі з актин-асоційованими протеїнами (спектрином, вінкуліном, таліном,  $\alpha$ -актиніном, кіндліном та ін.). Результати імуноблотингу і дані денситометричного аналізу зображень блотів, вказують на те, що в неактивованих тромбоцитах актин представлено у трьох формах:

вміст G-актину й МС-актину складає близько 55 та 40% відносно кількості F-форми, відповідно (рис. 16, А та Б, група «Інтактні Тц»).

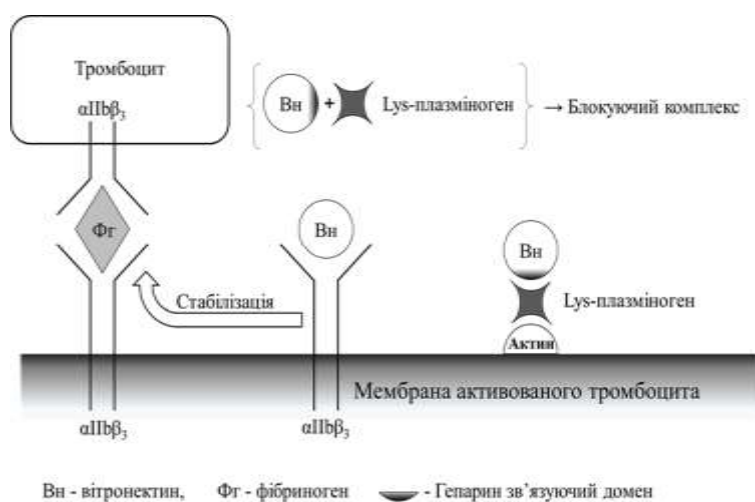
Активація тромбоцитів тромбіном та колагеном призводить до суттєвого зменшення пулів G- та МС-актину. Результати кількісного аналізу показали, що вміст G-актину у активованих тромбоцитах, знижується до 10% відносно кількості F-форми, тоді як пул МС-актину є практично відсутнім (рис. 16, групи «Тромбін» та «Колаген»). Таке 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. Як свідчать наведені дані, Lys-плазміноген перешкоджає перебудові актинового цитоскелету тромбоцитів, стимульованих тромбіном та колагеном, що може бути одним із механізмів антиагрегаційної дії Lys-плазміногену.

**Вплив плазміногену на експонування вітронектину на поверхні тромбоцитів за умов їх активації.** При вивченні адгезивних зв'язків між активованими тромбоцитами було доведено, що для ефективної агрегації необхідний зв'язок інтегринового рецептора не тільки з фібриногеном, але й з іншими лігандами. Як було показано раніше, вітронектин, який секретується з альфа-гранул тромбоцитів під час активації і залишається зв'язаний з поверхнею цих клітин, є важливим для формування адгезивного міжтромбоцитарного зв'язку [Reheman A., 2005]. Нами була зроблена спроба виявити вплив двох форм плазміногену на експонування вітронектину на поверхні тромбін-стимульованих тромбоцитів. Представлені дані характеризують експонування вітронектину на поверхні інтактних і тромбін-стимульованих відмитих тромбоцитів (Рис. 17). Коли Lys-плазміноген знаходився в інкубаційному середовищі з інтактними тромбоцитами, було відмічено зростання вітронектин-позитивних клітин. Введення Glu-плазміногену не мало ефекту (Рис. 17). 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. За умов попередньої інкубації суспензії тромбоцитів з Lys-плазміногеном і подальшої активації тромбіном виявлено значне зростання кількості вітронектин-позитивних клітин. У випадку Glu-плазміногену не було істотних змін у кількості вітронектин-позитивних клітин, порівняно із випадком стимулювання тромбіном без попередньої інкубації з плазміногеном. 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. 18. Під час вивільнення альфа-гранул з тромбоцитів секретується олігомерна форма вітронектину, половина якого залишається зв'язаною із клітинною поверхнею [Parker C.J., 1989].



**Рис. 17.** 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».

Зв'язування цієї форми вітронектину з Lys-плазміногеном може спричинити зміни в гепарин-зв'язуючому сайті адгезивного протеїну, а такі зміни безпосередньо впливають на адгезивні властивості вітронектину. Імовірно, що утворений комплекс вітронектин- Lys-плазміноген, не буде зв'язуватись з інтегрином  $\alpha IIb\beta_3$  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  $\alpha IIb\beta_3$  є умовою для формування стабільного міжтромбоцитарного контакту за участю фібриногену. З іншого боку, відомо, що при активації тромбоцитів збільшується кількість сайтів для зв'язування плазміногену, а один із рецепторів плазміногену це –



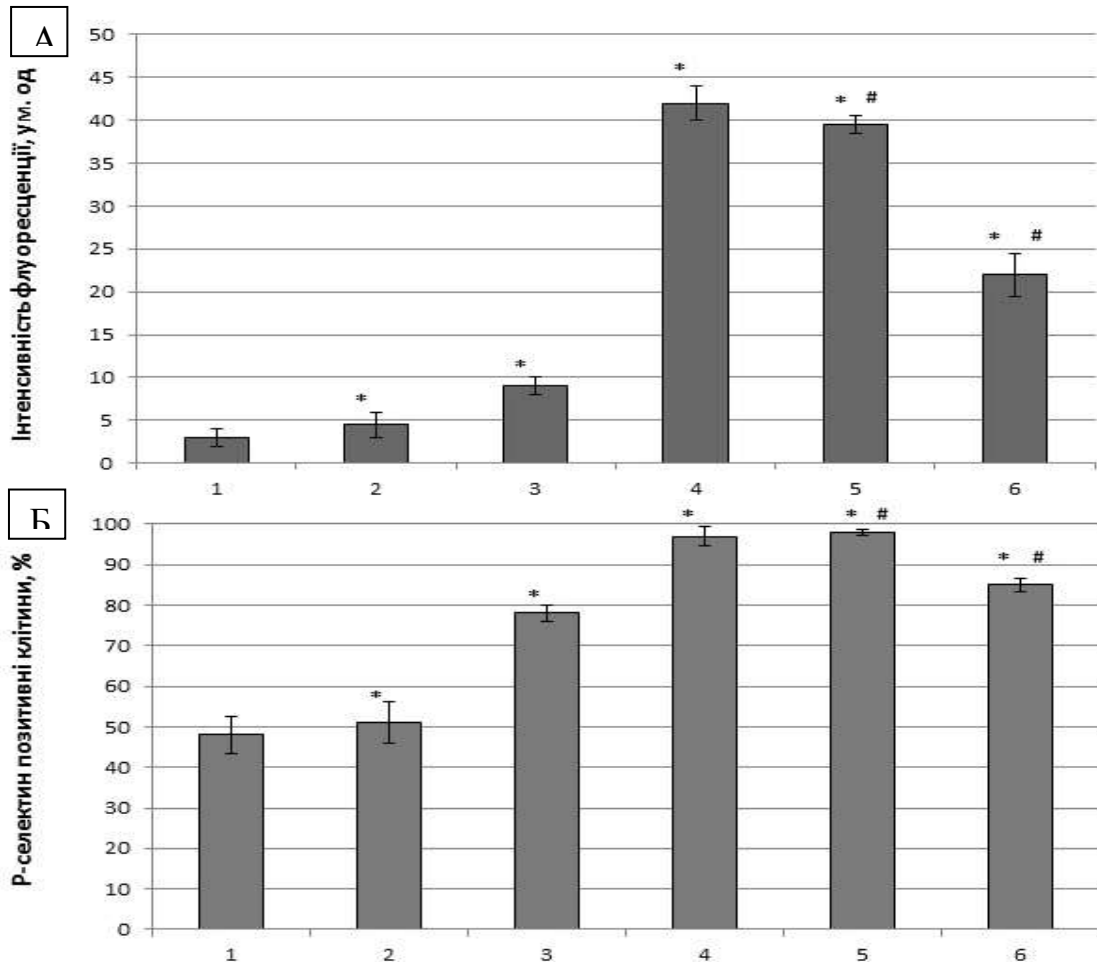
**Рис. 18.** Схема експонування вітронектину на поверхні активованого тромбоцита.

поверхневий актин, який з'являється на мембрані тромбоцитів внаслідок активації [George J.N., 1980 Tykhomyrov A.A., 2017]. В свою чергу, актин виявляє різну спорідненість до форм плазміногену. Lys-плазміноген має набагато кращу спорідненість до актину порівняно з Glu-плазміногеном [Roka-Moya Y.M., 2014]. Можна припустити, що Lys-

плазміноген зв'язується з поверхневим актином (або з іншим поверхневим рецептором) і водночас утворює зв'язок з вітронектином, який вивільнився з альфа-гранул внаслідок активації. Оскільки, за даними літератури, спорідненість вітронектину до Lys-плазміногену набагато вища, порівняно з нативною формою проензиму, то спостерігається ефект збільшення кількості вітронектин-позитивних клітин. Така послідовність подій можлива за умови, якщо у формуванні зв'язку з вітронектином та актином задіяні різні кринглові структури молекули Lys-плазміногену. Таким чином, модулюючий вплив Lys-плазміногену на експонування вітронектину на поверхні активованих тромбоцитів можна пояснити за рахунок утворення бівалентного зв'язку проензиму з поверхневим рецептором та секретованим вітронектином.

**Вплив плазміногену на експонування P-селектину на поверхні активованих тромбоцитів.** Наступним етапом було дослідження ефектів плазміногену на експонування P-селектину на поверхні тромбоцитів. При утворенні міжтромбоцитарних адгезивних контактів P-селектин відіграє важливу роль. За даними літератури P-селектин створює стабілізуючий ефект на утворення тромбоцитарних агрегатів [Merten M., 2000]. Вважають, що стабілізуючий ефект P-селектину реалізується після утворення зв'язку інтегрину  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  з фібриногеном. Для P-селектину знайдено декілька рецепторних молекул на поверхні тромбоцитів, але найбільш вірогідними рецепторними молекулами P-селектину, які беруть участь в утворенні міжтромбоцитарних зв'язків є гангліозиди, що містять залишок тетрасахаридів [Cooling L.L., 1995]. Оскільки P-селектин-вуглеводний зв'язок є досить міцним і здатний витримувати значне навантаження, вважають, що саме йому належить головна роль в стабілізації тромбоцитарних агрегатів [Alon R., 1995]. Проведені нами дослідження експресії P-селектину на поверхні тромбоцитів з використанням цитометричного аналізу дозволили виявити наступне. Як видно з рис. 19, частка P-селектин-позитивних клітин у препаратах інтактних тромбоцитів становила  $48 \pm 4,6$  % від їх загальної кількості (10 000 клітин, які відбиралися для аналізу). Активація тромбоцитів тромбіном в наших експериментах супроводжувалася зростанням кількості P-селектин-позитивних клітин майже вдвічі, інтенсивність їх флуоресценції також достовірно підвищувалася (Рис. 19 Б). Вплив Lys-плазміногену призводить до статистично вірогідного зростання пулу тромбоцитів, що презентують P-селектин. Можна зробити припущення, що під дією Lys-плазміногену відбувається часткове вивільнення тромбоцитарних альфа гранул. Якщо інтактні тромбоцити інкубувати з Lys-плазміногеном з наступною активацією тромбіном, то це призводить до зниження кількості P-селектин-презентуючих тромбоцитів порівняно з групою агоніст-активованих клітин, та значного зниження інтенсивності флуоресценції (Рис. 19). Разом з тим, предінкубація інтактних тромбоцитів з Glu-плазміногеном та наступною активацією тромбіном не мала суттєвого впливу на кількість P-селектин-позитивних клітин або на інтенсивність флуоресценції. 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.



**Рис. 19.** 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. НІН/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».

Таким чином, в роботі показано, 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, певною мірою модулюються завдяки компонентам, циркулюючим в кровотоці, а саме – елементам плазміноген/плазмінової системи.

## 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 P-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 НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. 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).*
2. 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).*
3. Andersson A-M., Olsen M., Zhernossekov D., Gaardsvoll H., Krog L., Linnemann D., Bock E. Age-related changes in expression of neural cell adhesion molecule in skeletal muscle: a comparative study of newborn, adult and aged rats / A-M Andersson., *Biochem.J*. 1993. 290(Pt 3):641 – 648. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
4. 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).*
5. Недзвецький В. С., Жерносеков Д. Д., Кириченко С. В., Спіріна І. Д., Фенева Я. Є. Ідентифікація аутоантитіл, які реагують з цитоскелетними і мембранними білками при нервово-психічних розладах. *Вісник ДНУ ім. О.Гончара*. 2000. Біологія. Випуск 7. С. 246-250. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, 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. Нейроспецифічні білки та пам'ять. *Нейрофізіологія*. 2000. 32(5):397 – 401. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*
8. Жерносеков Д. Д. Неруш П. А. Роль белков клеточной адгезии N-CAM1 и N-кадгерина при выработке реакции избегания у крыс // *Нейрофізіологія*. 2000. 32(6):421 – 423. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
9. Жерносеков Д. Д. Адгезивные белки в процессе воспаления // *Біополімери і клітина*. 2007. 23(6):483–488. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*

10. Жерносеков Д. Д., Куркіна Т. В. Протеїн С: механізми функціонування та методи одержання // Біотехнологія. 2008. 1(4):9-17. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку)*.
11. Жерносеков Д. Д. Экспрессия нейроспецифических белков клеточной адгезии при опухолевом росте // Біологічний вісник ХНУ ім. В.Н. Каразіна. 2001. Физиология и биохимия животных. 5(1-2): 92-94. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку)*.
12. Жерносеков Д. Д. Золотарева Э. Н., Кондратюк А. С. Структурно-функциональные особенности ингибитора активатора плазминогена ПАИ-1. *Biorpolimers and Cell*. 2010. 26(5):255–264. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку)*.
13. Рока-Мойя Я. Жерносеков Д., Золотарьова Е., Гриненко Т. Вплив екзогенного Ліз-плазміногену на АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів // Вісник КНУ ім. Т. Шевченка. 2011. Біологія. № 58: 34–46. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку)*.
14. Жерносеков Д. Д. Золотарева Э. Н. Структурно-функциональная характеристика витронектина и его роль в системе гемостаза. *Biorpolimers and Cell*. 2011. 27(4):258–263. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку)*.
15. Рока-Мойя Я. М., Жерносеков Д. Д., Гриненко Т. В. Вплив плазміногену/плазміну на агрегаційну здатність тромбоцитів. *Biorpolimers and Cell*. 2012. 28(5):352–356. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку)*.
16. Жерносеков Д. Д., Юсова Е. И., Гриненко Т. В. Роль плазминоген/плазмина в функционировании клеток крови. *Український біохімічний журнал*. 2012. 84(4):5-19. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку)*.
17. Рока-Мойя Я. М., Жерносеков Д. Д., Кондратюк А. С., Гриненко Т. В. Розробка та оптимізація методів визначення активності інгібітора активатора плазміногену 1-го типу в плазмі крові. *Український біохімічний журнал*. 2013. 85(4):111–118. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку)*.
18. Тихомиров А. О., Жерносеков Д. Д., Рока-Мойя Я. М., Діордієва С. І., Гриненко Т. В. Вплив Lys-форми плазміногену на реконструкцію актинового цитоскелету тромбоцитів. *Фізіол. журн*. 2014. 60(1):25–33. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку)*.
19. Roka-Moya Y. M. Zhernossekov D. D, Yusova E. I., Kapustianenko L. G., Grinenko T. V. The study of the sites of plasminogen molecule which are responsible for inhibitory effect of Lys-plasminogen on platelet aggregation. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2014. 86(5):80–87. *(Особистий внесок:*



- проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
20. Roka-Moya Y. M., Vilous V. L., Zhernossekov D. D., Grinenko T. V. Novel aspects of platelet aggregation. *Biopolimers and Cell*. 2014. 30(1):10–15. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*
  21. Zhernossekov D.D. Roka-Moya Y. M., Tykhomyrov A.A., Grinenko T.V. Lys-plasminogen stimulates vitronectin exposure on the platelet surface. *Biopolimers and Cells*. 2015. 31(2):104-108. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
  22. Тихомиров А. О. Жерносеков Д. Д., Рока-Мойя Я. М., Діордієва С. І., Гриненко Т. В. Вплив Lys-форми плазміногену на секрецію тромбоцитів людини. *Український фізіологічний журнал*. 2015. 61(6):26–34. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
  23. Zhernossekov D.D. Roka Moiiia Y. M., Grinenko T.V. Extracellular annexins in hemostasis system. *Biopolymers and Cell*. 2016. 32(2):98-104. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*
  24. Zhernossekov D. D. Roka-Moiiia Y. M., Tykhomyrov A. O., Guzyk M. M, Grinenko T. V. Glu- and Lys-forms of plasminogen differentially affect phosphatidylserine exposure on the platelet surface. *Ukr. Biochem. J*. 2017 (89), special issue P. 103-111. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
  25. Tykhomyrov A. O. Zhernossekov D. D., Grinenko T. V. Surface-exposed actin binds plasminogen on the membrane of agonist-activated platelets: a flow cytometry study. *Biopolymers and Cell*. 2017. 33(3):172-182. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
  26. Жерносеков Д.Д. Структурно-функциональные особенности нейроспецифических адгезивных белков иммуноглобулинового семейства // *Биополимеры и клетка*. 1999. 15(62):143 – 147. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*
  27. 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).*
  28. Чещевик В.Т., Жерносеков Д.Д. Тромбоцитарная агрегация. Механизм участия адгезивных молекул и митохондрий. *Веснік Палескага дзярж. ун-та. Серыя прыродазнаўчых навук*. 2017. № 2:51–61. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*

29. Жерносеков Д.Д. Роль адгезивних білків у процесі нормального і патологічного тромбоутворення. *Лабораторна діагностика*. 2007. 2(40): 72–75. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку)*.
30. Жерносеков Д. Д. Экспрессия нейронального белка клеточной адгезии N-CAM1 при старении. *Збірник наукових праць Луганського національного аграрного університету*. 2003. 37(25):72–73. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку)*.
31. Жерносеков Д. Д. Действие стрессовых факторов на процесс обучения животных. *Вісник Луганського національного педагогічного університету*. 2002. 51(7):58–62. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку)*.
32. Сопин Е. О., Жерносеков Д. Д. Влияние тяжелых металлов на функцию белков клеточной адгезии в тканях млекопитающих. *Вісник Луганського національного педагогічного університету*. 2005. 86(6):143–149. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку)*.
33. Спіріна І. Д. Фенева Я. Є., Бреславська Ю. М., Жерносеков Д. Д., Недзвецкий В. С. Наявність аутоантіл до нейроспецифічних білків у сироватці хворих з різними формами шизофренії / І. Д. Спіріна, Медичні перспективи. 1999. 4(2):46-47. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку)*.
34. Жерносеков Д. Д. Гайдар Ю. А., Тихомиров 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)*.
35. Жерносеков Д. Д. Золотарьова Е. М., Рока-Мойя Я. М. Пошук впливу плазміногену на агрегаційну здатність тромбоцитів. *X Український біохімічний з'їзд, Одеса, Україна, 13-17 вересня 2010 р.: Український біохімічний журнал*. 2010. 82(4, додаток 1):66. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку)*.
36. Roka-Moia Y. Tykhomirov A. A., Guzyk M., Grinenko T. Glu- and Lys-forms of plasminogen distinctly affect platelet aggregation, secretion and phosphatidylserine exposure. 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)*.
37. Рока-Мойя Я. М. Жерносеков Д. Д., Гриненко Т. В. Вплив компонентів плазміноген-плазмінової системи на агрегацію та секрецію тромбоцитів. «Молодь та поступ біології»: VIII Міжнародна наукова конференція

- студентів та аспірантів, Львів, Україна, 3-6 квітня 2012 р.: Збірник тез. Львів, 2012. С. 71-72. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
38. Рока-Мойя Я. М. Плазміноген модулює зв'язування екзогенного анексину V тромбоцитами людини. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2016. 88(4):114. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
  39. Жерносеков Д. Д. Регуляция функциональной активности тромбоцитов человека компонентами плазминоген-плазминовой системы. 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).*
  40. Roka-Moya Y.M., Zhernossekov D. D., Grinenko T. V. Inhibitory effect Lys-plasminogen on washed platelet aggregation induced by different. 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).*
  41. Bilous V., Roka-Moiiia Y. M. Zhernossekov D. D. Concerning the mechanism of inhibitory effect of Lys-plasminogen on the aggregation of human platelets. Inderdisciplinary scientific conference «Adaptation strategies of the living systems». Kyiv. 2014. P. 4-5. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
  42. Roka-Moiiia Y. M. Zhernossekov D. D., Grinenko T. V. Platelets as regulators of plasminogen activation system. 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).*
  43. Рока-Мойя Я.М., Жерносеков Д. Д., Гриненко Т. В. Про механізм інгібувального ефекту Lys-плазміногену на агрегацію тромбоцитів людини. Конференція-конкурс молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології», Київ, Україна, 6-7 червня 2013 р.: Український біохімічний журнал. 2013. 85(4):147. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
  44. Рока-Мойя Я.М. Жерносеков Д. Д., Рыбачук В. Н., Гриненко Т. В. 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, 2013. С. 247–251. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
  45. Roka-Moya Y. M. Zhernossekov D. D. , Grinenko T. V. Effect of Lys-plasminogen on platelet functions. 38<sup>th</sup> FEBS Congress, Saint Petersburg, Russia,

- July 6-11 2013: FEBS Journal. 2013. 280(1):195. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
46. Рока-Мойя Я. М. Роль доменів плазміногену в забезпеченні інгібування Lys-плазміногеном агрегації тромбоцитів. Матеріали XI Українського біохімічного конгресу Київ. 2014. С. 76. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
  47. Гриненко Т. В. Плазміноген/плазмінова система. Нові уявлення про фізіологічну та патофізіологічну роль. Матеріали XI Українського біохімічного конгресу Київ. 2014. С. 21. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
  48. Білоус В. Л. Рока-Мойя Я., Жерносеков Д. Д. Ефекти плазміногену та гепарину на агрегацію та секрецію тромбоцитів людини. 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).*
  49. Roka-Moïia Y. M. Zhernossekov D. D., Grinenko T. V. Inhibitory effect of Lys-plasminogen on washed platelet aggregation induced by different agonists. VIII Miedzynarodowej naukowi-praktycznej konferencji «Aktualne problemy nowoczesnych nauk – 2012», Przemysl. 2012. P. 20-27. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
  50. Жерносеков Д. Д. Золотарьова Е. М., Рока-Мойя Я. М. Пошук впливу плазміногену на агрегаційну здатність тромбоцитів людини // Ukrainian Biochemical Journal. 2010. 82(4):66. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
  51. Тихомиров А. А. Ангиостатины: генерация и роль в норме и патологиях, ассоциированных со старением // Ukrainian Biochemical Journal. 2006. 78(3):60-61. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
  52. Sopin Y. O. Zhernossekov D. D. Influence of metal ion on the function of cell adhesion molecules in the nervous tissue. Нейронауки: теоретичні та клінічні аспекти, Донецьк. 2005. 1(1):114. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*
  53. Жерносеков Д. Д. Экспрессия кальций-зависимого адгезивного белка N-кадгерина в процессе развития и старения тканей животных. 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).*
  54. Котельник О. А. Экспрессия нейроспецифического адгезивного белка N-CAM1 в структурах мозга крыс при гемолитической анемии.

- Фізіологічний журнал. 2002. 48(2):25-26. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
55. Zhernossekov D. D. Nerush P. A., Gritsan V. U. The role of neural cell adhesion molecule N-CAM1 in aging processes. Матеріали V Міжнародного симпозиума "Биологические механизмы старения" Харьков. 2002. С. 49. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
56. Zhernossekov D. D. Nerush P. A., Gritsan V. U. Role of N-cadherin in animals' learning process. Архив клинической и экспериментальной медицины. 2001. 10(2):157. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
57. Недзвецкий В. С., Жерносеков Д. Д., Кіріченко С. В. Нейроспецифічні білки проміжних філаментів нейронів та гліальних клітин і молекули адгезії клітин при пошкодженнях нервової тканини. Матеріали V Міжнародної конференції «Франція та Україна, науково-практичний досвід у контексті діалогу національних культур», Дніпропетровськ. 1998. № 2:82-83. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
58. Недзвецкий В. С. Нейроспецифічні білки цитоскелета та адгезії нервових клітин при нейроектомії / В. С. Недзвецкий, 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).*
59. Zhernossekov D. D. Nedzvetsky V. S., Tikhomiroff A. A. Etude des proteines neurospecifiques dans les regions du cerveau responsables de formation de la memoire. Матеріали IV Міжнародної конференції «Франція та Україна, науково-практичний досвід у контексті діалогу національних культур», Дніпропетровськ. 1997. № 2:126. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
60. Zhernossekov D. D. Immunohistochemical study of N-cadherin in developing human pancreas. European HPB Surgery. 1995. 9(1):146. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*
61. Chornaya V. Neurospecific proteins in the presence of risk factors at children. 23<sup>th</sup> Meeting of FEBS. 1995. P. 163. *(Особистий внесок: пошук та аналіз літературних та власних даних, підготовка матеріалів до друку).*
62. Березин В. А. Экспрессия нейроспецифических белков клеточной адгезии (N-CAM1) и промежуточных филаментов (ГФКБ) в перевиваемых крысиных глиомах. Функции нейроглии. Тбилиси: Мецниереба. 1993. С. 259 – 265. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).*

63. Білоус В. Л., Рока-Мойя Я. М., Жерносеков Д. Д., Юсова О. І., Капустяненко Л. Г., Гриненко Т. В. 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. 2013. С. 76. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку)*.
64. Roka-Moia Y.M., Kapustianenko L. G., Zhernossekov D. D., Yusova E. I., Grinenko T. V. 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, P65. 2013. P. 94. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку)*.
65. Рока-Мойя Я. М. Білоус В. Л., Жерносеков Д. Д., Рыбачук В. Н., Гриненко Т. В. Разработка и валидация метода определения активности ингибитора активатора плазминогена 1 типа в плазме крови. «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)*.
66. Roka-Moia Y. M. Zhernossekov D. D. Mechanism of inhibition of human platelet aggregation by Lys-plasminogen. I Congress «BIO 2014», Warsaw, Poland, September 9-12 2014: Acta Biochimica Polonica. 2014. 61(Sup. 1):159. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку)*.
67. 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. 86(5, додаток 1):76. *(Особистий внесок: проведення досліджень, оброблення та аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку)*.

## АНОТАЦІЯ

**Жерносеков Д.Д. Поліфункціональна роль адгезивних протеїнів в міжклітинних контактах 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 ім. О.В. Палладіна 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. Для протеїну N-CAM1 досліджено експресію додаткових екзонів в скелетних та серцевих м'язах щура під час постнатального розвитку. 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 N-CAM1 серцевих м'язів, в скелетних м'язах практично не визначався. Зроблено висновок про тканиноспецифічну експресію цього екзону. 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.

Досліджено експресію N-кадгерінового поліпептиду в тканинах щура. На відміну від N-CAM1 не виявлено суттєвих змін в експресії мРНК кадгерінового протеїну під час постнатального розвитку скелетних та серцевих м'язів щура. Показано, що кальцій-залежна адгезія в тканинах ссавців реалізується завдяки певного набору близькородинних кадгеринів, причому кожен з досліджуваних кадгеринів має специфічний тканинний розподіл.

Використання моделі вироблення умовного рефлексу пасивного уникнення не показало критичної ролі протеїну CDH2 в процесі навчання. Виявлено, що блокування кадгерінових протеїнів за допомогою антитіл в структурах гіпокампу та кори головного мозку не є критичним для формування навику 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 LBS його кринглових структур. Не виявлено інгібувального впливу Lys-плазміногену на адгезивні контакти, що забезпечуються глікопротеїном GP Ib-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 P-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.

## АННОТАЦІЯ

**Жерносеков Д.Д. Полифункциональная роль адгезивных белков в формировании межклеточных контактов в тканях млекопитающих в онтогенезе и при патологических состояниях.** – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.04 – Биохимия. Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины. – Киев, 2019.

Работа посвящена роли адгезивных белков при нормальном развитии и при функциональных нарушениях в организме млекопитающих.

Исследована экспрессия нейронального белка клеточной адгезии N-CAM1 в онтогенезе скелетных мышц. Определены мРНК, которые отвечают за синтез изоформ белка N-CAM1 в скелетных и сердечных мышцах. Показано, что во время постнатального развития скелетных и сердечных мышц экспрессия мРНК, которые кодируют белок N-CAM1 снижается, а при старении – повышается. Исследована экспрессия дополнительных экзонов в транскриптах N-CAM1 в скелетных и сердечных мышцах крысы в различные сроки постнатального развития. Установлено, что экспрессия этих экзонов наблюдается в мРНК, которые имеют размер 5,2 та 2,9 кб. Показано, что экзон VASE, для которого характерна экспрессия в мРНК сердечных мышц, в скелетных мышцах практически не определялся. Сделан вывод о тканеспецифической экспрессии этого экзона в мРНК N-CAM1. Исследован полипептидный состав изоформ белка N-CAM1 в скелетных и сердечных мышцах крысы. Показано, что количество белка N-CAM1 в скелетных и сердечных мышцах изменяется в соответствии с возрастом животного: наблюдается снижение в период постнатального развития и повышение при старении, что свидетельствует о вовлечении этого белка в компенсаторные механизмы, свойственные мышцам при старении животных.

Исследована экспрессия N-кадгеринового полипептида в тканях крысы. В отличие от белка N-CAM1 не выявлено существенных изменений в экспрессии



мРНК N-кадгерина в различные сроки постнатального развития скелетных и сердечных мышц. Показано, что кальций-зависимая адгезия в тканях млекопитающих реализуется благодаря определенному набору близкородственных кадгеринов, причем каждый из исследуемых кадгеринов имеет тканеспецифическое распределение. Показано, что в тканях млекопитающих N-кадгерин представлен главным образом полипептидом с молекулярной массой 130 кДа. Использование модели формирования условного рефлекса пассивного избегания не показало критической роли N-кадгерина в процессе обучения. Блокирование кадгериновых белков с помощью антител в структурах гиппокампа и коры головного мозга не было критичным для формирования навыка у исследуемых животных.

Показано модулирующее влияние плазминоген/плазминовой системы на формирование адгезивных контактов между тромбоцитами. Lys-плазминоген, в отличие от Glu-формы, оказывает ингибирующее действие на агрегацию тромбоцитов, индуцируемую ADP, тромбином и коллагеном. Показано, что ингибирующий эффект Lys-формы зимогена опосредован LBS его крингловых структур. Ингибирующего влияния Lys-плазминогена на адгезивные контакты, обеспечиваемые гликопротеином GP Ib-IX-V и фактором фон Виллебранда не выявлено. Установлено, что Lys-плазминоген нарушает перестройку актинового цитоскелета тромбоцитов, стимулированных тромбином и коллагеном, что может быть одним из механизмов антиагрегаторного и антисекреторного действия Lys-плазминогена, поскольку показано, что предварительная инкубация клеток с Lys-плазминогеном с последующей активацией тромбином приводит к снижению количества P-селективных тромбоцитов. Доказано модулирующее влияние Lys-плазминогена на экспонирование адгезивного белка витронектина на поверхности активированных тромбоцитов. Предложен механизм бивалентного связывания Lys-плазминогена с поверхностным рецептором и витронектином, который высвобождается из альфа-гранул при тромбоцитарной активации.

Таким образом, доказано, что в организме млекопитающих функциональные изменения в тканях на определенных этапах развития организма связаны с изменениями в экспрессии специфических адгезивных белков. Адгезивные взаимодействия между тромбоцитами, которые обеспечивают функциональное назначение этих клеток, регулируются плазминоген/плазминовой системой.

**Ключевые слова:** белки клеточной адгезии, межклеточные контакты, плазминоген/плазминовая 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. The classes of m-RNA 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 minor exons was investigated in rat skeletal and heart tissue at postnatal development and aging. It was found that this expression was related with m-RNA of 5.2 and 2.9 kb. It was shown that VASE exon, which was expressed 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 expression of N-cadherin in rat tissues was investigated. Unlike N-CAM1 expression, there were no significant changes in N-cadherin m-RNA expression at all ages of skeletal and heart rat tissues. The classes of m-RNA which are responsible for N-, E- and P-cadherin expression in brain, liver, kidney, lung, heart and skeletal muscles were determined. We concluded that each of the investigated cadherins was characterized by tissue-specific distribution. The analysis of N-cadherin polypeptide isoforms in rat tissues showed the presence of the main isoform with molecular mass 130 kDa. 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 of on the adhesive contacts which were mediated by GP Ib-IX-V and von Willebrand factor. 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 antiselective 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.