

Міністерство освіти і науки України
Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара

*Присвячено 100-річчю
Дніпровського національного університету
імені Олеся Гончара*

МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ МІЖКЛІТИННОЇ КОМУНІКАЦІЇ

Монографія
За редакцією професора *Г. О. Ушакової*

Дніпро
ЛІРА
2018

УДК 577, 616

Автори: Г. О. Ушакова, В.С. Недзвецький, С. В. Кириченко

Рецензенти: д-р біол. наук, проф. *Н. О. Сибірна*

(Львівський національний університет імені Івана Франка);

д-р біол. наук, проф. *А.І. Шевцова*

(ДЗ «Дніпропетровська державна медична академія МОЗ України»)

*Друкується за ухвалою Вченої ради Дніпровського національного університету
імені Олеся Гончара (протокол № 6 від 21 грудня 2017 р.)*

М 75 Молекулярні механізми міжклітинної комунікації : монографія
[Г. О. Ушакова, В. С. Недзвецький, С. В. Кириченко] ; за ред. проф.
Г. О. Ушакової. – Дніпро: ЛІРА, 2018. – 216 с.

ISBN 978-966-981-161-5

Висвітлено молекулярні особливості формування простих та складних міжклітинних контактів та характеристику їх головних складових. Монографія складається з 5-ти розділів. Наведена сучасна класифікація компонентів цитоскелета, міжклітинного матриксу, адгезивних та адапторних протеїнів. Визначена особливість комунікації через ядерну мембрану. Схарактеризовано механізми порушення міжклітинної комунікації у серці, гладеньких м'язах, печінці, центральній та периферичній нервовій системі. Висвітлено молекулярних механізм міжклітинної комунікації за допомогою екзосом.

Для науковців, клініцистів і студентів природничих та медичних університетів, які спеціалізуються в галузі клітинної біології, біохімії, нейробіології.

© Ушакова Г. О., Недзвецький В. С., Кириченко С. В., 2018

© Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара, 2018

© Ліра, 2018

ISBN 978-966-981-161-5

ЗМІСТ

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ	4
ВСТУП	7
Розділ 1. Типи міжклітинної взаємодії	8
1.1 Прості неспеціалізовані міжклітинні контакти	11
1.2 Складні контакти	12
Розділ 2. Складові, що формують міжклітинні контакти	17
2.1 Компоненти цитоскелета	17
2.2 Молекули клітинної адгезії	27
2.3 Компоненти міжклітинного матрикса	40
2.3.1 Глікозаміноглікани	42
2.3.2 Взаємодія глікозаміногліканів із молекулами внутрішньоклітинного та позаклітинного матриксу ...	53
Розділ 3. Молекулярна будова ядерної мембрани	80
3.1 Протеїновий склад ядерної оболонки хребетних	84
3.2 Ядерно-поровий комплекс	85
3.3 Транспорт через ядерні пори	88
3.4 Ядерні глікозаміноглікани	89
3.5 Ядро та проміжні філаменти	90
3.6 Динаміка ядерної оболонки в мітозі	91
Розділ 4. Міжклітинні взаємодії за патології	95
4.1 Міжклітинні взаємодії в міокарді	95
4.2 Зміна міжклітинних контактів у периферичній нервовій системі	103
4.3 Порушення нервово-м'язового синапса при аутоімунній міастенії	114
4.4 Пластичність міжклітинних контактів у нервовій системі	118
4.5 Особливості міжклітинних контактів гладенької мускулатури	123
4.6 Вплив позаклітинного матрикса на гладеньком'язові клітини лейоміоми та міоми матки	133
Розділ 5. Роль позаклітинних везикул у міжклітинній комунікації	138
5.1. Нові альтернативні шляхи комунікації клітин. Позаклітинні везикули	138
5.2 Механізми сортування вантажу позаклітинних везикул	156
5.3 Стратегії використання позаклітинних везикул	170
5.4 Екзосоми – новий спосіб комунікації клітин у нервовій системі	181

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

Å	– ангстрем;
APP	– протеїн-попередник амілоїда;
CAFs	– асоційовані з раком фібробласти;
Cx	– коннексин;
ESCRT	– комплекс ендосомального сортування, що необхідний для транспорту;
ЕЦМ	– екстрацелюлярний матрикс;
Gal	– галактоза;
GalNAc	– N-ацетилгалактозамін;
GHAP	– гліальний гіалуронат-зв'язувальний протеїн;
GlcA	– глюкуронова кислота;
GlcNAc	– N-ацетилглюкозамін;
HAS	– гіалуронатсинтаза;
ICAM	– міжклітинні адгезивні молекули (intercellular adhesion molecules);
IdoA	– ідуронова кислота;
ІЗК	– інтегрин-зв'язувальна кіназа;
LDL	– ліпопротеїни малої щільності;
Leu	– лейцин;
Lys	– лізин;
L-селектин	– лейкоцитарний селектин;
MDSC	– мієлоїдна супресорна клітина;
MerTK	– тирозинкіназний рецептор MER;
MuSK	– рецепторні тирозинкінази м'яза;
MC	– множинний склероз;
NF	– нейрофіламент;
NK-клітини	– натуральні кілери;
Pro	– пролін;
Ser	– серин;
SNARE	– soluble N-ethylmaleimide-sensitive component attachment protein receptor;
Thr	– треонін;
TNF	– фактор некрозу пухлин;
Tyr	– тирозин;
ТФР-β1	– трансформуючий фактор росту-бета1;
VEGF	– фактор росту ендотелію судин;

АДФ	– аденозиндифосфат;
АК	– адгезивний контакт;
АКМП ПШ	– аритмогенна кардіоміопатія правого шлуночка;
Арг	– аргінін;
Асп	– аспартат;
АТФ	– аденозинтрифосфат;
АХ	– ацетилхолін;
АХЕ	– ацетилхолін естераза;
АХР	– ацетилхоліновий рецептор;
БМ	– базальна мембрана;
ВМГК	– високомолекулярна гіалуронова кислота;
ГАГ	– глікозаміноглікан;
гДНК	– геномна ДНК;
ГЕБ	– гематоенцефалічний бар'єр;
ГК	– гіалуронова кислота;
Глі (Gly)	– гліцин;
ГМК	– гладеньком'язова клітина;
ГС	– гепарансульфат;
ГСПГ	– гепарансульфат протеоглікан;
ГТФ	– гуанозинтрифосфат;
ГФІ	– глікозилфосфатиділінозитол;
ГФКП	– гліальний фібрилярний кислий протеїн;
ДНК	– дезоксирибонуклеїнова кислота;
ДСП	– довгострокове потенціювання;
ЕМП	– епітеліально-мезенхімальне перетворення;
ЕПР	– ендоплазматичний ретикулум;
Е-селектин	– ендотеліальний селектин;
ЕФР (EGF)	– епідермальний фактор росту;
ІД	– інтеркальований диск;
ІЛ	– інтерлейкін;
ІПФР-1	– інсуліноподібний фактор росту 1;
КС (KS)	– кератансульфат;
КФА	– кіназа фокальної адгезії;
МВТ	– мультивезикулярні тіла;
МКА	– молекули міжклітинної адгезії;
МПС	– мукополісахаридоз;
мРНК	– матрична РНК;

мтДНК	– мітохондріальна ДНК;
НМГК	– низькомолекулярна гіалуронова кислота;
НМДА	– N-метил-D-аспартат;
НМКА	– нейрональна молекула клітинної адгезії;
НМС	– нервово-м'язовий синапс;
НТД	– кінцеві 30-ти нуклеотидні доповнення;
НФ	– нейрофіламенти;
ПВ	– позаклітинні везикули;
ПГ	– протеоглікан;
ПКМ	– позаклітинний матрикс;
ПКС	– протеїнкаіаза С;
ПНМ	– перинейрональна мережа;
ПНС	– периферична нервова система;
ПСК	– полісіалова кислота;
ПФ	– проміжні філаменти;
РБП	– рибосомальний протеїн;
РНК	– рибонуклеїнова кислота;
РНП	– рибонуклеопротеїн;
РС	– розсіяний склероз;
Р-селектин	– тромбоцитарний селектин;
РСС	– раптова серцева смерть;
СМ	– спинний мозок;
УДФ	– уридиндифосфат
ФНП-β	– фактор некрозу пухлини-β;
ФРТ	– фактор росту тромбоцитів;
ФРФ (FGF)	– фактор росту фібробластів;
ХА	– хвороба Альцгеймера;
ХП	– хвороба Паркінсона;
ХС	– хондроїтинсульфат;
ХСПГ	– хондроїтинсульфат протеоглікан;
ЦНС	– центральна нервова система;
ЦСБ	– цереброспінальний бар'єр;
ЯПК	– ядерний поровий комплекс.

ВСТУП

Розвиток, тканинна організація та функціонування багатоклітинних організмів у багатьох випадках визначаються станом міжклітинної комунікації. Тісна інтеграція клітин і складна система їх взаємодії, що включає механізми внутрішньо- та позаклітинної передачі регуляторних сигналів, лежать в основі розвитку багатоклітинного організму і підтримання його нормального функціонування.

Дослідження клітинних і молекулярних механізмів міжклітинних взаємодій – одне з пріоритетних завдань сучасної біології та медицини. Застосування методів молекулярної біології, біохімії, генетики та суміжних дисциплін дозволило визначити та класифікувати головні складові міжклітинної взаємодії. На теперішній час відома молекулярна структура та генетичний код різних молекул, що формують ключові контакти між клітинами в різних організмах. Це дозволило поєднати їх у родини, класи та підкласи за відповідними структурними та функційними властивостями.

Хоча на даний час основні механізми внутрішньоклітинної передачі сигналів за участю цитоплазматичних і ядерних рецепторів гормонів, рецепторів, і регульованих іонних каналів вивчені недостатньо, дослідженою і найбільш складною частиною проблеми міжклітинної комунікації є розуміння механізмів узгодженої взаємодії різних лігандів, що дозволяють клітинам адекватно реагувати на постійно мінливі умови середовища всередині організму і поза ним.

У монографії надана сучасна класифікація міжклітинних контактів, презентовані компоненти міжклітинних взаємодій: складові цитоскелета, адгезивні молекули, компоненти позаклітинного матрикса та цитокіни. Наведена характеристика змін головних складових міжклітинної комунікації за умов фізіологічної адаптації та розвитку патологічного стану. Зроблений акцент на специфіку комунікації між цитоплазмой та ядром через спеціальні комплекси пор, що створює систему вибіркового транспорту речовин, регулюючи потоки ядерного імпорту та експорту. Окремим розділом наведено сучасний погляд на роль екзосом як критичних медіаторів зв'язку між клітинами.

Розділ 1. ТИПИ МІЖКЛІТИННОЇ ВЗАЄМОДІЇ

У різних тканинах кожна клітина зв'язується із сусідніми ділянками своєї плазмалеми за допомогою морфологічних структур, які складаються з ряду елементів, які отримали назву міжклітинних контактів (МК). Міжклітинні контакти виникають у місцях зіткнення клітин у тканинах і слугують для міжклітинного транспорту речовин і передачі сигналів (міжклітинної взаємодії), а також для механічного скріплення клітин між собою. Міжклітинну взаємодію за просторовою ознакою поділяють на:

- **дистантну**, що характерна для нервової системи, в якій узгодження функціонування нейронів, розташованих у різних частинах організму, досягається завдяки хімічним посередникам (нейрогормонам та нейропептидам), здатним впливати гуморально на нейрони інших відділів та органів;
- **суміжну**, коли мембрани клітин розділені лише міжклітинним простором, і може відбуватися передача певних сигнальних молекул або електричних імпульсів сусіднім клітинам;
- **контактну**, зумовлену специфічними контактами мембран клітин, наприклад, синапсами в нервовій системі.

При контакті клітин одна з одною їхні плазмалеми вступають у взаємодію (Pollard, 2017). При цьому утворюються особливі сполучні структури – **міжклітинні контакти**, які за складовою поділяють на прості та складні (рис. 1).

Прості контакти - плазмалеми сусідніх клітин формують вирости, які схожі на зубці, таким чином, що зубець однієї клітини занурюється між двома зубцями іншої (зубчасті) або інтердигітацій, які перетинаються між собою (пальцеподібні). Між плазмалемами сусідніх клітин завжди зберігається міжклітинна щілина 15-20 нм завширшки.

Складні сполучення поділяють на адгезивні, замикальні та комунікаційні. На основі структури і функцій клітинні контакти класифікують на головні групи:

Якірні контакти (англ. *anchoring junctions*) — включають як контакти двох клітин, так і контакти клітин із позаклітинним матриксом завжди асоційовані з елементами цитоскелета: актиновими або проміжними філаментами. Незважаючи на те, що якірні контакти мають відмінності у структурі, для них всіх характерна наявність трьох основних елементів: молекули клітинної адгезії (МКА), кадгеринів, у випадку взаємодії клітина-клітина, або інтегринів у випадку взаємодії клітина-позаклітинний матрикс,

адаптерного протеїна, що кріпить МКА до цитоскелета, та пучка актинових або проміжних філаментів.

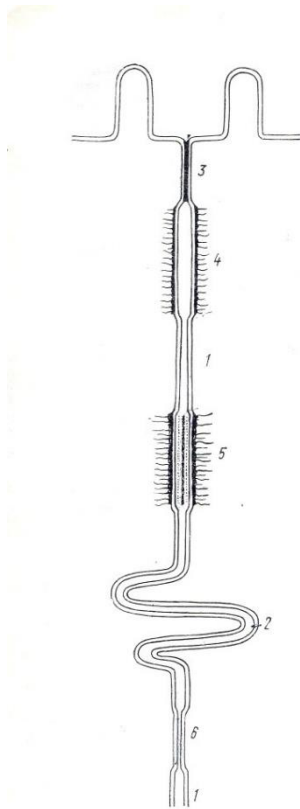


Рис. 1 Схема міжклітинних контактів

- 1 – простий;
- 2 – замикальний;
- 3 – щільний замикальний контакт;
- 4 – напівдесмосома;
- 5 – десмосом;
- 6 – щілинний.

Адгезивні контакти (англ. *adhesive junctions*) або зони злипання (англ. *zonula occludens*) — з'єднують пучки актинових волокон у сусідніх клітинах. Сполучають латеральні поверхні епітеліальних клітин, навколо яких утворюють пояски, що розташовуються відразу ж під зоною щільних контактів. Вони, в основному, складаються з трансмембранних протеїнів, які мають позаклітинні та внутрішньоклітинні компоненти. Позаклітинна складова, як правило, утворює гомодимер, що об'єднує мембрани двох протилежних клітин, в той час як його внутрішньоклітинний сегмент утворює комплекс зі специфічними протеїнами, що присутні в цитоплазмі, які, в свою чергу, пов'язані з цитоскелетом. Отже, адгезивні контакти слугують як анкери між позаклітинним простором та цитоскелетом. До адгезивних контактів відносять:

- **контакти із позаклітинним матриксом**, приєднані до актинових філаментів;
- **десмосоми**, що з'єднують пучки проміжних філаментів у сусідніх клітинах. Десмосома складається з двох електроннощільних половин, які належать плазмалемам сусідніх клітин, що розділені міжклітинним простором біля 25 нм, заповненим тонкофібрилярною речовиною глікопротеїнової природи. Міжклітинний компонент складається з десмосомальних кадгеринів – десмоколіну і десмоглеїну, які утворюють гетероциклічний комплекс у межах позаклітинного простору, який з'єднує дві клітини, що межують, тоді як внутрішньоклітинний компонент складається з протеїнів сімейства катенінів (плакоглобін і плакофілін) і плакінів (десмоплакін).

Десмоплакін безпосередньо взаємодіє з проміжними філаментами для стабілізації структури десмосом (рис. 2).

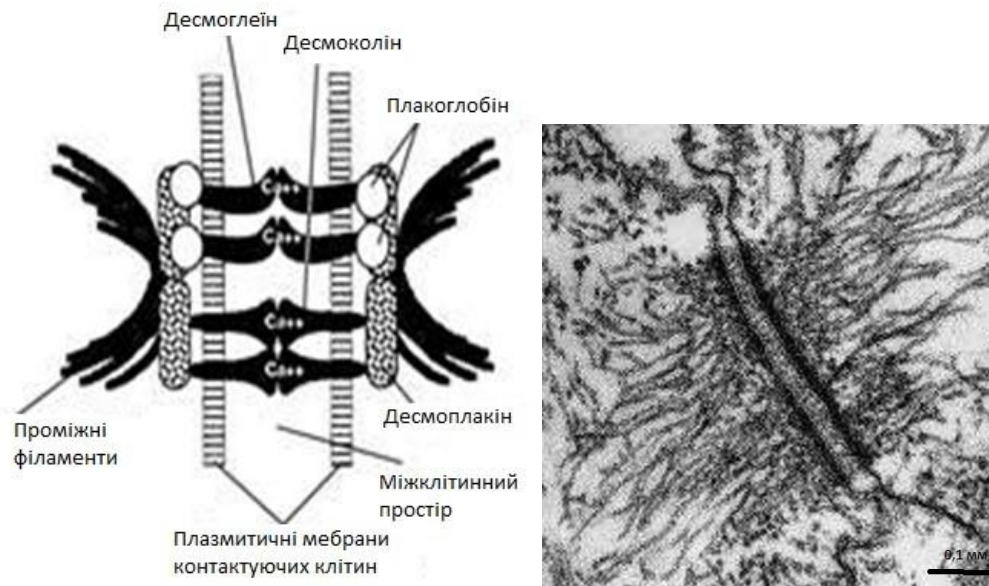


Рис. 2 Структура десмосоми

- **гемідесмосоми** (напівдесмосоми) – контакти клітини із позаклітинним матриксом, схожі за будовою до десмосом, утворені лише однією пластинкою з тонофіламентами, які входять до неї, прикріплюють клітину до базальної мембрани;
- **поясок зчеплення**, або стрічкоподібна десмосома, яка огинає всю поверхню клітини поблизу її апікального відділу.

Замикальні контакти (англ. *occluding junctions*) – контакти, що «зшивають» клітини між собою, при цьому їхні мембрани максимально зближуються, внаслідок чого формуються непроникні або вибірково проникні щільні шари. Серед замикальних контактів виділяють:

- **щільні** контакти (англ. *tight junctions, zonula occludens*) – замикальні контакти хребетних тварин;
- **септовані** контакти (англ. *septate junctions*) – замикальні контакти безхребетних тварин.

Контакти, що формують канали, або **комунікативні контакти** сполучають цитоплазму сусідніх клітин і допомагають інтегрувати їхній метаболізм, серед них найбільш характеризовані:

- **щілинні** контакти або нексуси (англ. *gap junctions*) — комунікативні контакти тварин;
- **плазмодесми** – цитоплазматичні містки між рослинними клітинами;
- **контакти, що передають сигнали**, беруть участь у передачі інформації між клітинами через мембрани: хімічні синапси,

імунологічні синапси, трансмембранні клітинні контакти ліганд-рецептор (наприклад, Delta-Notch, ephrin-Eph).

Усі клітинні контакти, знайдені в тканинах тварин, поділяють на **гомо- та гетерофільні** залежно від того, чи утворюються контакти між однаковими або різними клітинами відповідно (Сур, 2018).

Також на сьогоднішній день міжклітинні контакти класифікують за основними функціями, які вони виконують:

- **ізолюючі** контакти, які виконують бар'єрну функцію;
- **комунікативні**, які забезпечують зв'язок між клітинами;
- **транспортні**, які забезпечують міжклітинний транспорт речовин.

1.1 Прості неспеціалізовані міжклітинні контакти

Зазвичай їх відносять до недиференційованої або неспецифічної міжклітинної комунікації. Простий контакт – це контакт плазмалем клітини на відстані 10–20 нм, при якому взаємодіють шари глікокаліксу обох клітин. Цей міжмембранний простір заповнений безструктурним вмістом з низькою електронною щільністю. Мембрани простого контакту розташовані комплементарно, повторюючи контур одна одної, що дозволяє узгоджений рух плазмалем. У різних тканинах серед простих контактів можна зустріти ділянки розширення міжмембранних просторів до 50 нм протяжністю до 0,5 мкм.

Під плазмалемами простих контактів розташована зона з незначно підвищеною, в порівнянні з гіалоплазмою, електронною щільністю. Ширина цієї зони, яка має назву підмембранний компонент, досягає 60 нм. Підмембранний компонент утворюють мікрофіламенти діаметром 4-7 нм. Мікрофіламенти підмембранного компонента мають актинову природу і здатні до активних скорочень. Ці структури забезпечують рух плазмалем простих контактів. У цитоплазмі, яка розташована поблизу простих контактів, розташовані мітохондрії. Мікротільця, цистерни ендоплазматичної сітки, гранули глікогена, мікрофіламенти та мікротрубочки у різних тканинах симетрично розташовані відносно простих контактів.

Основними функціями простих контактів є транспорт речовин та підтримка їх адгезивного зв'язку. Так як у міжмембранному просторі простих контактів розташовані високогідратовані молекули глікопротеїнів, впродовж простих контактів можливий транспорт речовин шляхом дифузії. Рух плазмалеми простих контактів також допомагає транспорту речовин між клітинами.

Прості контакти – структури високодинамічні. За різних змін та порушень життєдіяльності клітин, функційних навантаженнях та перенавантаженні, дистрофічних та деструктивних процесах, дії метаболічних ядів структура простих контактів змінюється. Діапазон цих змін доволі широкий – від порушення компліментарності плазмалем і розширення міжмембранних просторів до утворення широких міжклітинних щілей та полостей. Контактуючі поверхні клітин можуть бути паралельними чи утворювати взаємні вrostання, коли вирости плазмалеми і цитоплазми однієї клітини занурюються у відповідні заглибини сусідньої клітини. Такий тип контакту носить назву зубчастого або пальцеподібного (Grund, 2018).

Порушення структури простих контактів відбувається при гальмуванні синтезу та вбудовуванні в контактні поверхні протеїнових, ліпідних та вуглеводних компонентів, а також при дії позаклітинних факторів, які викликають деполімеризацію або розпад глікопротеїнів у міжмембранному просторі простих контактів.

Контакти типу «замок», також відносяться до простого контакту, і є вип'ячуванням плазмалеми однієї клітини в інвагінації плазмалеми сусідньої клітини. Під плазмалею розташований слабо виражений підмембранний шар, який має тонку філаментну структуру. Контакти типу «замок» не виконують адгезивної функції. Вони знайдені у великій кількості між клітинами, які швидко змінюють форму, висоту та взаємне розташування. Ці контакти є своєрідними резервами контактних поверхней, їх кількість зменшується або зростає при змінах висоти клітин. Враховуючи таку динамічність контактів типу «замок», можна припустити, що вони здатні легко переміщуватися вздовж контакту, при цьому виконуючи транспортну функцію.

1.2 Складні контакти

Складні контакти відповідно мають декілька складових і можуть бути щільними замикальними (ізолюючими), якірними (зчеплювальними) та комунікаційними.

Щільний замикальний контакт характерний для клітин епітеліальної вистілки травного тракту і епітелію залоз. При формуванні щільного контакту зовнішні шари мембран на окремих ділянках максимально зближуються, внаслідок чого стають непроникними для макромолекул та йонів; також спостерігається утворення одного суцільного пласта, який пояском оточує апікальні ділянки клітин (рис. 3).

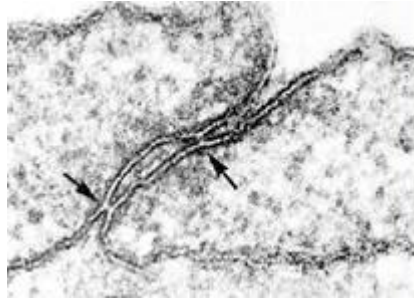


Рис. 3 Щільні контакти між епітеліальними клітинами
(вказані стрілками)

Якірні, або зчеплювальні контакти утворюються за участю фібрилярних елементів цитоскелета. До цих міжклітинних контактів належать **зчеплювальні стрічки, фокальні контакти та бляшки зчеплення**, які пов'язуються з актиновими мікрофіламентами всередині клітини, а також **десмосоми та напівдесмосоми**, які з'єднуються з іншими елементами цитоскелета – проміжними філаментами. Зміцнення контакту між клітинами досягається шляхом формування десмосом – утворень цитоплазми двох сусідніх клітин, кожна з яких формує товсту пластинку прикріплення діаметром до 0,5 мкм. Між пластинками знаходиться міжклітинна щілина шириною 25–30 нм, заповнена електронно-щільною речовиною, сформованою молекулами інтегральних глікопротеїнів – десмоглеїнів. З боку гіалоплазми в зоні десмосоми розташовується електронно-щільний шар протеїна – десмоплакіна, в який вплітаються проміжні елементи цитоскелета. Десмосоми є характерними контактами епітеліальних, ендотеліальних клітин, кардіоміоцитів та інших клітин. На відміну від десмосоми, що складається з двох пластинок прикріплення, напівдесмосома має лише одну таку пластинку і утворюється в місцях контакту епітеліальних клітин із базальною мембраною. На відміну від щільного контакту, всі типи зчеплювальних контактів є проникними для водних розчинів і не відіграють ніякої ролі в обмеженні дифузії.

Комунікаційні, чи щілинні, міжклітинні контакти є функційними зв'язками між клітинами. Через щілинні контакти клітини здійснюють прямий обмін хімічними речовинами. До таких контактів належать **нексуси та різні групи синапсів**.

Нексус – це спеціалізований клітинний контакт, який відзначається безпосереднім хімічним зв'язком між цитоплазмами клітин, коли плазмалема сусідніх клітин зближені до відстані 2–3 нм і пронизані особливими протеїновими комплексами – **коннексонами** (connexin, Cx), кожний з яких складається з 6 субодиниць із циліндричним каналом по

центру (Kumar, 1999). У складі різних щілинних контактів нараховується від кількох одиниць до декількох тисяч коннексонів. Їхня класифікація заснована на молекулярній масі (кДа) та видовій специфікації (h – human (людина), r – rat (щур) тощо): hCx32 – коннексон масою 32 кДа, характерний для людини. Безліч генів, що кодуєть коннексони, мають схожу організацію (Oshima, 2014). Передбачають, що в гаплоїдному геномі вони представлені лише однією копією, а їх виникнення є результатом дуплікації генів.

Через коннексони утворюються наскрізні канали, які сполучають між собою внутрішні середовища контактуючих клітин. Коннексон, що входить до складу щілинного контакту, утворює циліндр з центрально-розташованою водяною порою. Стінки циліндра сформовані шістьма протеїновими субодинами, які здатні рухатися відносно один одного, контролюючи таким чином проникність каналу. За допомогою рентгеноструктурного аналізу вдалося встановити будову каналу щілинного контакту, який складається з двох напівканалів, кожен з яких містить 24 протеїнові α -спіралі, що відповідають чотирьом трансмембранним доменам шести субодинами. Зовнішній діаметр напівканалу з боку цитозолу становить 70 Å, а з позаклітинної сторони – 50 Å. Діаметр пори коливається від 40 Å (з боку цитозолу) до 15 Å в місці контакту двох напівканалів у бік позаклітинного простору. Поверхні коннексонів утворюють щільні контакти один з одним за рахунок стикуючого домену, що перешкоджає виходу частинок, що переносять заряд (йонів) у позаклітинний простір (рис. 4).

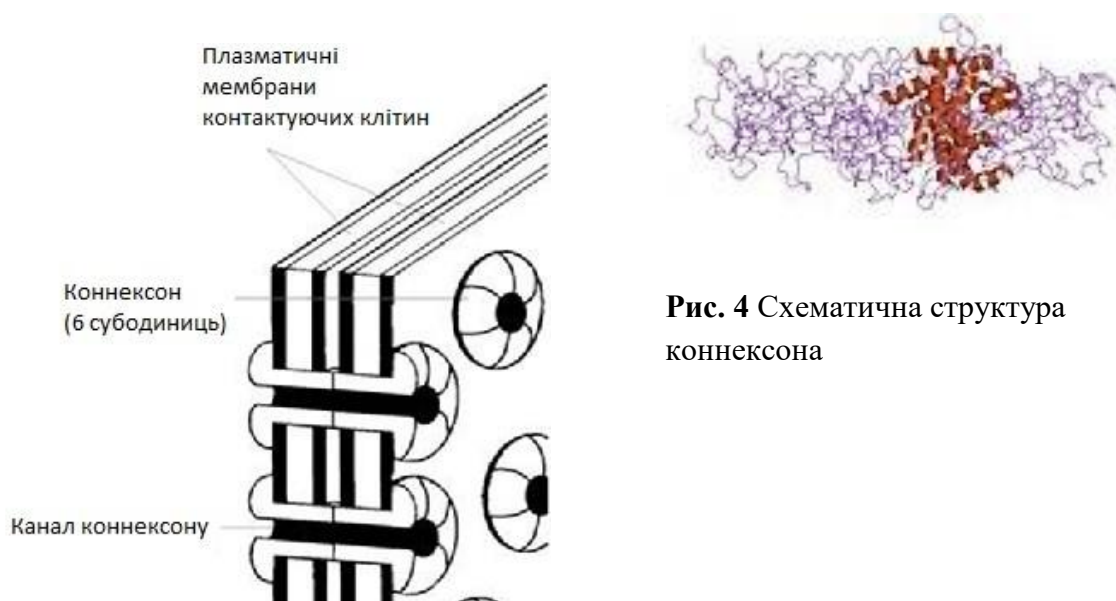


Рис. 4 Схематична структура коннексона

Нексуси містяться переважно в серцевій м'язовій тканині й забезпечують тісний метаболічний зв'язок між цитоплазмами контактуючих кардіоміоцитів.

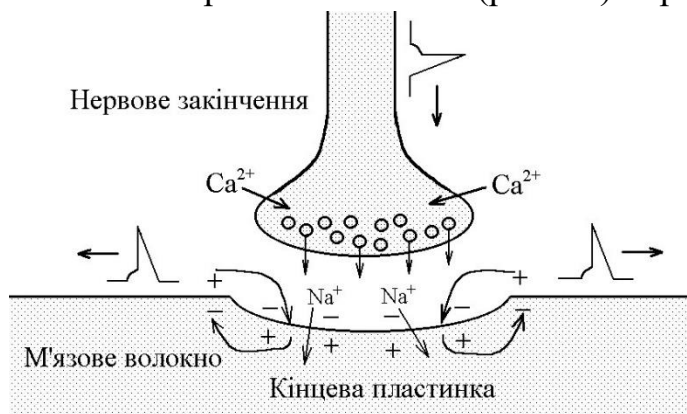
Синапси – це спеціалізовані контакти між нейронами або між нейронами та м'язами, які слугують для передачі збудження або гальмування в один бік від однієї клітини до іншої. Синапси утворюються на термінальних ділянках відростків нейронів – дендритів та аксонів. Один нейрон за посередництва синапсів може з'єднуватися з 10 000 нейронів. Міжнейронні синапси поділяють на електричні та хімічні. Мембрани клітин, що утворюють синапс, розділені міжклітинним простором – синаптичною щілиною шириною 20–30 нм, через яку передається інформація у вигляді медіаторів.

У синапсі розрізняють декілька складових частин:

- 1) **пресинаптична** – розширене закінчення клітини (нейрона). Саме тут розташовуються численні синаптичні пухирці (везикули) діаметром від 10 до 90 нм, які оточені мембраною й містять хімічну речовину (медіатор або нейромедіатор). Тут також широко представлені мітохондрії, численні мікротрубочки і мікрофіламенти (нейрофіламенти). Пресинаптична мембрана є ділянкою плазмалеми, яка безпосередньо контактує із сусідньою клітиною;
- 2) **синаптична щілина**: ділянка міжклітинного простору, котра відмежовує пресинаптичну частину від постсинаптичної;
- 3) **постсинаптична** частина: утворена ділянкою плазматичної мембрани іншої клітини, містить вбудовані протеїнові молекули – рецептори, здатні зворотньо зв'язуватися з нейромедіатором, викликаючи згодом генерацію електричного (хімічного) імпульсу в постсинаптичному нейроні (Lacomis & Puwanant, 2018).

Таким чином, різні типи міжклітинних контактів пристосовані до особливих функцій певних клітин. За механізмом функціонування синапси поділяють на: електричні, хімічні, змішані.

Електричні синапси (рис. 5) представляють собою злиття або



зближення, ділянок мембрани. Їм притаманне однобічне проведення збудження.

Рис. 5 Схема електричного синапсу

Функція електричних синапсів полягає, насамперед, у забезпеченні термінових реакцій. Електричні синапси порівняно повільно втомлюються, є стійкими до змін зовнішнього та внутрішнього середовища, і відрізняються високою надійністю.

У хімічних синапсах (рис. 6) у пресинаптичній частині знаходяться гранулярні та агранулярні пухирці, які містять специфічну хімічну речовину – медіатор.



Рис. 6 Схема хімічного синапсу

У пресинаптичному розширенні також знаходяться мітохондрії, які забезпечують синтез медіатора, гранули глікогена. Збудження аксона призводить до вивільнення медіатора в синаптичну щілину шляхом екзоцитозу. Медіатор взаємодіє з рецепторами на постсинаптичній мембрані і призводить до відкриття іонних каналів на ній, що викликає генерацію потенціалу дії на постсинаптичній мембрані, і подальшу його передачу по клітині.

Kumar, N.M. (1999). Molecular biology of the interactions between connexins. *Novartis Found Symp*, 219, 6–16.

Oshima, A. (2014). Structure and closure of connexin gap junction channels. *FEBS Letters*, 588, 1230–1237.

Pollard, T.D., Earnshaw, W.C., Lippincott-Schwartz, J. & Johnson, G.T. (2017). *Cell Biology (Third Edition)*. Chapter 31 - Intercellular Junctions, 543–553.

Lacomis, D., Puwanant, A. (2018). What is in the neuromuscular junction literature? *J Clin Neuromuscul Dis.*, 20(2), 76–84.

Cyr, D.G., Dufresne, J., Gregory, M. (2018). Cellular junctions in the epididymis, a critical parameter for understanding male reproductive toxicology. *Reprod Toxicol.*, 81, 207–219.

Grund, S., Grümmer, R. (2018). Direct cell-cell interactions in the endometrium and in endometrial pathophysiology. *Int J Mol Sci.*, 19(8), pii: E2227.

Розділ 2. СКЛАДОВІ, ЩО ФОРМУЮТЬ МІЖКЛІТИННІ КОНТАКТИ

Формування, диференціація та функціонування багатоклітинного організму забезпечується різними міжклітинними взаємодіями. Декілька десятиріч тому дослідження міжклітинних взаємодій були рідкі та різноспрямовані. Незалежні відкриття накопичили інформацію про одні й ті самі події у міжклітинних відносинах, але з використанням зовсім різної термінології. Вирішальним етапом розуміння у класифікації факторів міжклітинної комунікації стало застосування сучасних методів імунохімії, молекулярної біології та генетики, що надало можливість характеризувати молекулярну структуру та ступінь гомології різних молекул та об'єднати їх у відповідні родини. Але і досі залишається багато проблем у дослідженнях міжклітинних взаємодій. Відсутня повна картина компонентів міжклітинної комунікації, їх специфічності чи не специфічності, особливості поведінки *in vitro* та *in vivo* за фізіологічних умов та патологічних процесів.

На сьогодні компоненти міжклітинних взаємодій поділяють на чотири головні групи: складові цитоскелета, адгезивні молекули, компоненти позаклітинного матрикса та цитокіни.

2.1 Компоненти цитоскелета

Цитоскелет – це клітинний каркас або скелет, що знаходиться в цитоплазмі живої клітини. Він присутній у всіх клітинах як еукаріот (тварин, рослин, грибів та найпростіших), так і прокаріот. Це динамічна структура, що постійно змінюється, до функцій якої входить підтримка і адаптація форми клітини до зовнішніх дій, екзо- і ендоцитоз, забезпечення руху клітини як цілого, активний внутрішньоклітинний транспорт і клітинне ділення. У цитоскелеті виділяють декілька основних систем, званих або за основними структурними елементами, помітними при електронно-мікроскопічних дослідженнях (мікрофіламенти, проміжні філаменти, мікротрубочки), або за основними протеїнами, що входять до їх складу (актин-міозинова система, кератинова система, тубулін-динеїнова система).

На початку 1970-х років при дослідженні механічних властивостей мембран еритроцитів виявлено, що після руйнування мембрани, яке викликано екстракцією ліпідів неіонних детергентів, залишається щільна структура, котра зберігає форму еритроцита (Adams, 1973). Ця структура отримала назву примембранного цитоскелета. Кожен тип цитоскелетних

структур утворює в клітині власну систему зі своїми основними і мінорними протеїнами. Ці системи не є абсолютно незалежними, а взаємодіють один з одним та з іншими компонентами клітини – мембраною, ядром, органелами.

Цитоскелет прокариот уперше відкритий на початку 1990-х років, коли встановлено, що майже всі бактерії та більшість архей містять протеїн FtsZ, який є гомологом тубуліна, і може полімеризуватись у філаменти, що утворюють кільце (Z-кільце) під час клітинного поділу (Margolin, 2005). Пізніше виявлені і прокариотичні гомологи актина. Ці відкриття змінили уявлення про те, що саме відсутність цитоскелета є найважливішою причиною менших розмірів і простішої організації прокариот у порівнянні з еукаріотами. Натомість зараз допускається, що відносна простота бактерій та архей пов'язана з відсутністю протеїнів-моторів, що «ходять» вздовж філаментів цитоскелета і забезпечують транспорт різних структур, а також і локомоцію всієї клітини (Carballido-López, 2003).

Наявність у прокариот гомологів актину та тубуліна дозволяє припускати, що ці два класи нуклеотид-зв'язуючих протеїнів, які можуть утворювати довгі філаменти, виникли в процесі еволюції досить давно, ще до появи еукаріот. Проте, ядерні та без'ядерні організми по-різному їх використовують, наприклад, у цитокінезі бактерій задіяний гомолог тубуліна FtsZ, тоді як в еукаріот цю функцію здійснюють актинові філаменти, у розходженні молекул ДНК під час поділу в бактерій, навпаки, беруть участь гомологи актина, а в еукаріот – мікротрубочки із тубуліна, що утворюють веретено поділу (рис. 7).

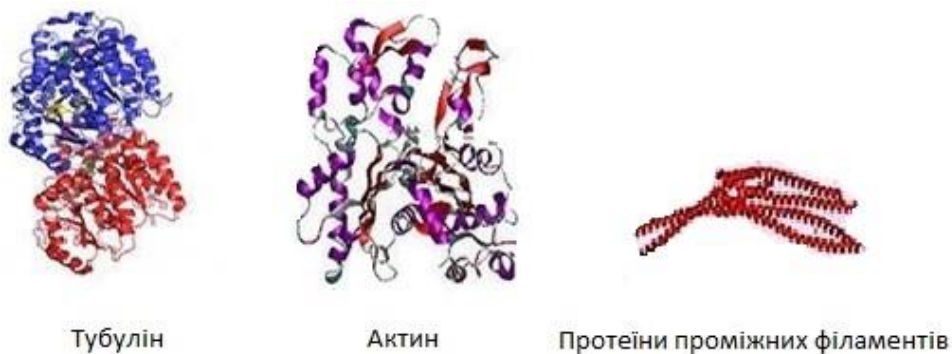


Рис. 7 Основні протеїни цитоскелета

Також у прокариот виявлений принаймні один клас протеїнів, що можуть вважатись гомологами протеїнів проміжних філаментів та один клас протеїнів цитоскелета – АТФази типу Walker A (WACA – MinD та PraA), що не мають аналогів у еукаріот (Merino, 2018).

У 2001 році Джонс та співробітники виявили, що у бактерії *Bacillus subtilis* наявні протеїни гомологи актина, які формують довгі спіральні структури. Це відкриття дало початок інтенсивному розвитку досліджень у галузі цитоскелета прокаріот, внаслідок чого було виявлено багато інших гомологів актину. Для всіх цих протеїнів характерна наявність актинового АТФазного домену. Більшість із них, як і актин в еукароїт, є частиною цитоскелета, проте деякі мають інші функції, наприклад FtsA, що бере участь у клітинному поділі, шаперон DnaK та гексокінази (Jones, 2001). Гомологи актину бактерій мають схожу просторову будову, але переважно досить сильно відрізняються за амінокислотною послідовністю (5-10% ідентичності). Також ці протеїни мають відмінні характеристики динаміки полімеризації та властивостей філаментів, які вони утворюють. Очевидно, що на відміну від еукаріот, які використовують один і той самий актин для дуже різних потреб клітини, бактерії мають багато варіантів схожих протеїнів, кожен із яких спеціалізований на виконанні окремої функції (Carballido-López, 2003).

Клітини еукаріотів мають різну характерну форму і дуже складну внутрішню будову. Крім того, вони здатні змінювати свою форму і розташування органел, а в багатьох випадках і пересуватися з місця на місце. Всіма цими властивостями еукаріотичні клітини зобов'язані розвиненій мережі протеїнових ниток (філаментів), що утворюють в їхній цитоплазмі опорно-рухову систему, названу цитоскелетом (рис. 8).

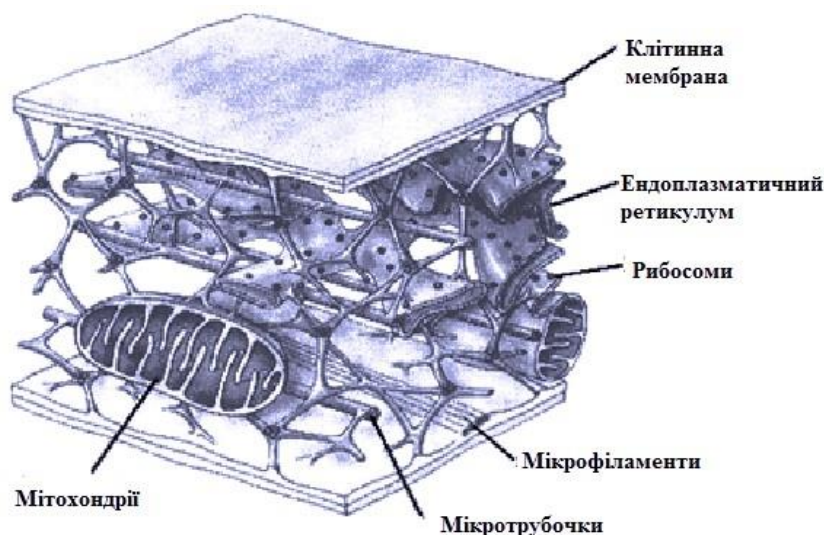


Рис. 8 Схематична структура цитоскелета

Два найбільш важливих типи таких ниток – це актинові філаменти (часто називають мікрофіламенти) і мікротрубочки (табл. 1). Ті й інші складаються з глобулярних протеїнових субодиниць, які в клітині легко

можуть з'єднуватися між собою і роз'єднуватися. Існують тонкі механізми, які контролюють збірку цих полімерних структур у цитоплазмі з вільних субодиниць-мономерів. У більшості тваринних клітин є ще протеїнові нитки третього типу, які по своїй товщині займають проміжне положення між актиновими філаментами і мікротрубочками і тому мають назву проміжних філаментів; ці структури складаються з фібрилярних протеїнових субодиниць, і вони набагато більш стабільні, ніж мікрофіламенти і мікротрубочки.

Таблиця 1

Головні компоненти цитоскелета

Компоненти	Характеристика
Актинові філаменти	Скоротливі волокна (нитки діаметром 7 нм), розташовані в примембранному шарі у всій клітині – в основному беруть участь у процесах, пов'язаних з рухом. Складаються з молекул протеїна актина .
Проміжні філаменти	Нерозчинні протеїнові фібрили діаметром від 8 до 12 нм, утворюють різноманітні зв'язки між актиновими філаментами та мікротрубочками. В астроцитах складаються з молекул гліального фібрилярного кислого протеїна (ГФКП) .
Мікротрубочки	Мають зовнішній діаметр близько 25 нм, утворюються, як і звичайний полімер, в результаті складання молекул протеїна тубуліна .

Крім трьох основних типів протеїнових філаментів цитоскелет включає також багато різних допоміжних, які або зв'язують філаменти між собою або з іншими клітинними структурами, або впливають на швидкість та ступінь полімеризації філаментів. Специфічні комплекси допоміжних протеїнів, взаємодіючи з філаментами, забезпечують процеси руху (Wickstead, 2011).

Актинові філаменти (мікрофіламенти) – нитки діаметром 7 нм, що складаються із глобулярного протеїна актина. Ці елементи цитоскелета також можуть утворювати розгалужені сітки. На відміну від мікротрубочок, які забезпечують стійкість клітини до стискання, мікрофіламенти протистоять їй розтягуванню. Сітка з актинових філаментів розташована

відразу ж під плазматичною мембраною. Актинові волокна разом із міозиновими забезпечують м'язові скорочення, амебоїдний рух за допомогою псевдоподій. Кортикальні актинові філаменти утворюють ряд спеціалізованих структур. Наприклад, пучки актинових філаментів, що знаходяться в комплексі з міозином, прикріплюються до плазматичної мембрани і забезпечують клітину структурами, здатними до скорочення. В інших ділянках контрольована полімеризація актинових філаментів на їх плюс-кінцях здатна випинати плазматичну мембрану назовні, створюючи рухливі виступи клітинної поверхні. Різноманітність структур кортекса і виконуваних ними функцій залежить від обширного спектру актин-зв'язуючих протеїнів, які зшивають актинові філаменти в пухкий гель, поєднують їх у жорсткі пучки, створюючи механічне зусилля, або прикріплюють їх до плазматичної мембрани. Деякі з протеїнів, що виконують цю останню функцію, прикривають плюс-кінці актинових філаментів, контролюючи тим самим їх полімеризацію і деполімеризацію в клітині. Саме цим протеїнам, як вважають, належить ключова роль у складних рухах клітинної поверхні, наприклад, при фагоцитозі або при переміщенні клітин по субстрату. Актинові філаменти можуть відігравати певну роль у збереженні органел в певній частині клітини (Tang, 2017). Було встановлено, що актинові філаменти використовуються для ближнього транспорту із висновком про те, що той же самий вантаж може переміщатися як на мікротрубочках, так і на актинових філаментах. Крім того, актинові філаменти мають достатню щільність для того, щоб зробити добру місцеву транспортну систему.

Мікротрубочки – це порожнисті циліндри діаметром 25 нм і довжиною 0,2—25 мкм, що складаються зі спірально розташованих димерів тубуліна. Вони можуть збиратися або розбиратися в залежності від потреб клітини шляхом полімеризації або деполімеризації тубуліна на «+» та «-» кінцях. Мікротрубочки беруть участь у підтриманні форми клітини, зокрема запобігають їй стисканню, у внутрішньоклітинному транспорті, а також забезпечують розходження хромосом під час клітинного поділу. Центри організації мікротрубочок, такі, як центросоми, весь час ініціюють утворення нових мікротрубочок, які ростуть у випадкових напрямках. Будь-яка мікротрубочка, що натрапить на якусь структуру, здатну копіювати вільний плюс-кінець цієї мікротрубочки, буде вибірково стабілізована, тоді як інші з часом деполімеризуються. Вважають, що саме цей процес в основному визначає полярність і розташування систем мікротрубочок у клітині. У тих мікротрубочок, які утворилися в потрібних місцях, субодиниці тубуліна піддаються модифікації – ацетилюванню і

детирозилуванню. Ці модифікації відіграють роль «маркерів» зрілих мікротрубочок і створюють ділянки для зв'язування спеціальних протеїнів, асоційованих з мікротрубочками, які ще більше підвищують стійкість мікротрубочок до деполімеризації і адаптують їх для виконання специфічних функцій у клітині. Особлива група таких протеїнів використовує енергію гідролізу АТФ для односпрямованого переміщення вздовж по мікротрубочках, забезпечуючи цим направлений рух у цитоплазмі клітинних органел та їх правильну просторову організацію (Etienne-Manneville, 2013).

Найважливішим типом протеїнових філаментів цитоскелета є проміжні філаменти. Проміжні філаменти – це полімери, за структурою подібні канатам, зібраних із ниткоподібних поліпептидів. Саме ці елементи цитоскелета забезпечують клітині механічну стійкість, беруть участь у формуванні міжклітинних контактів: десмосом та гемідесмосом, закріплюють окремі частини клітини у певному положенні в цитоплазмі, також входять до складу ядерної ламіни (пластинки). На відміну від мікротрубочок і мікрофіламентів, проміжні філаменти не беруть участі у внутрішньоклітинному транспорті, не можуть приєднувати нуклеотидтрифосфати, і є відносно статичними структурами (Goldmann, 2018). Проміжні філаменти – це елементи цитоскелета, нерозчинні протеїнові фібрили діаметром від 8 до 12 нм. Таким чином, вони тонші за мікротрубочки (25 нм) і товстіші за актинові філаменти (7 нм), за що і отримали свою назву. Проміжні філаменти складаються із різних протеїнів, але всі вони мають спільну будову (рис. 9).

Існує багато тканеспецифічних форм проміжних філаментів, побудованих з різних поліпептидів: кератинові філаменти епітеліальних клітин, нейрофіламенти нейронів, гліальні філаменти астроцитів і шваннівських клітин, десмінові філаменти м'язових волокон і віментинові філаменти фібробластів і клітин багатьох інших типів. Окреме сімейство протеїнів проміжних філаментів складають ядерні ламіни, з яких побудована волокниста плівка (ламіна), яка вистилає зсередини оболонку ядра; вони є у всіх еукаріотичних клітинах. Поліпептиди, що входять до складу проміжних філаментів різних типів, розрізняються за амінокислотною послідовністю, а також молекулярною масою.

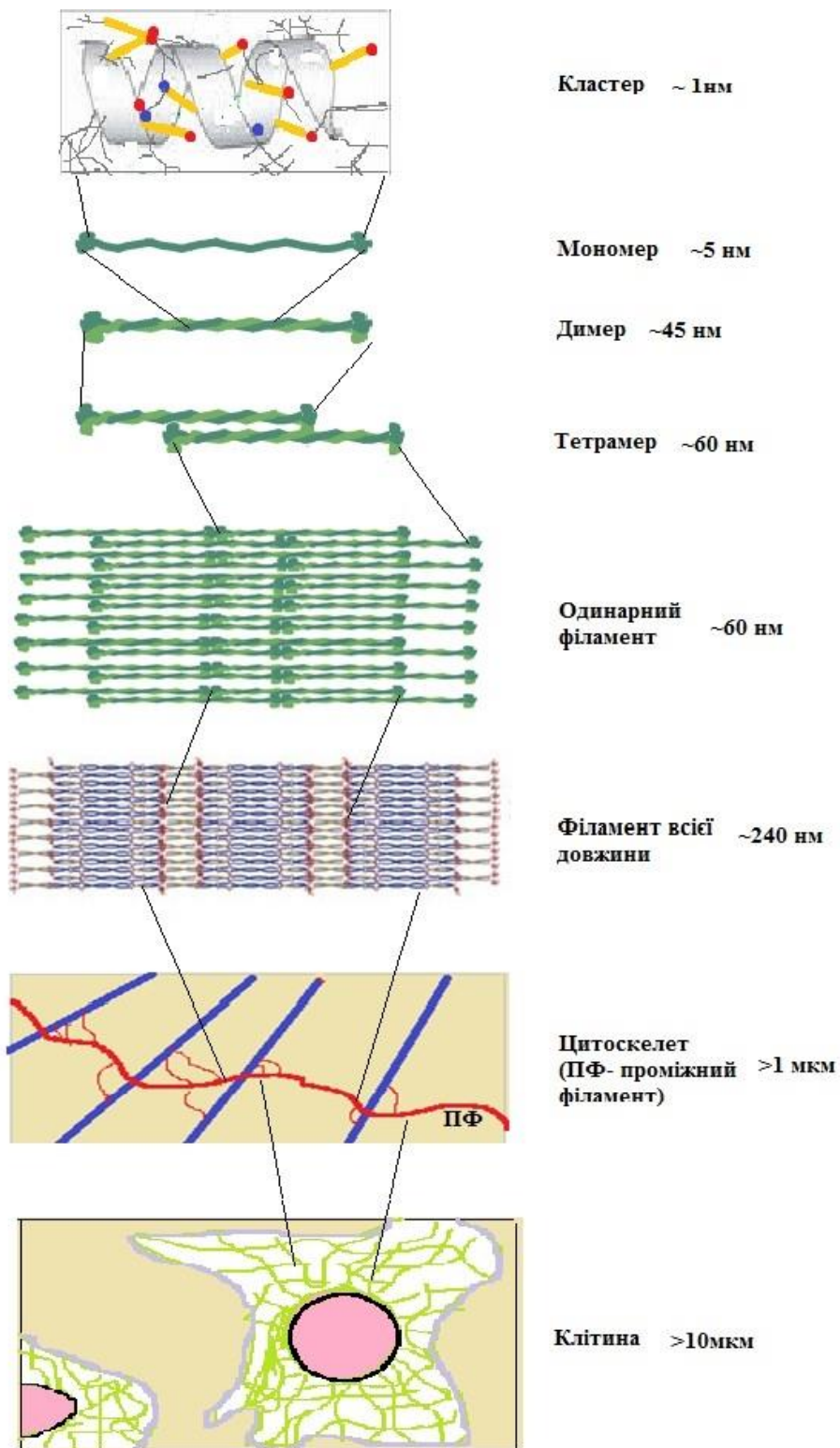


Рис. 9 Модель побудови проміжних філаментів

Однак у всіх є гомологічний центральний домен, який при димеризації протеїна утворює жорстку структуру з обвиваючих одна одну спіралей. Такі димерні субодиниці складаються в більші пучки, формуючи проміжні філаменти. Стержневидні домени субодиниць при цьому створюють структурну серцевину проміжних філаментів, а глобулярні домени на обох

кінцях виступають назвні і обумовлюють різноманітність властивостей проміжних філаментів. Саме завдяки цій варіабельності механічні властивості проміжних філаментів і взаємодії їх з іншими клітинними компонентами пристосовані до специфічних потреб клітин того чи іншого типу (Herrmann, 2016). На відміну від актинових філаментів і мікротрубочок, проміжні філаменти є найменш дослідженою частиною цитоскелета. Вони утворюють великі мережі в цитоплазмі більшості клітин хребетних, в тому числі астроцитів. Їх основні функції включають підтримку механічної стабільності, форми клітини, забезпечення каркасу для організації цитоплазми та органел (Köster, 2015). Проміжні філаменти також сприяють моториці та активації астроцитів на ранніх і пізніх стадіях реактивного гліоза (Yang, 2015).

Всі протеїни, що входять до складу проміжних філаментів, мають однаковий за структурою центральний домен, що складається із близько сорока повторів по сім неполярних амінокислот, тоді як N- і C-кінцеві ділянки у них можуть суттєво відрізнятися. В залежності від амінокислотного складу і структури розрізняють п'ять основних типів протеїнів проміжних філаментів.

Таблиця 2

Проміжні філаменти клітин хребетних

Вид філаментів та протеїни	Молекулярна маса, кДа	Тип клітин
Кератинові філаменти: різні кератини	40–68	Епітеліальні клітини
Нейрофіламенти: NF-L NF-M NF-H	68 100–110 110–130	Нейрони
Віментиноподібні філаменти: віментин ГФКП десмін періферін	55 50–52 53 54	Фібробласти та клітини багатьох інших типів. Деякі гліальні клітини. М'язові клітини. Різні нейронні клітини

Віментиноподібні протеїни можуть утворювати гомо- або гетерополімери, вони поширені у різних групах клітин. Деякі з них, наприклад, віментин у фібробластах, можуть формувати дуже динамічні структури, котрі збираються/розбираються внаслідок дефосфорилювання/фосфорилювання. До цього класу протеїнів також належить десмін, що експресується у клітинах скелетних, серцевого та гладеньких м'язів, ген якого знаходиться на 1, 2 хромосомах. У мишей із нокаутним геном десміна м'язи спочатку розвиваються нормально, але в дорослому віці у них спостерігається багато порушень, зокрема неправильне розташування м'язових волокон. До складу віментиноподібних філаментів входять такі основні протеїни, як віментин та гліальний фібрилярний кислий протеїн. Віментин – протеїн проміжних філаментів сполучних тканин та інших тканин мезодермального походження. Незважаючи на те, що більшість проміжних філаментів – це стійкі структури, віментин у фібробластах є динамічною структурою. Цей протеїн використовується як маркер мезодермальних тканин. Мономер віментина, як і всі інші протеїни проміжних філаментів, має центральну α -спіраль, закінчуючи з одного боку карбоксигрупою, а з іншого – аміногрупою (Hoi, 2017). Два мономерні закручуються навколо один одного, формуючи біспіральні димери. Два димери формують тетрамер, які, в свою чергу, формують лист, взаємодіючи з іншими тетрамерами. α -Спіралі містять гідрофобні амінокислоти, які утворюють гідрофобні поверхні спіралей. Ці поверхні дозволяють двом α -спіралям з'єднатися й утворити біспіраль. Крім того, у віментина є закономірний розподіл кислих і основних амінокислот, який відіграє важливу роль у стабілізації біспіральних димерів. Віментин прикріплюється до ядра, ендоплазматичного ретикулуму (ЕПР) і мітохондрій. Він відіграє значну роль у закріпленні органел і підтриманні їх положення в цитоплазмі. Динамічна природа віментина важлива для зміни форми клітин. Саме віментин забезпечує міцність клітин і їх стійкість до механічного стресу. Тому вважається, що віментин – компонент цитоскелета, що відповідає за підтримку цілісності клітини. Показано, що клітини, позбавлені віментина, вкрай чутливі до механічних пошкоджень. Результати дослідження на трансгенних мишах, у яких був відсутній віментин, тим не менш, показали, що організм таких мишей працював нормально. Можливо, що мережа мікротрубочок компенсувала відсутність мережі проміжних філаментів. Це підкріплює припущення про існування взаємодій між мікротрубочками і віментином. Отже, в основному віментин відповідає за підтримання форми клітини, забезпечує її цілісність і бере участь у взаємодіях різних систем цитоскелета. Крім того, віментин керує

транспортом ліпопротеїнів малої щільності (LDL) і утворює з них холестерин з лізосоми до ділянок клітини, де відбувається їх етерифікація. При блокуванні транспорту, отриманого з LDL холестерина, клітини накопичували набагато більш низький відсоток LDL, ніж нормальні клітини з віментин. Виявлення цієї функції віментина – перший приклад взаємозв'язку між обміном речовин у клітині і роботою мережі проміжних філаментів (Sarría, 1992; Danielsson, 2018).

Гліальний фібрилярний кислий протеїн (ГФКП) – гістоспецифічний компонент проміжних філаментів (ПФ) цитоскелета астроцитів (Eng, 1994). ГФКП у складі ПФ відіграє важливу роль у модуляції руху астроцитів та забезпеченні стабільної морфології їх відростків при розвитку реактивного астроцитозу (Hol, 2015). Пошкодження фізичної природи, хімічні та метаболічні інсульти призводять до розвитку реактивного астроцитозу, основними ознаками якого є підсилення синтезу ГФКП та фібрилогенез у гіпертрофованих астроцитах (Brenner, 2014). ГФКП є членом родини протеїнів цитоскелета. Це основний проміжний філамент, розміром 8–9 нм у зрілих астроцитах ЦНС. Це мономерна молекула 40–53 кДа й ізоелектричною точкою 5,7–5,8, високо специфічний протеїн мозку, який не виявлений за межами нервової системи. Відомо, що рівень ГФКП зазвичай зростає з віком. Завдяки високій специфічності і ранньому вивільненню з ЦНС після травматичного пошкодження мозку, ГФКП може виявитися дуже корисним маркером для ранньої діагностики (Bogoslovsky, 2017). Будова ГФКП схожа з будовою інших протеїнів проміжних філаментів. Він існує у двох формах – філаментній та розчинній.

Водорозчинний ГФКП розподілений по різних відділах головного мозку нерівномірно: його вміст максимальний у довгастому мозку (комплекс нижніх олів) і мінімальний – у корі мозку. Але й у корі головного мозку він також розподілений нерівномірно: у старій корі (гіпокамп) його вміст у декілька разів (від двох до чотирьох) вищий по відношенню до різних областей нової кори, у новій корі у лобовій частині – вище, ніж у зоровій. У підкоркових структурах його вміст вищий, ніж у новій корі. Підвищення вмісту ГФКП у гіпоталамусі та деяких інших структурах у порівнянні з корою головного мозку може бути зумовлене не стільки збільшенням кількості гліальних клітин, скільки зміною співвідношення фіброзних та протоплазматичних астроцитів. ГФКП бере участь у молекулярних механізмах нейрон-астроцитарних взаємодій. Більш гостре зниження позитивних нейронів СА1 в пірамідальному шарі морського коника супроводжується підвищенням інтенсивності ГФКП – позитивних астроцитів, є ознакою гліальної реакції. Дані імуноблотинга свідчать, що

крім двох основних фракцій – філаментної ($M_r = 49\text{--}51$ кДа) та розчинної ($M_r = 37$ кДа) – існують ще близько 11 проміжних та низькомолекулярних поліпептидів. ГФКП – амфіфільний протеїн, що має значну спорідненість до гідрофобних радикалів. Його видонеспецифічність підтверджується перехресною імунореактивністю (Тухомугов, 2016).

ГФКП відсутній у мозку новонароджених щурів та немієлінізованій білій речовині мозку немовлят. Синтез ГФКП та його фосфорилування у гліальних клітинах стимулюється гормонами (норепінефрином) і різними факторами росту (Рекну, 2014). Фосфорилується ГФКП Ca^{2+} кальмодулін-залежною протеїнкіназою. Показана можливість регуляції фосфорилування ГФКП глутаматом. Припускають, що активація рецептора глутамата інгібує вхід іонів Ca^{2+} до астроцитів та знижує інтенсивність Ca^{2+} -залежного каскаду дефосфорилування. У мозку щурів це припадає на період інтенсивного синаптогенезу, впродовж якого йде проліферація астроцитів, що діляться. З іншого боку, показано, що фосфорилування через вплив на динамічну рівновагу ГФКП, призводить до руйнування сітки у мітотичних гліальних клітинах.

Розщеплення ГФКП *in situ* й *in vitro* відбувається Ca^{2+} -залежною протеїназою кальпаїном II. Якщо молекулярна маса нативного ГФКП дорівнює 50 кДа, то під впливом кальпаїна II з'являється ряд пептидів з $M_r = 28\text{--}47$ кДа. При цьому ГФКП практично не розщеплюється протеїназою кальпаїном I, яка зв'язана з нейрофіламентами. Також ГФКП руйнується під впливом катепсина D з утворенням розчинних форм.

2.2 Молекули клітинної адгезії

Молекули клітинної адгезії є глікопротеїнами, локалізованими переважно у плазматичній мембрані. Ці молекули відіграють важливу роль у адгезивних взаємодіях між клітинами, формуючи гомофільні зв'язки з аналогічними молекулами, що розташовані на мембранах прилеглих клітин, чи гетерофільні зв'язки з протеїнами позаклітинного матрикса. Молекули клітинної адгезії є проміжною ланкою між позаклітинними структурами і цитоскелетом клітини, з яким за посередництвом ряду проміжних протеїнів зв'язуються їх внутрішньоклітинні домени. Крім цього, зв'язування цих молекул з лігандом ініціює цілий ряд внутрішньоклітинних біохімічних реакцій, що можуть призводити до зміни стану цитоскелета й впливати на інші внутрішньоклітинні процеси. Завдяки цим властивостям, дані молекули грають одну з ключових ролей у процесах проліферації,

диференціації клітин, стабілізації міжклітинних контактів, а також процесах, що є основою міжклітинної сигналізації (Khalili, 2015).

Адгезивні молекули розподіляють на декілька родин: інтегрини, кадгерини, імуноглобулінподібні протеїни та селектини.

Родина **інтегринів** представлена гетеродимерними протеїнами, молекули яких складаються із нековалентно зв'язаних α - та β - субодиниць, що формують трансмембранні протеїни. Зараз ідентифікована велика кількість варіацій у родині інтегринів за рахунок комбінації субодиниць, різних за структурою. Спочатку класифікацію інтегринів проводили відносно β -субодиниці (β_1 , β_2 , β_3), що зв'язувалася із різними α -субодиницями (до 15 модифікацій) (рис. 10).

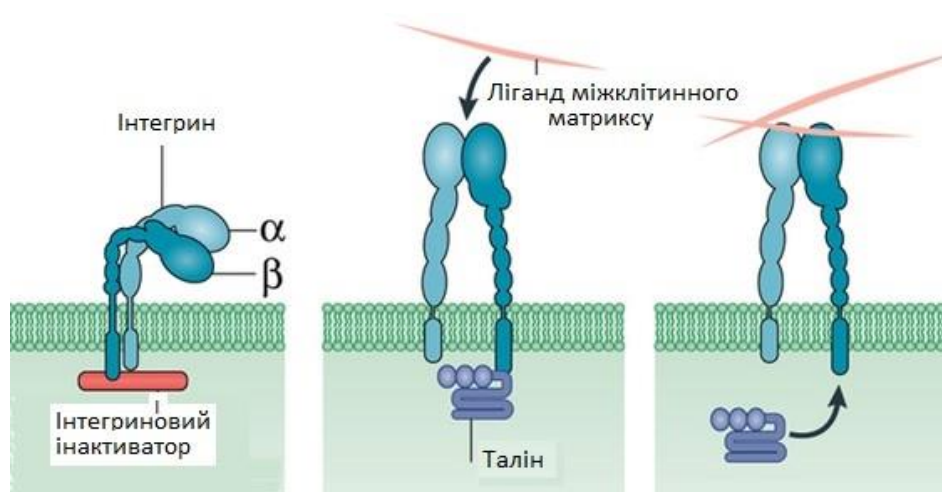


Рис. 10 Схема будови інтегринів

На сьогодні вже характеризовані 8 різних β -субодиниць, а згідно геномному аналізу їх може бути 15. Крім того, кожна із двох субодиниць може зв'язуватися у різних комбінаціях. Класифікація інтегринів ускладнена ще й тим, що більшість цих протеїнів можуть зв'язуватися більше, ніж з одним лігандом. Вони є зв'язувальними елементами між позаклітинним матриксом та цитоскелетом клітин (Danen, 2006).

У ссавців відомо 19 альфа та 8 бета субодиниць. Альтернативний сплайсинг породжує додаткові варіанти субодиниць, збільшуючи різноманітність комбінацій. Молекулярна вага субодиниць варіює від 90 до 160 кДа. У людини описано 18 альфа та 8 бета субодиниць, при цьому кожна альфа субодиниця утворює комплекс з певним набором бета-одиниць. Інтегрини знайдені у багатьох видів, у тому числі у нижчих еукаріот: губок, нематоди *Caenorhabditis elegans* (2α та 1β), у дрізофіли (5α та 1β) (Brown, 2000). Гетеродимери можуть зберігатись у цитоплазматичних пухирцях або

експресуватись як трансмембранні рецептори клітинної поверхні. Інтегриновий рецептор має довгий N-кінцевий позаклітинний трансмембранний домен та дуже короткий C-кінцевий цитоплазматичний домен (рис. 10). Різні поєднання α - та β -субодиниць визначають специфічність зв'язування позаклітинного домена рецептора з тим чи іншим лігандом. Для інтегринів лігандами частіше за все є різні протеїни позаклітинного матриксу: колагени, ламінін, фібронектин та інші. Тому, інтегринові рецептори відіграють головну роль у контактній взаємодії клітин з позаклітинним матриксом. Інтегрини беруть участь у передачі інформації з позаклітинного середовища до клітини, визначаючи таким чином напрямок диференціювання клітини, форму, мітотичну активність, здатність до міграції. Передача інформації може відбуватись і в зворотньому напрямку – від внутрішньоклітинних протеїнів через рецептор до позаклітинного матрикса (Yoshikazu, 2007).

Залежно від типу ланцюга, що входить до складу молекули, виділяють три типи інтегринів:

$\beta 1$ -інтегрини забезпечують зв'язок клітин з позаклітинним матриксом, зв'язуючись з глікопротеїновими компонентами (фібронектином, ламініном та вітронектином);

$\beta 2$ -інтегрини беруть участь в адгезії лейкоцитів до клітин ендотелію. Для того, щоб мігрувати до місця інфекції та запалення, лейкоцити повинні вступати у взаємодію з ендотеліальними клітинами судин. Ця взаємодія може опосередковувати зв'язування T-лімфоцитів з фібробластами при запаленні;

$\beta 3$ -інтегрини обумовлюють взаємодію тромбоцитів та нейтрофілів. Беруть участь в агрегації тромбоцитів, яка відбувається при зсіданні крові.

Більшість інтегринових рецепторів може зв'язуватись з декількома лігандами. Наприклад, інтегрин $\alpha 2\beta 1$ зв'язується з ламініном і колагенами I і IV типів, інтегрин $\alpha 3\beta 1$ – з фібронектином, ламініном та колагеном I типу тощо. Деякі інтегрини зв'язуються лише з одним лігандом: наприклад, інтегрин $\alpha 5\beta 1$ – тільки з фібронектином, а інтегрин $\alpha 6\beta 1$ – з ламініном (Woltersdorf, 2017).

Індивідуальність інтегринів строго специфічна. Центр зв'язування інтегринів утворений позаклітинними доменами α -і β -субодиниць. Інтегрини впізнають і зв'язуються з протеїнами, що містять певну амінокислотну послідовність -Арг-Глі-Асп-, присутню в ряді матриксних протеїнів (фібронектина, фібриногена, ламініна, колагена I типу) (Lu, 2016).

Добре вивчена роль інтегринів, перш за все, в процесах ембріональної міграції та формування полудесмосом в епітеліальних шарах. Характерним для інтегринів є той факт, що один і той же рецептор може слабо

зв'язуватися з різними, але подібними молекулами ліганда або мати різну спорідненість до одного і того ж ліганда. В одних випадках перевагу тому чи іншому субстрату або міцність зв'язування з ним пояснюється наявністю певних йонів (ефект зв'язування посилюється за присутності Ca^{2+} та Mg^{2+}), в інших – внутрішньоклітинним вмістом за типом клітин.

Сімейство кадгеринів представлене головним чином E-, N- та P-кадгеринами. Це подібні за структурою молекули (723-748 амінокислотних залишків), що детерміновані чотирма генами та мають ступінь гомології 50-60 %. Вони забезпечують адгезію у присутності іонів Кальцію (Verh, 2009). Це сімейство трансмембранних Ca^{2+} -залежних глікопротеїнів, що беруть участь у міжклітинній адгезії. Протеїни кадгеринокатенінового комплексу є найважливішим і найпоширенішим типом міжклітинної адгезії, і називаються кадгериновими сполуками. Вони відіграють принципове значення у підтриманні адгезивних контактів на рівні клітина-клітина, у транзиції епітелію у мезенхіму та навпаки, що принципово для підтримання пластичності тканини у період ембріонального розвитку. Деякі компоненти кадгерино-катенінового комплексу залучені до активації та функціонування кількох основних сигнально-регуляторних шляхів клітини, що контролюють клітинний поділ, процес диференціювання та апоптоз (Buckley, 2014). Все це свідчить про важливість адгезивних комплексів не лише у підтриманні гомеостазу тканини та її функціонуванні, а й у процесі розвитку (van Roy, 2014).

Кадгерини описані та характеризовані у 1980-1990 рр. двома незалежними групами вчених, які досліджували механізми міжклітинної адгезії при ранньому морфогенезі. На теперішній час у людини відомо вже більше 30 протеїнів – членів родини кадгеринів, але функція деяких з них й досі невідома. У більшості типів клітин кадгерини сконцентровані в місцях міжклітинних контактів, де утворюють так звані кадгеринові контакти. Класичні кадгерини – це трансмембранні протеїни, адгезивна активність яких регулюється цитоплазматичними партнерами, катенінами (рис. 11).

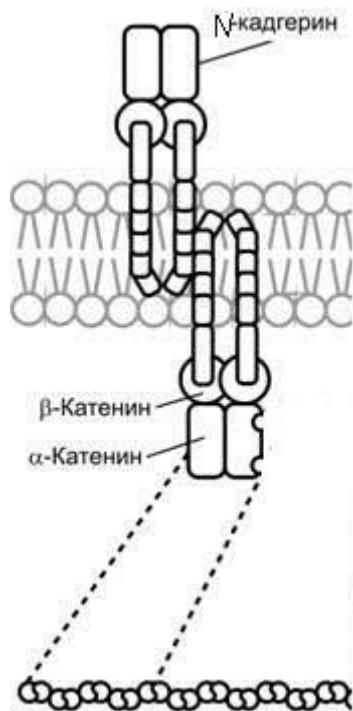


Рис. 11 Схема кадгерин-катенінового комплексу

Кадгерин – трансмембранний протеїн, екстрацелюлярний домен якого складається з п'яти повторів, EC-1-EC5. Цитоплазматичний хвіст протеїна зв'язується з β-катеніном, який у свою чергу взаємодіє з α-катеніном, формуючи стабільний протеїновий комплекс. α-Катенін забезпечує зв'язок з актиновим цитоскелетом. α-Катенін має сайт для зв'язування з плакоглобіном та β-катеніном, який складається з 228 амінокислотних залишків, 23 з них необхідні для гідروفобної взаємодії або тільки з плакоглобіном, або лише з β-катеніном (Niessen, 2011).

Переважає більшість клітин організму експресують молекули кадгерину, спочатку названі за типом тканини, в якій вперше були виявлені. Найбільш поширеними є:

E-кадгерин – епітеліальні клітини, яєчники, плацента, нирки;

N-кадгерин – нерви, м'язи, клітини селезінки;

R-кадгерин – плацента, епідерміс;

R-кадгерини – сітківка;

десмоглеїни, десмоколліни – кардіоміоцити, епітеліальні клітини.

E-кадгерин експресується всіма ембріональними клітинами ссавців, починаючи з одноклітинної стадії, і впродовж усього розвитку необхідний для розпізнавання і сортування клітин. Поділ і диференціювання тканин у процесі ембріогенезу пов'язано з диференціальною експресією різних генів кадгерина. Так, у ході гастрюляції клітини, що формують мезодерму, втрачають E-кадгерин і починають експресувати N-кадгерин. Відзначено також, що при міграції клітини втрачають кадгеринові молекули, але при ре агрегації знову відновлюють їх експресію на своїй поверхні. Прикладами можуть слугувати зникнення і поява N-кадгерина при міграції та ре агрегації клітин нервового гребеня, при роз'єднанні сомітів і утворенні нових структур (Shamir, 2015).

Більшість видів клітин експресують декілька типів кадгеринів, зокрема, скелетні м'язи експресують R-, M- та N- кадгерини. На противагу

скелетним, у серцевому м'язі експресується лише один класичний кадгерин – N-кадгерин. N-кадгерин експресується на високому рівні як в ембріональному, так і в дорослому міокарді, де він локалізується в інтеркалярних дисках та у місцях тісного контакту сусідніх карідоміоцитів. У тканині міокарді N-кадгерин не тільки виконує важливу функцію у формуванні кадгеринових сполук, але й бере участь у стабілізації та функціонуванні щільних контактів (Matsunaga, 2017). Для кадгеринів характерний гомофільний тип взаємодії, отже, кадгерини своїм екстрацелюлярним доменом взаємодіють з іншими кадгеринами того ж типу у вигляді блискавки (див. рис. 11). Внутрішньоклітинний домен класичних кадгеринів має сайти зв'язування з катенинами, які забезпечують зв'язок кадгеринів та актинового цитоскелета клітини. На сьогодні ідентифіковано та досліджено два α -катеніни, один β -катенін, один плакоглобін та один протеїн, асоційований з класичним кадгерин-катениновим комплексом у деяких типах клітин – р 120^{cm}.

Кадгерини різних тканин дуже схожі, гомологічні амінокислотні послідовності складають 50-60 %. Кожний протеїн містить один трансмембранний домен. За відсутності йонів Кальцію конформація кадгеринів змінюється, і вони стають доступні для протеолітичних ферментів, які їх розщеплюють.

Отже, кадгерини відіграють важливу роль при початковій міжклітинній адгезії, на стадіях морфо- та органогенезу. Вони забезпечують структурну цілісність та полярність тканин, особливо епітеліального моношару.

Суперродина імуноглобулінподібних протеїнів складають молекули, які в структурі мають один (чи більше) Ig-подібний домен та характерні внутрішні дисульфідні зв'язки. Головною функцією даних компонентів є утворення та підтримка гомо- та гетерофільної адгезії з розчинними та поверхневими лігандами клітин (Stoeckli, 2013; Chee, 2012). Серед представників цієї родини найбільш вивчені протеїни (частіше глікопротеїни): CD2 (LFA-2, E-розеткоутворюючий рецептор), що забезпечує антигеннезалежну T-клітинну адгезію; молекули, що формують T-клітинно-ендотеліальні взаємодії – ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, тромбоцитарно-ендотеліальну адгезію – CD31, Ca²⁺-незалежну адгезію – N-CAM, Ng-CAM, L1 (рис. 12).

Молекули кальцій-незалежної клітинної адгезії належать в основному до великої суперродини імуноглобулінів. Це Ca²⁺-незалежні молекули клітинної адгезії клітин хребетних.

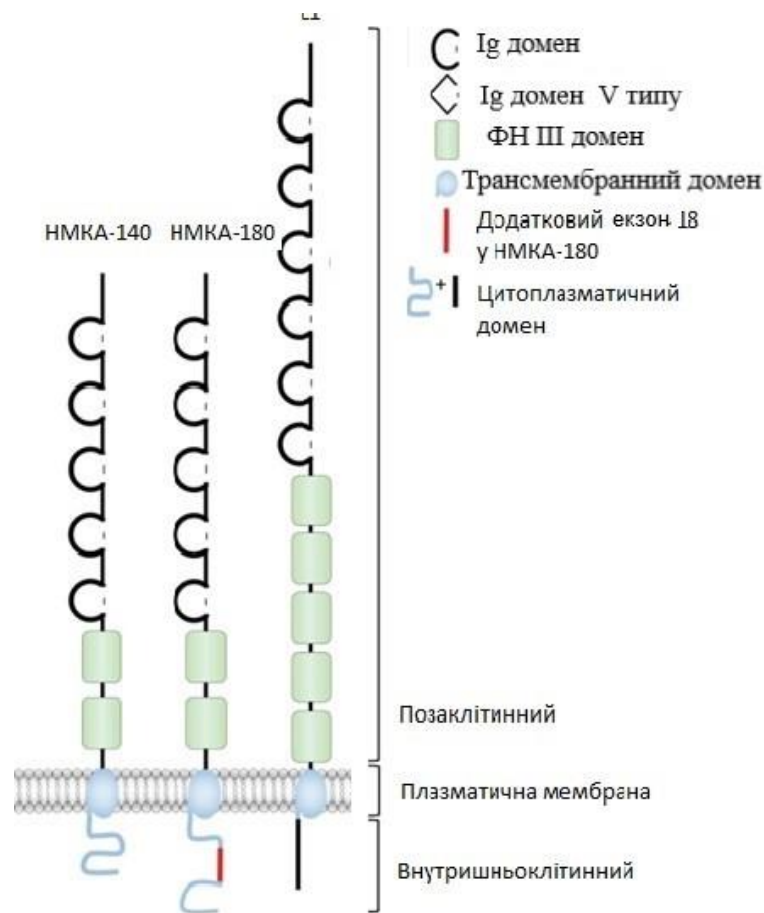


Рис. 12 Доменна структура нейрональних молекул клітинної адгезії

Вони «скріплюють» клітини шляхом безпосередньої гомофільної взаємодії двох молекул і можуть брати участь у впізнаванні клітинної поверхні.

У хребетних відомо кілька груп такого роду протеїнів. У більшості форм протеїнів цього сімейства позаклітинна частина поліпептидного ланцюга має структуру, схожу з організацією доменів імуноглобулінів (Soroka, 2010). Це нейрональна молекула клітинної адгезії (НМКА), протеїн дрозофіли фасцилін II, нейрогліан гомологічний L1.

На даний час вчені приділяють велику увагу вивченню молекул клітинної адгезії (МКА), які грають ключову роль у процесах ембріогенезу, підтримки гомеостазу, прогресування патологічних процесів, запалення, а також інфільтрованого зростання пухлин, їх метастазування (Kiselyov, 2003). МКА забезпечують не тільки взаємодію між клітинами і позаклітинним оточенням, але значною мірою визначають швидкість проліферації клітин, активацію певних генів, будову і структуру клітин (Santucci, 2005). Процеси за участю МКА здійснюються шляхом комплементарної ліганд-рецепторної взаємодії, в якому МКА однієї клітини з'єднуються з МКА іншої або з макромолекулярним комплексом міжклітинного матрикса, що складається з колагена, фібронектина і

ламiніна, або інших макромолекул. На даний час добре вивчена структура МКА, розроблено їх сучасні класифікації, молекулярна будова, генетика, зміни функцій в залежності від довжини молекули, її зв'язку з мембраною клітини, наявності карбогідратних і кальцій-зв'язуючих угруповань. Важливу роль у регуляції функції МКА грають сіалові кислоти, які створюють негативний заряд і зменшують адгезивну здатність цих молекул, що обумовлює велику рухливість клітин і зменшує ступінь їх адгезивного зв'язку між собою. Серед МКА особливу групу представляють молекули нейрональної клітинної адгезії (НМКА).

НМКА належить до суперсімейства імуноглобулінів і включає трансмембранні та мембранні глікопротеїни, які характеризуються наявністю змінної кількості доменів Ig, аналогічних змінним або постійним Ig-доменів антитіл (Chernyshova, 2011). У геномі людини ця суперродина є найбільшим сімейством протеїнів, на даний час складається з 765 генів, її члени включають в себе основні протеїни гістосумісності класу I і H, протеїни комплексу рецепторів T-клітин, інші поверхневі глікопротеїни лімфоцитів, вірусні рецептори, маркери пухлин, рецептори фактору росту і глікопротеїни на поверхні клітин, які в основному виявляються в нервовій системі. Молекули цієї родини є найбільш різноманітною групою рецепторів клітинної поверхні, причому 65 протеїнів, беруть участь у клітинній адгезії. Позаклітинні частини багатьох молекул суперродини складаються з безлічі Ig-подібних доменів, з'єднаних, наприклад, як кульки на нитці.

НМКА спочатку описали вчені Edelman, Jorgensen і Vock як синаптичний мембранний протеїн D2, а пізніше показано, що він опосередковує клітинну адгезію (Hansen, 2008). НМКА була першим адгезивним протеїном, який був ідентифікований. Цей протеїн також був виділений і охарактеризований Brackenhury і Thiery в незалежному дослідженні (Jakovcevski, 2007).

НМКА присутня в нейронах, гліальних клітинах, серці, скелетних м'язах. Існує близько 27 різних ізоформ НМКА, які можуть бути створені за допомогою альтернативного сплайсингу РНК. Три основні ізоформи - НМКА-180, НМКА-140 і НМКА-120 з молекулярними масами 180, 140 і 120 кДа відповідно. Позаклітинні частини трьох основних ізоформ НМКА ідентичні і містять п'ять N-кінцевих доменів Ig, за якими прямують два домена Fn3, які мають найтісніший контакт з мембраною. Трансмембранні ізоформи НМКА-180 і НМКА-140 мають внутрішньоклітинні частини різної довжини. Ізоформа НМКА-120 пов'язана з мембраною за допомогою якоря глікозилфосфатиділінозитола (ГФІ) без внутрішньоклітинних

залишків. Внутрішньоланцюгові частини ізоформ НМКА-140 і НМКА-180 складаються з 120 і 385 залишків, відповідно (Sytnyk, 2017). Оскільки в обох послідовностях може бути прогнозовано лише кілька коротких спіралей і ниток, цитоплазматична частина НМКА, мабуть, в основному розгортається. Ці форми називають ще НМКА-А, НМКА-В та НМКА-С. Відмінності визначаються довжиною трансмембранної та цитоплазматичної частин, А- і В-форми НМКА експресуються на нейронах, причому, форма А – по всьому тілі нейрона, на зовнішній поверхні мембрани і на постсинаптичній мембрані; В- та С-форми експресуються на астроцитах, С – на олігоденденцитах (Puchkov, 2011). Експресія НМКА виявлена на міоцитах у зоні нервово-м'язового контакту, на лімфоцитах, органах ендотеліальної, репродуктивної та мозкової систем. НМКА 140 виявляється на кінцевих клітинах мікросудин людини, тобто не існує строгої органної специфічності НМКА. На ембріональній формі НМКА розташовані до 30 % (по масі) залишків сіалових кислот, у дорослих форм – до 10 %.

НМКА має ймовірно шість N-пов'язаних сайтів глікозилування. Один сайт знаходиться в третьому домені Ig. Два сайти знаходяться в четвертому домені Ig, а три сайти знаходяться в п'ятому домені Ig. НМКА помітно відрізняється від інших глікозилуваних протеїнів своєю здатністю переносити високі рівні негативно зарядженої полісіалової кислоти (ПСК), яка складається з гомополімерів (більше 55 залишків) α -2-8 пов'язаних залишків N-ацетилнейрамінової кислоти (Shetty, 2013). Ланцюги ПСК прикріплені до п'ятого домена Ig на двох з трьох N-пов'язаних сайтів глікозилування.

Процес сіалування НМКА чітко регульований: на ранніх стадіях ембріогенезу полісіалових залишків немає, на більш пізніх стадіях – процес сіалування досягає максимуму. Після народження ембріональні форми НМКА переходять в дорослі, і рівень сіалування знижується. Однак і в мозку дорослого в деяких його відділах (нюхові цибулини, зубчаста звивина, гіпоталамус, дорсальний виступ спинного мозку) виявляють полісіалові форми НМКА. Вони експресуються також на нервах і м'язах в зоні їх пошкодження. Максимальну експресію спостерігають на 4-му тижні постнатального розвитку, що збігається з дозріванням олігодендроцитів і початком процесу мієлінізації, потім експресія НМКА-120 знижується (Bukalo, 2004). Максимально сіалова ембріональна форма НМКА експресується на 10-12-у добу постнатального розвитку, що збігається з утворенням нервових волокон. Доведено збільшення кількості полісіалових залишків на зростаючому аксоні, особливо в точці його зростання, що передбачає зменшення гомофільної адгезивної дії НМКА при зростанні

аксона. Процес полісіалування НМКА регулюється гормонально (Cremer, 1998). Мабуть, НМКА є морфорегуляторним продуктом гена, контролюючого розвиток і реагує на сигнали, асоційовані зі специфічним процесом диференціації клітин. Ціле сімейство регульованих сіалотрансфераз, специфічно активують НМКА, активують міграцію клітин і стабілізацію їх контактів. Едельман сформулював морфорегуляторну гіпотезу розвитку і формоутворення організму за участю НМКА (Pierre, 2001). На даний час встановлено, що експресія гена НМКА регулюється продуктами цілого ряду генів, у тому числі гісторегуляторних. Крім того, рівень експресії молекул субстратної і клітинної адгезії змінюється при дії на клітину нейротрансмітерів, деяких гормонів, трофічних факторів, наприклад, фактора росту нервів, зміні внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} і Na^{+} , під впливом екстрацелюлярного матриксу. Відповідно до морфорегуляторної гіпотези, основну роль у розвитку і формоутворенні організму грають найбільш давні морфорегуляторні гени, що відповідають за експресію молекул субстратної і клітинної адгезії, завдяки яким відбувається міграція клітин або їх злипання з утворенням сукупності клітин (тканину або орган). Оскільки НМКА виконують і роль рецепторів на поверхні клітини, їх гомофільне зв'язування є сигналом для зміни метаболізму клітин. У свою чергу, утворені метаболіти формують колектив клітин (гормони, трофічні фактори і т.п.), які регулюють роботу НМКА генів, і весь цикл повторюється. Крім мембраноасоційованих, в нормі існують і розчинні форми НМКА. Молекулярну масу 190 кД мають НМКАs1, 135 кД – НМКАs2, 115 кД – НМКАs3. НМКАs3 є позаклітинною частиною молекул НМКА А, НМКА В, НМКА С. НМКАs1 утворюється з НМКА А, НМКАs2 – з НМКА В. Моноклональні антитіла до трансмембранних і цитоплазматичних епітопів НМКА А і НМКА В реагують з НМКАs1 і НМКАs2, підтверджуючи, що НМКАs1 і НМКАs2 є інтактними розчинними НМКА А і НМКА В. Розчинні форми НМКА знайдені в спинномозковій рідині, сироватці крові, екстракті мозку щурів, екстрацелюлярному матриксі м'язів і периферичних нервів у концентрації близько 1 мкг/мл. Розчинні форми НМКА інгібують ріст клітин на субстраті з іммобілізованими НМКА. Це свідчить, що розчинні форми НМКА є модуляторами НМКА-опосередкованої поведінки клітин. У мозку людини міститься 1–2 % розчинної форми НМКА, що становить 25-100 мкг/мл залежно від стадії розвитку мозку.

Друга нейрональна НМКА – це глікопротеїн L-1, імунохімічний ідентичний молекулам NgCAM, NILE. Молекула синтезується як глікопротеїн з молекулярною масою 200 кД одним геном, альтернативний

сплайсинг не спостерігають. L1 є інтегральним мембранним глікопротеїном з молекулярною масою 200 кД, N-кінець якого локалізований із зовнішнього боку мембрани, С- кінець – з внутрішньої (Sadoul, 1988). L1 експресується на нейронах і нейролемоцитах периферичної нервової системи, не експресується на незрілих нейронах, з'являється лише коли гранулярні нейрони готові до міграції. У зрілих нейронах експресуються молекули нейрональної клітинної адгезії і переважно на нейритах при утворенні нервових волокон. У мозку, який розвивається, його знаходять в області клітинних контактів, на мієлінізованих нейронах відсутній (Samatov, 2016). При нормальному розвитку міжклітинна взаємодія і диференціація регулюються кількома факторами, включаючи МКА. Так, у тканинах мозку міграція клітин і їх контакт у процесі формування органу регулюються спочатку НМКА і N-кадгеринами, на більш пізніх стадіях розвитку – L1. Таким чином, при порушенні експресії МКА порушуються процеси розвитку організму. Ймовірно, нерегульований ріст і міграція злоякісних клітин (Kiefel, 2012; Altevogt, 2016).

У головному мозку основними процесами при формуванні шарів кори та утворенні нервових зв'язків є міграція недиференційованих нейрональних гранулярних клітин, зростання нейритів і утворення стабільних клітинних контактів.

НМКА опосередковує клітинну адгезію через гомофільні, а також через гетерофільні взаємодії (Wobst, 2015). Після зв'язування НМКА трансмембранна сигналізація вважається активізованою, що призводить до збільшення внутрішньоклітинного Кальцію. Проявляючи клітинну адгезію до інших клітин і внутрішньоклітинного матриксу і активізуючи внутрішньоклітинні сигнальні шляхи, НМКА впливає на міграцію клітин, розширення нейритів і фасцикуляцію і, можливо, утворення синапсів у головному мозку. З досліджень, проведених на нокаутних мишах НМКА, показано, що НМКА має вирішальне значення для формування нюхової цибулини та гіпокампа (Niethammer, 2002). Крім того, НМКА важливий для пластичності нейронів у дорослому мозку, пов'язаному з навчанням і регенерацією.

За допомогою опосередкування клітинної адгезії та трансдукції сигналу молекули адгезії нейронних клітин регулюють розростання нейритів та розпізнаванням мішені і розвивається у нервовій системі. Крім того, ряд досліджень вказує на важливу роль НМКА в області регенерації та навчання (Saini, 2016). Миші з дефіцитом НМКА мають затримки в процесі навчання. Доведено, що за умов ін'єкцій НМКА-антитіл та при внутрішньочерепних травмах відбувається блокування довгострокового

потенціювання (ДСП) у ділянках гіпокампа та процес навчання. У нервовій системі хребетних НМКА є домінуючим носієм полісіалової кислоти (ПСК). Експресія ПСК-НМКА помітно зменшується під час розвитку. Тим не менш, підвищена регуляція полісіалової кислоти в мозку, включаючи гіпокампа, спостерігається після навчання (Senkov, 2012). Крім того, ферментативне видалення полісіалової кислоти приводить до порушень довготривалої потенціації та навчання. В м'язах експресія ПСК-НМКА підвищується після денервації. Ця відповідь послаблена у літніх щурів (Lobanovskaya, 2015). Показано, що експресія НМКА і ПСК регулюється нейронною активністю, це передбачає, що НМКА може сприяти структурному ремодулюванню залежно від активності, пов'язанної з навчанням та регенерацією (Loers, 2014).

Молекула адгезії нервових клітин та її полісіалова форма сприяють багатьом аспектам розвитку та пластичності центральної нервової системи. Це включає механізми диференціювання та міграції клітин, зростання нейритів, встановлення специфічних синаптичних зв'язків, синаптичної пластичності та довготривалого потенціювання (Hirokawa, 2010). Адгезійні властивості здаються важливими, але останні дослідження також вказують на можливі взаємодії між НМКА і ПСК-НМКА з внутрішньоклітинними сигнальними каскадами, які необхідні для біологічних функцій. Деякі із цих механізмів обговорюються, і пропонується гіпотеза, заснована на наявності перехресних перешкод між цими молекулами і сигнальними шляхами, опосередкованими факторами росту (Salvo, 2007). Адгезивні молекули залежно від вмісту в них залишків сіалової кислоти можуть виконувати різні функції. Сіалові кислоти здатні різко зменшувати адгезивність клітин по відношенню один до одного. Клітини з відносно низьким вмістом сіалової кислоти агрегують в 4 рази легше, ніж клітини з високим рівнем. З розвитком зародка більша частина протеїнів МКА із форм з високим вмістом сіалової кислоти перетворюється у форми з її низьким вмістом.

Деякі імуноглобуліноподібні МКА зв'язують клітини разом за допомогою гетерофільного механізму, це міжклітинні адгезивні молекули (intercellular adhesion molecules, ICAM), які експресуються на поверхні активованих ендотеліальних клітин, де вони зв'язуються з інтегринами на поверхні білих кров'яних клітин і, таким чином, допомагають захоплювати білі кров'яні клітини в місцях запалення. Ці молекули обумовлюють як розпізнавання антигенів, так і міжклітинні взаємодії.

Сімейство селектинів складають адгезивні протеїни, які у своїй структурі мають варіабельну кількість (2-9) повторів комплементрегулюючих доменів, домен епідермального фактору росту та

N-кінцевий лектиновий домен (Feng, 2017). Ці протеїни забезпечують міжклітинні взаємодії за рахунок зв'язування карбогідратних терміналей нативних лігандів із N-кінцевим лектиновим доменом селективнів. На сьогодні вже добре охарактеризовані три представники: L-селектин (Le-8, Lu-22, LAM-1, MEL-14, лімфоцитарний хомінговий рецептор), E-селектин (ELAM-1) та P-селектин (CD62, PADGEM, GMP-140), які відрізняються за кількістю повторів домену комплементрегулюючого протеїна (2, 6 та 9, відповідно).

Селектини класифікуються за назвами клітин, в яких вони вперше були виявлені: L-селектин – лейкоцитарний; E-селектин – ендотеліальний; P-селектин – тромбоцитарний (виявлений і в ендотелії).

Селектини L, P, E різняться кількістю блоків у комплементрегуляторному протеїні (рис. 13).

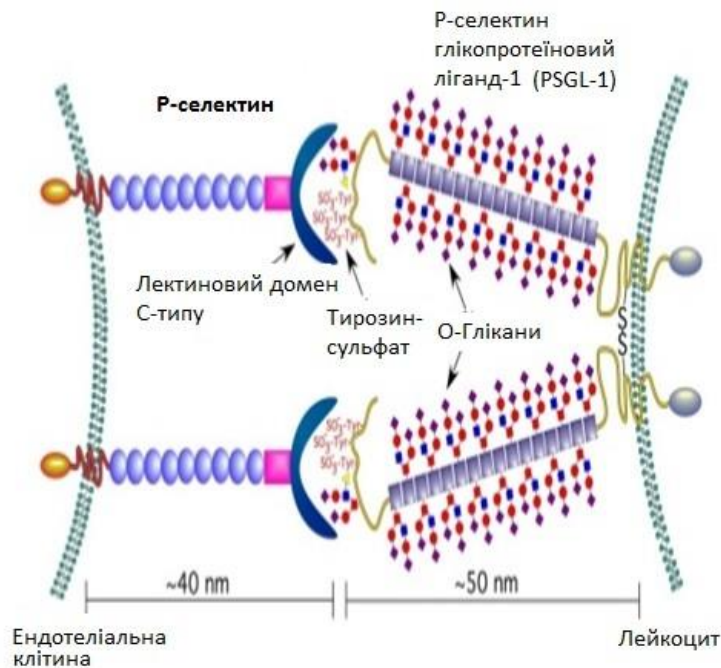


Рис. 13 Взаємодія клітин за участю селектина

Лектини – сімейство протеїнів, що специфічно взаємодіють з певними послідовностями вуглеводних залишків у складі глікопротеїнів, протеогліканів і гліколіпідів позаклітинного матрикса.

Доведена роль, яку відіграють селектини в процесах міграції лейкоцитів із судинного русла, описані їх глікопротеїнові ліганди (адресіни) на поверхні лейкоцитів, тромбоцитів, нейтрофілів та ендотеліальних клітин. Селектинам, як і іншим МКА, які беруть участь у

подібних процесах, присвоюють інші (синонімічні) назви. Наприклад, селектином, що відповідає за диференціювання, відноситься CD43.

Разом з тим, важлива роль відводиться селектину в ранньому ембріогенезі. L-селектин виявлений на поверхні зрілого ооцита, в процесі дроблення зникає і знову експресується на клітинах бластоцисти напередодні імплантації; в той же час олігосахаридні ліганди виявлені на мембранах епітелію ендометрію і зберігаються там протягом періоду можливої імплантації (20-24 добу статевого циклу). Р-селектини виявлені на поверхні гамет, й ініціація взаємодії прозорої оболонки і поверхні сперматозоїда з подальшою акросомальною реакцією є селектин-опосередкованим процесом: рецептор-фермент глікозилтрансфераз на поверхні сперматозоїда розпізнає N-ацетилглюкозамін у складі прозорої оболонки ооцита і т.д.

В групу **інших** адгезивних молекул – включають адгезивні молекули, які не співпадають із характеристикою попередніх груп. В більшості це представники молекул клітинної диференціації – CD26, CD28, CD36, CD44, CD78.

2.3 Компоненти міжклітинного матрикса

Позаклітинний матрикс складають специфічні протеїни (колагени, ламінін, фібронектин, нідоген/ентактин та ін.), протеоглікани та глікозаміноглікани.

Колаген – основний структурний протеїн міжклітинного матриксу. Він становить від 25 до 33 % загальної кількості протеїна в організмі, тобто – 6 % маси тіла. У різних тканинах переважають різні типи колагена, а це, в свою чергу, визначається тією роллю, яку колаген грає в конкретному органі чи тканині. Колаген – яскраво виражений поліморфний протеїн. На даний час відомо 19 типів колагена, які відрізняються один від одного за первинної структурі пептидних ланцюгів, функціям і локалізації в організмі. Молекула колагена є правозакрученна спіраль з трьох α -ланцюгів. Така спіраль відома під назвою тропоколагена. Один виток спіралі α -ланцюга містить три амінокислотних залишки. Молекулярна маса колагена близько 300 кДа, довжина 300 нм, товщина 1,5 нм. Структурні одиниці колагена, тропоколаген, спонтанно об'єднуються, прикріплюючись один до одного зміщеними на певну відстань кінцями, утворюючи в міжклітинній речовині великі структури. Всередині тропоколагенів існує ковалентний зв'язок між ланцюгами (Kielty, 2002).

Фібронектин – один з ключових протеїнів міжклітинного матриксу, неколагенових структурний глікопротеїн, який синтезується і виділяється у міжклітинний простір багатьма клітинами. Він побудований з двох ідентичних поліпептидних ланцюгів, з'єднаних дисульфідними містками зі своїх С-кінців. Поліпептидний ланцюг фібронектина містить 7-8 доменів, на кожному з яких розташовані специфічні центри для зв'язування різних речовин. Фібронектин може зв'язувати колаген, протеоглікани, гіалуронову кислоту, вуглеводи плазматичних мембран, гепарин, фермент трансглютаміназу. Завдяки своїй структурі фібронектин може виконувати інтегруючу роль в організації міжклітинної речовини, а також сприяти адгезії клітин. Існує кілька форм фібронектина, які синтезуються різними клітинами. У серцевому м'язі синтезується нерозчинна форма фібронектину. Обидві форми фібронектина залучаються до різноманітних процесів: сприяють адгезії і поширенню епітеліальних і мезенхімальних клітин, стимулюють проліферацію та міграцію ембріональних і пухлинних клітин, контролюють диференціювання і підтримку цитоскелета клітин, активно беруть участь у запальних та репаративних процесах (Singh, 2010).

Ламінін – найбільш поширений неколагеновий глікопротеїн базальних мембран. Він складається з трьох поліпептидних ланцюгів: А, В1 і В2. Молекула ламініна має хрестоподібну форму з трьома одноланцюжковими гілками і однією триланцюговою гілкою. Кожен ланцюг ламініна містить кілька глобулярних і паличковидних доменів, на яких є специфічні центри зв'язування для різних молекул. Ламінін взаємодіє з усіма структурними компонентами базальних мембран. Крім того, молекула ламініна має кілька центрів зв'язування з клітинами. Головні функції ламініна визначаються його здатністю зв'язувати клітини і модулювати клітинну поведінку. Він може впливати на зростання, морфологію, диференціювання і рухливість клітин (Bosman, 2003; Sasaki, 2004).

Нідоген – сульфатований глікопротеїн базальних мембран, утворює з ламініном щільний, нековалентно пов'язаний комплекс; сила зв'язування нідогена з колагеном IV типу набагато менше, ніж з ламініном. Цей протеїн представлений одним поліпептидним ланцюгом, що містить три глобулярних домени. Один з доменів нідогена має центр зв'язування ламініна, в іншому домені знаходиться центр зв'язування колагена. Таким чином, нідоген може виступати в якості містка між різними компонентами міжклітинного матрикса і брати участь в утворенні потрійних комплексів ламінін – нідоген – колаген (Pozzi, 2016).

Серед розчинних медіаторів виділяють **цитокіни** (інтерлейкіни, фактор некрозу пухлин) (Dinarello, 2000) та фактори росту (епідермальний фактор росту, інсулінподібний фактор росту, тромбоцитарний фактор росту, трансформуючий фактор, фактор росту нервів та ін.). Інколи виділяють в окрему групу факторів міжклітинних взаємодій онкогени, які специфічно чутливі до факторів росту та цитокінів, що активують клітинну проліферацію, але в більшості разів ці гени продукують матричні транскрипти саме до факторів росту.

2.3.1 Глікозаміноглікани

Глікозаміноглікани – найбільш розповсюджені гетерополісахариди в організмі людини (ГАГ). Глікозаміноглікани історично названі мукополісахаридами через те, що вони були від самого початку описані як складові слизових оболонок і слизових ексудатів.

Серед аміноцукрів найбільш розповсюджені D-глюкозамін та D-галактозамін. Наявність аміногрупи у молекулі моноцукру визначає його хімічні особливості. Для аміноцукрів характерні не тільки загальні властивості вуглеводів та амінів, але й специфічні властивості, які обумовлені просторовим розташуванням гідроксильної, аміної та альдегідної груп. Специфічність додає ще здатність аміногрупи у складі аміноцукрів до ацетилювання. Зважаючи на важливу роль аміноцукрів у структурі глікозаміногліканів, необхідно мати надійні кількісні методи їх визначення. Але, на сьогодні є певні труднощі з визначенням кількості окремих аміноцукрів тому, що кількісні методи визначення гексозамінів залежать від багатьох факторів, наприклад, наявності у суміші звичайних моноцукрів, а також амінокислот, які залишаються у середовищі після гідролізу протеогліканів та глікопротеїнів.

Інші складові глікозаміногліканів – уронові кислоти – є моноцукрами, в структурі яких первинноспиртова група окислена до карбоксильної групи. Серед даних кислот до складу ГАГ частіше залучаються D-глюкуронова та L-ідукуронова кислоти. У клітинах тварин уронові кислоти утворюються чи шляхом ферментативного дегідрування нуклеотиддифосфатцукрів за участю дифосфопіридинаденіннуклеотида, чи шляхом епімеризації при C₅ інших уронових кислот.

Молекули ГАГ – це довгі нерозгалужені полісахариди, що містять повторювану ланку дисахаридів. Дисахаридні блоки містять будь-який із двох модифікованих цукрів – N-ацетилгалактозамін (GalNAc) або N-ацетилглюкозамін (GlcNAc) і уронові кислоти, такі як глюкуронова (GlcA)

або ідуронова (IdoA). ГАГ мають негативний заряд і розширену конформацію, що надає високу в'язкість розчину, в якому вони знаходяться. ГАГ розташовані в основному на поверхні клітин або у позаклітинному матриксі, проте також знайдені в секреторних везикулах у деяких типах клітин. Розподіл глікозаміногліканів, знайдених у сполучній тканині хребетних, наведений у табл. 3 (Afratis, 2012; Scott, 2013).

Поряд із високою в'язкістю ГАГ властива низька стисливість, що робить їх ідеальною мастильною рідиною в суглобах. У той же час їх жорсткість забезпечує структурну цілісність клітин і міжклітинних проходів, що спорожнює міграцію перших. Надзвичайно важливу фізіологічну роль мають: гіалуронова кислота, дерматансульфат, хондроїтин-4-сульфат, хондроїтин-6-сульфат, гепарин, гепарансульфат і кератансульфат (Gandhi & Mancera, 2008).

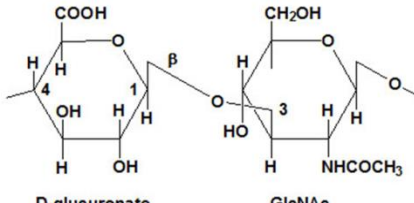
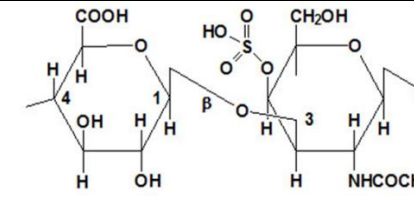
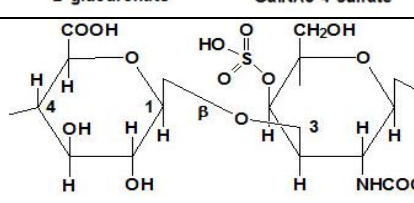
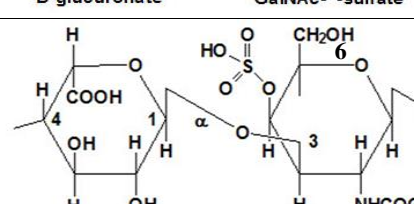
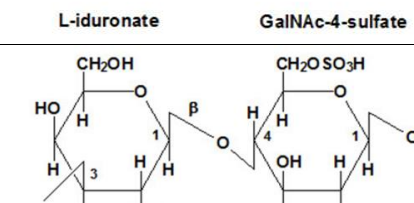
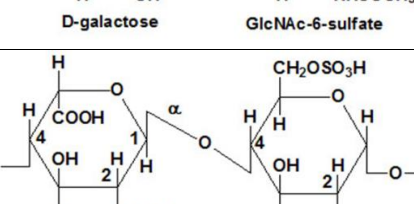
Таблиця 3

Розподіл глікозаміногліканів у тканинах хребетних (Zhang, 2010)

Тип ГАГ	Локалізація
Гіалуронова кислота	Склоподібне тіло, синовіальна рідина, шкіра, хрящ, кістки, пухка сполучна тканина
Хондроїтин	Рогівка, аорта, хрящ, шкіра, кістки, склера
Хондроїтин-4-сульфат	Хрящ, шкіра, сухожилля
Хондроїтин-6-сульфат	Хрящ, шкіра, сухожилля
Гепарин	Шкіра, легені, печінка, судини
Гепарансульфат	Легені, аорта
Кератансульфат I	Рогівка
Кератансульфат II	Шкіра, сухожилля, склера, рогівка, серцеві клапани
Дерматансульфат	Хрящ

Сьогодні вже точно визначено структуру дисахаридних компонентів родини ГАГ, на чому і базується їх класифікація (табл. 4).

Структура основних класів глікозаміногліканів (Gandhi, 2008)

Клас	Уронова кислота	Аміноцукор	Формула
Гіалуронова кислота	Глюкуронова кислота, GlcUA	N-Ацетил-глюкозамін, GlcNAc	 <p>D-glucuronate GlcNAc</p>
Хондроїтин-4-сульфат	Глюкуронова кислота, GlcUA	N-Ацетил-глюкозамін-4-сульфат, GalNAcSO ₃ -4S	 <p>D-glucuronate GalNAc-4-sulfate</p>
Хондроїтин-6-сульфат	Глюкуронова кислота, GlcUA	N-Ацетил-глюкозамін-6-сульфат, GalNAcSO ₃ -6S	 <p>D-glucuronate GalNAc-6-sulfate</p>
Дерматан-сульфат	Ідуоронова кислота, IdoUA	N-Ацетил-глюкозамін-4-сульфат, GalNAcSO ₃ -4S	 <p>L-iduronate GalNAc-4-sulfate</p>
Кератан-сульфат	Галактоза, Gal	N-Ацетил-глюкозамін-6-сульфат, GalNAcSO ₃ -6S	 <p>D-galactose GlcNAc-6-sulfate</p>
Гепарин і гепарансульфат	Глюкуроніл-2-сульфат, GlcUASO ₃ -2S Ідуроніл-2-сульфат, IdoUASO ₃ -2S	N-Ацетил-глюкозамін-6-сульфат, GalNAcSO ₃ -6S	 <p>L-iduronate-2-sulfate N-sulfo-D-glucosamine-6-sulfate</p>

Структурна організація та функції гіалуроната

Гіалуронова кислота (ГК, гіалуронат) є унікальною серед ГАГ тим, що вона не містить сульфат і не утворює ковалентні зв'язки з протеїнами, які входять до складу протеогліканів. Однак, вона входить до складу нековалентно утворених комплексів із протеогліканами в позаклітинному матриксі. Полімерам гіалуронової кислоти притаманні велика молекулярна маса (100 – 10 000 кДа) та потужна гідратна оболонка. Структура ГК досить проста – довгий ланцюг, що складається з повторів [D-глюкуронат-1-β-3-N-ацетилглюкозамін (1-β-4)]_n. Молекула ГК стабілізується водневими зв'язками паралельно до осі ланцюга. Полімер поступово набуває жорсткої конфігурації петель, що дає змогу зберігати структуру спіралі в розчині. Більша частина води механічно іммобілізована в спіралі та не зв'язана з полісахаридом хімічно. Вторинна структура гіалуроната формується завдяки утворенню кластерів гідрофобних груп, що може провокувати взаємозв'язок між ланцюжками (Zhang, 2010).

Гіалуронат – найбільший полісахарид, що продукують клітини хребетних (рис. 14). Величезний розмір цих молекул робить їх відмінним мастилом й амортизатором у суглобах (Santilli, 2016).

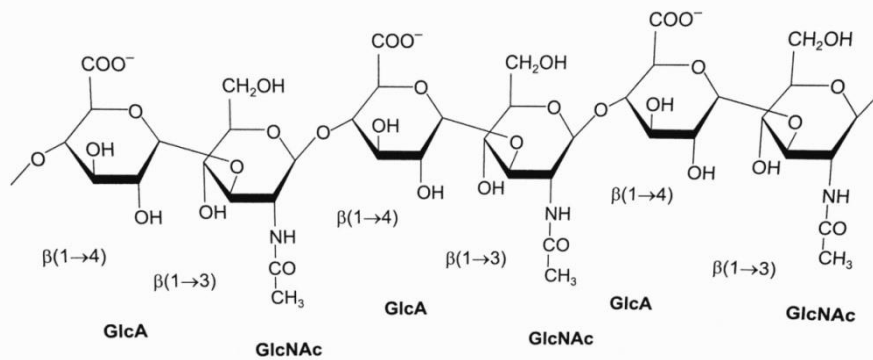


Рис. 14 Головні елементи структури гіалуронової кислоти (Kogan, 2007).

Практично всі клітини в організмі людини синтезують гіалуронат. Коли тканинна маса збільшується та клітини повинні мігрувати, синтез гіалуронової кислоти зростає. Отже, вона має істотну роль у розвитку організму, організації тканини, клітинної проліферації та сигнальних процесах.

Синтез гіалуроната каталізується сімейством гіалуронатсинтаз (HAS), кожна з яких містить подвійну каталітичну активність, необхідну для передачі відповідних залишків цукрів (N-ацетилглюкозаміна та глюкуронової кислоти), при утворенні полімерів гіалуронової кислоти.

Існує три гени ссавців HAS, HAS1, HAS2 і HAS3, які кодують від п'яти до шести гомологічних трансмембранних протеїнів і цитоплазматичних протеїнів. На відміну від усіх інших ГАГ, гіалуронат синтезується на внутрішній поверхні цитоплазматичної мембрани. Цей спосіб синтезу полегшує екструзію довгих полімерів у позаклітинний матрикс. Ці полімери, як правило, становлять близько 10^4 дисахаридів у довжину, які перевищують 3000 кДа у масі. Вважається, що протеїн, який кодується геном HAS3, виступає регулятором синтезу гіалуроната, HAS1 і HAS2 задіяні безпосередньо в його синтезі (Papakonstantinou, 2012).

Спочатку вважали, що головна функція гіалуроната як елемента сполучної тканини – зв'язування води. Внаслідок такої взаємодії міжклітинна речовина набуває структури желеподібного матрикса, здатного підтримувати архітектуру клітини. Сьогодні спектр функційного навантаження цього ГАГ значно розширився, хоча багато особливостей потребують подальших досліджень. Функція ГК, в більшості випадків, залежить від взаємодії з протеїнами, які присутні на поверхні клітини і/або секретуються в позаклітинному матриксі. ГК-зв'язувальні протеїни були спочатку виявлені в хрящі, їх сімейство тепер називається **гіалатгеринами**. Вони містять два реакційні центри, один із яких специфічно взаємодіє з гіалуроновою кислотою і, в результаті, утворює основу, на якій агрегуються протеоглікани (агрекани). Другий центр закріплює протеоглікан на гіалуронатному ланцюзі. Відсутність гіалатгеринів унеможлиблює закріплення протеогліканів, що призводить до виникнення дефектів у розвитку хряща та формування кісткової тканини (коротких кінцівок та черепно-лицевих аномалій) (Santilli, 2016).

Деградація гіалуронової кислоти відбувається в лізосомах під дією специфічних ферментів – гіалуронідази, β -глюкуронідази, β -N-ацетилглюкозамінідази. Гени гіалуронідази людини включають HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4 і SPAM1/PH-20. HYAL1 і HYAL2 відіграють значну роль у деградації ГК у більшості соматичних тканин. HYAL3 також проявляє активність у соматичних тканинах, але ключову роль відіграє у функції сперми. HYAL4 не виявив гіалуронідазної активності, натомість фермент за природою є хондроїтиназою. SPAM1 (PH-20) кодує протеїн, ідентифікований як сперматозоїд-адгезивна молекула 1. SPAM1 кодує протеїн, який є GPI-прив'язаний фермент, знайдений на поверхні сперматозоїдів людини та внутрішній мембрані акросоми. Цей ензим дозволяє сперматозоїдам проникати через шар гіалуронової кислоти, якою збагачена поверхня ооцита (Kimura, 2009).

ГК має важливе значення в процесах морфогенезу та диференціації клітин. Її концентрація збільшується локально там, де відбувається міграція клітин. Однак вважається, що в'язкий розчин гіалуроната, навпаки, сповільнює активність клітин. Гіалуронова кислота робить фагоцитоз у моно- та гранулоцитах інтенсивнішим. ГК також захищає клітини від цитотоксичних лімфоцитів і вірусів.

Гіалуронат трапляється майже в усіх тканинах і рідинах тварин. Особливо багато її у складі ранніх ембріонів. ГК знайдено у шкірі, хрящі, канатику пупа, склистому тілі, синовіальній рідині, серцевих клапанах, кістках, хрящах ембріона. Концентрація цього глікозаміноглікана в деяких тканинах і рідинах наведена в таблиці 5.

Таблиця 5

Розподіл глікозаміногліканів у тканинах людини

Тканини, рідини	Концентрація, мг/л
Канатик пупа	4100
Синовіальна рідина	1420–3600
Склисте тіло	140–338
Шкіра	200
Торакальна лімфа	8,5–18
Сеча	0,1–0,5
Сироватка крові	0,01–0,1

Різновиди та функції хондроїтинсульфатів

Хондроїтинсульфат складається з глюкуроніл- β -1,3-N-ацетил-галактозамін-дисахаридів, які зв'язані за допомогою β -1,4-глікозидних зв'язків, при цьому глюкуронова кислота частково перетворюється на L-індуронову кислоту. Молярна маса становить від 10 до 50 кДа.

Хондроїтинсульфати разом із кератан-, дерматан-, гепарансульфатом і гепарином належать до сполук, які мають загальну назву **сульфатовані глікозаміноглікани**. Це ізомери, які відрізняються тільки локалізацією в їхній молекулі сульфатної групи: у ХС-4 вона приєднана до четвертого атома Карбону в молекулі галактозаміна, а ХС-6, відповідно, до шостого атома. Самі ХС-4 і ХС-6 також можуть бути гетерогенні за структурою. Всередині їхніх ланцюгів часто наявні дисахаридні елементи, в яких сульфатної групи або зовсім нема, або вона займає невласливе для цього

ГАГ положення біля другого, четвертого або шостого атомів Карбону; молекула дисахариду може бути гіперсульфатована відразу в двох або трьох положеннях. Типова дисахаридна одиниця хондроїтинсульфата в організмі людини складається з GalNAc і GlcA, обидва з яких можуть бути сульфатмодифікованими. Цей ГАГ полімеризується в довгі ланцюги. Включення сірки в цукор хондроїтинсульфата – дуже складний процес, що включає кілька сульфотрансфераз, як це має місце для інших типів сульфатованих глікозаміногліканів. Багато хондроїтинсульфатних ланцюгів – гібридні структури, які містять більше, ніж один тип дисахаридів. Дерматансульфат є підтипом хондроїтинсульфатів, які містять одну або кілька дисахаридних ланок ідуранової кислоти. Хондроїтинсульфати, а також дерматансульфат, знайдені входять до великого сімейства протеогліканових основних протеїнів, які називаються лектиканами (Howell, 2012; Mikami, 2013).

Як і в більшості всіх ГАГ, повторювана дисахаридна структура формується шляхом послідовного додавання відповідних залишків цукрів до тетрасахаридного лінкеру, який сам генерується шляхом приєднання цукрів до протеогліканів основного протеїна. Перший критичний залишок GalNAc, доданий до тетрасахаридного лінкеру в хондроїтин- і дерматансульфаті включається через дію ферменту, ідентифікованого як хондроїтин-N-ацетил-галактозамін-трансфераза (GalNAcT-I), який кодується геном CSGALNACT1. Наступні кроки включають додавання GlcA з УДФ-GlcA, за якою слідує GalNAc з УДФ-GalNAc із безперервним повторенням GlcA та GalNAc Крім того, утворюється ГАГ-полімер, приєднаний до протеоглікана. Існують ферменти людини, здатні каталізувати ці реакції – хондроїтинсульфатсинтаза 1 та хондроїтинсульфатсинтаза 3, які кодуються генами CHSY1 і CHYS3, відповідно (Mikami & Kitagawa, 2013).

Біохімічна варіабельність будови дає змогу цим глікозаміногліканам мати різну молекулярну масу та щільність заряду на поверхні. Саме ці характеристики визначають численні властивості ХС. Серед них виділяють:

- заміщення у структурі протеогліканів;
- пригнічення синтезу ліпідів;
- пригнічення активності ферментів, що руйнують хрящі;
- пригнічення біосинтезу медіаторів запалення;
- пригнічення біосинтезу компонентів матрикса;
- пригнічення синергічної дії ферментів і кисневих радикалів;
- пригнічення апоптоза;
- побудова колагенових волокон;

- регулювання проліферації хондроцитів;
- поліпшення мікроциркуляції в субхондріальній кістці та синовіальній тканині;
- маскування вторинних антигенних детермінант і пригнічення хемотаксису.

Хондроїтинсульфати за сульфатованістю поділяють на чотири групи (табл. 6).

Таблиця 6

Типологія хондроїтинсульфатів

Тип хондроїтинсульфата	Систематична назва	Детальний опис
Хондроїтинсульфат А	Хондроїтин-4-сульфат	Сульфатна група розміщена переважно на 4 атомі вуглецю N-ацетилхоліна
Хондроїтинсульфат С	Хондроїтин-6-сульфат	Сульфатна група розміщена переважно на 6 атомі вуглецю N-ацетилхоліна
Хондроїтинсульфат D	Хондроїтин-2,6-сульфат, дерматан-сульфат	Сульфатна група розміщена переважно на 2 глюконової кислоти і на 4 атомі вуглецю N-ацетилхоліна (хондроїтин-2,6-сульфат)
Хондроїтинсульфат Е	Хондроїтин-4,6-сульфат	Сульфатна група розміщена переважно на 4 і 6 атомах вуглецю N-ацетилхоліна

Структура та функції дерматансульфатів

Дерматансульфат – це ізомер хондроїтин-4-сульфата, в який замість залишків D-глюкуронової кислоти входять залишки L-ідуронової кислоти, проте абсолютна конфігурація зв'язків залишається тією ж самою. Періодична ланка цього полісахариду відрізняється від повторюваної складової ХС-4 тільки конфігурацією карбоксильної групи при С-5 у кожному другому моносахаридному компоненті. Молярна маса становить від 10 до 50 кДа (Wang, 2016).

Назва цього класу ГАГ походить від місця його основної локалізації – шкіри (дерми). Хоча через присутність GalNAc дерматансульфат можна технічно ідентифікувати як хондроїтинсульфат, присутність ідурунової кислоти змушує виділяти його в окремий клас. Дерматансульфат синтезується з хондроїтинсульфата завдяки епімеризації глюкуронатних (GlcA) залишків до ідурунатів (IdoA). Реакція епімеризації каталізується ферментом, який часто називають уроніл-С5-епімераза (епімерази глюкуронової кислоти). Він кодується геном GLCE. Цілком імовірно, що епімеризація GlcA до IdoA відбувається перед додаванням сульфата до сусідніх залишків GalNAc. Дерматансульфат резистентний до дії гіалуронідаз (тестикулярної та бактеріальної). У цьому полягає ще одна з його відмінностей від хондроїтинсульфатів.

Дерматансульфат широко поширений у тканинах тварин, особливо характерний для шкіри, кровоносних судин і серцевих клапанів. У складі малих протеогліканів (біглікана та декоріна) він міститься у міжклітинній речовині хрящів, міжхребцевих дисків, менісків. Молекулярна маса одного ланцюга дерматансульфата коливається від 15 до 40 кДа. Функційно цей ГАГ залучений до процесів згортання крові та проліферації фібробластів.

Будова та типологія кератансульфатів

Термін «кератан» – це посилання на те, що ця структура ГАГ уперше була ідентифікована в рогівці. Кератансульфат складається із сульфатованого полі-N-ацетиллактозамінового ланцюга [Gal β (1 \rightarrow 4) GlcNAc]. Дисахаридний залишок кератансульфата – галактозил- β -1,4-N-ацетилглюкозамін зв'язаний за допомогою β -1,3-глікозидних зв'язків (Zhang, 2010; Uchimura, 2015). На відміну від інших глікозаміногліканів, до складу дисахаридної одиниці КС не входять уронові кислоти, їх місце займає D-галактоза. Другим компонентом є N-ацетилглюкозамін. Спочатку ці глікозаміноглікани розділили на два класи за місцем виявлення в організмі: клас I (KS I) знаходили в рогівці, клас II (KS II) – у хрящі. Відзначено, що рогівковий кератансульфат відрізняється від хрящового за способом з'єднання з коровим протеїном. Однак пізніше виявилось, що і в рогівці, і в хрящі, і в інших тканинах зустрічаються обидва типи з'єднання. Наразі КС класифікують не за локалізацією, а саме за структурою зв'язку: KS I пов'язаний через азот з аспарагіновим залишком протеїна, KS II – через кисень із сериновим або треоніновим залишком. При аналізі протеогліканов мозку був знайдений третій тип з'єднання: KS III, за даними Krusius et al.,

зв'язується з коровим протеїном через манозу (KS-Man-O-Ser) (Caterson, 2018).

Тип I кератансульфатів знаходиться переважно у зв'язаній із протеїновим кором (кодується геном KERA). Кератансульфати приєднуються до KERA-протеїна через N-аспарагінілглікозидний зв'язок, утворюючи протеоглікан під назвою **кератокан**. У рогівці протеоглікани типу KSI підтримують однакову відстань від колагенових фібрили, завдяки чому фотони світла не розсіюються, проходячи через рогівку. Дефекти в процесингу протеогліканів KSI пов'язані дисфункціями ока, мутації в гені KERA спричиняють розлад відомий як *cornea plana 2*, або пласка рогівка. У пацієнтів з CP2 рогівка не має нормальної опуклої форми, що перешкоджає правильному заломленню світла через кришталік. Неправильне сульфатування кератансульфатів викликає макулярну дистрофію рогівки, а дефекти в формуванні ланцюга цього ГАГ призводить до кератоконуса.

Тип II кератансульфатів (KS II) – кісткова форма кератансульфатів. Він приєднується до корового протеїна за допомогою глікозидного зв'язку із залишком GlcNAc, який прикріплений до протеїна за допомогою O-подібного зв'язування з серином (Ser) або треоніном (Thr). Тип KS II пов'язаний з протеоглікановим коровим протеїном – агреканом, що кодується геном ACAN. Кератансульфати, приєднані до агреканів складаються

з високосульфатованих дисахаридів, де кожен мономерний залишок цукру в дисахариді двічі сульфатовані. Крім того, KS II має часті сіалювані (N-ацетилнейрамінова кислота) залишки галактози в дисахаридному повторі, кінцевий залишок N-ацетил-глюкозаміну кепований нейраміновою кислотою.

Третій варіант зв'язування кератансульфатів із протеїном виявлений у головному мозку. Приєднання KS III до протеогліканів відбувається через глікозидний зв'язок із манозою, яка у свою чергу пов'язана з залишком серину в центральній частині корового протеїна через Оксиген. Додавання GlcNAc залишку до дисахариду KS III продовжується до манози, прикріпленої до агрекану. Ця реакція каталізується ферментом манозилтрансферазою, яка кодується геном POMGNT1. Сульфатація відбувається на декількох залишках галактози у дисахариді за допомогою фермента галактоза-6-сульфотрансферази, який є продуктом експресії гена CHST1 (Hoshino, 2013).

Особливості структури гепариноїдів

Гепарин та гепарансульфати спочатку формуються з дисахаридних одиниць, що складаються з GlcNAc і глюкуронової кислоти (GlcA). Після формування блоку дисахариду вони зазнають значних змін. Гепарин складається з D-глюкуронової кислоти, яка зв'язується за допомогою β -1,4-глікозидних зв'язків чи L-ідуронової кислоти, які приєднуються до глюкозаміна через α -1,4-глікозидні зв'язки. Амінофункцію глюкозаміна бере на себе часто ацетильна чи сульфогрупа (Hemker, 2016).

Біосинтез гепарина і гепарансульфата відбувається по одному і тому ж шляху в апараті Гольджі на поверхні серцевинних протеїнів, у складі яких є специфічна послідовність, дипептид Ser-Gly, за участю специфічних глікозилтрансфераз та сульфотрансфераз. Протягом годин після біосинтезу великі полісахаридні ланцюги (60–100 кД) розщеплюються у тучних клітинах під дією ендо- β -D-глюкуронідаз до фрагментів гепариноїдів (5 – 30 кД). В процесі синтезу можливі різноманітні модифікації (в тому числі, й різні рівні сульфатування), в залежності від активності і субстратної специфічності ферментів, що беруть участь у біосинтезі. На сьогодні ідентифіковані більш ніж 10 різних карбогідрат-модифікуючих ферментів, які приймають участь у біосинтезі гепариноїдів різної структури.

Гепарини сульфатуються інтенсивніше, ніж гепарансульфати. Гепарин синтезується виключно у сполучній тканині, в той час як гепарансульфат продукується практично всіма клітинами організму. Гепарансульфат структурно схожий на гепарин, тільки містить менше N- і O-сульфатних залишків і більше N-ацетилних груп (Tsai, 2017).

Оскільки це сімейство глікозаміногліканів полімеризується, ланцюги цукру проходять ряд модифікаційних реакцій. Вони здійснюються за допомогою епімерази і, щонайменше, чотирьох різновидів сульфотрансфераз. Сульфатування деяких залишків GlcA блокує реакцію епімеризації глюкуроната до ідуроната (IdoA). Як було зазначено, в процесі синтезу до гепарина додається більше атомів Сульфура, ніж до гепарансульфата, а також у гепаринів ступінь епімеризації GlcA до IdoA вищий, порівняно з гепарансульфатом (Weiss, 2017; Tsai, 2017).

Покрокове додавання залишків GlcA і GlcNAc до гепарина та гепарансульфата каталізується одним із двох біфункційних ферментів, ідентифікованих як екзостоцин глікозилтрансфераза 1 і екзостоцин глікозилтрансфераза 2, які кодуються генами EHT1 і EHT2 відповідно. Хоча обидва ферменти EHT1 і EHT2 мають глікозилтрансферазну активність, вони функціонують значно ефективніше, коли пов'язані у гетеромерні

комплекси. Мутації в генах EХТ1 і EХТ2 пов'язані з такими розладами, як екзостози кісткової тканини I і II. Ці порушення характеризуються множинними виступами кістки, що посилюються рельєфом хряща. Ці деформації найчастіше реєструються в метафізах довгих кісток, але виявляють також і в діафізах. Деформація ніг, передпліч (нагадують деформації Маделюнга), кистей – результат мутації принаймні одного з цих генів.

Реакції сульфатування гепаринів і гепарансульфатів відбуваються в кластерах уздовж полімеризованих ланок дисахаридів. Специфічне розташування сульфатованих залишків та епімерів уронової кислоти в гепарині та гепарансульфаті відповідальне за продукування ліганд-зв'язуючих доменів, таких, як фактори росту фібробластів (ФРФ) або антитромбін III (Pomin, 2016).

2.3.2 Взаємодія глікозаміногліканів із молекулами внутрішньоклітинного та позаклітинного матриксу

Зв'язування глікозоаміногліканів з іншими позаклітинними макромолекулами робить значний внесок у структурну організацію сполучнотканинного матриксу. Глікозаміноглікани можуть взаємодіяти з позаклітинними макромолекулами, протеїнами плазми, компонентами клітинної поверхні та внутрішньоклітинними макромолекулами.

Зв'язування глікозаміногліканів має зазвичай електростатичний характер, обумовлений їх вираженою поліаніонною природою, проте деякі реакції зв'язування є більш специфічними. В цілому глікозаміноглікани, що містять IdoA, такі як дерматансульфат і гепарансульфат, пов'язують протеїни з більшою спорідненістю, ніж ті, що містять GlcA .

Всі глікозаміноглікани, за винятком тих, в яких відсутні сульфатні (гіалуронат) або карбоксильні групи (кератансульфат), при нейтральних значеннях електростатично зв'язуються з колагеном. Присутність IdoA сприяє більш міцному зв'язуванню, до того ж, протеоглікани взаємодіють із колагеном сильніше, ніж відповідні глікозаміноглікани. З кожним колагеновим мономером зв'язується від 2 до 5 полісахаридних ланцюгів. Всі розчинні колагени (типи I, II і III) приєднують хондроїтинсульфатні протеоглікани.

Хондроїтинсульфат і гепарансульфат специфічно зв'язуються з еластином (Annovi, 2012). Як зазначалося вище, ХС- і КС-ланцюги у складі відповідних протеогліканів при посередництві зв'язуючих протеїнів

утворюють агрегати з гіалуроновою кислотою. З однією молекулою гіалуроната може зв'язуватися до 100 протеогліканових молекул.

До складу артеріальної стінки входять протеоглікани, що містять гіалуронат, хондроїтинсульфат, дерматансульфат і гепарансульфат. Із них зв'язок з ліпонротейінами плазми утворює дерматансульфат. Крім того, дерматансульфат – головний ГАГ, що синтезується клітинами гладких м'язів артерій. Оскільки саме ці клітини проліферують при атеросклеротичних ураженнях артерій, дерматансульфат може відігравати значну роль в утворенні атеросклеротичних бляшок.

Хоча гепарин синтезується та запасується в тучних клітинах, він завжди тісно пов'язаний із кровоносними судинами. Маючи високий негативний заряд (обумовлений залишками IdoA і сульфата) гепарин інтенсивно взаємодіє з деякими компонентами плазми. Він специфічно зв'язує фактори згортання крові IX і XI. Більш важливою для антикоагулянтної активності гепарина є його здатність взаємодіяти з глікопротеїном плазми, так званим антитромбіном III. Стехіометричне зв'язування з гепарином (1:1) значно підсилює інактивуючу дію антитромбіна III на серинові протеази, зокрема на тромбін. Зв'язування гепарина із залишками Lys антитромбіна III, викликає конформаційні зміни, що сприяють взаємодії останнього з сериновими протеазами (Мишов, 2017). Ці процеси схематично зображено на рис. 15.

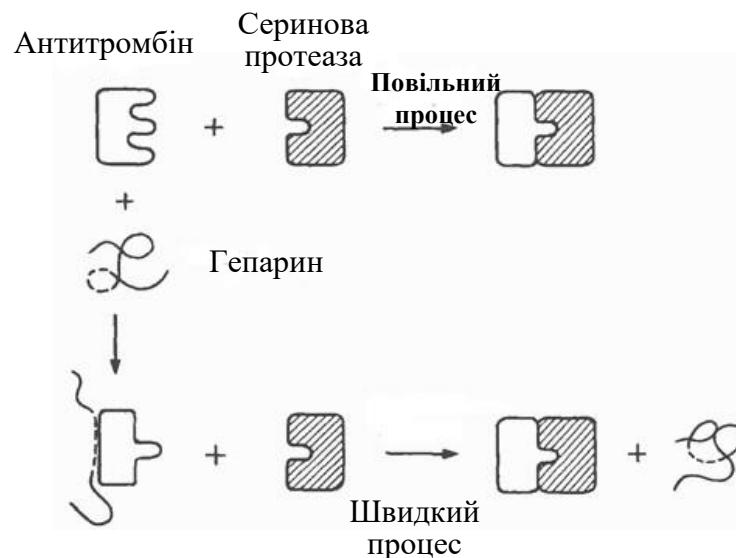


Рис. 15 Схематичне зображення процесу інактивації антитромбіном серинових протеаз (наприклад, тромбіна), що беруть участь у згортанні крові.

Гепарансульфат, схожий за структурою на гепарин, також володіє здатністю прискорювати дію антитромбіна III, але за ефектом значно поступається гепарина.

Гепарин прискорює інактивацію, зв'язуючись з антитромбіном і викликаючи в ньому такі конформаційні зміни, які прискорюють взаємодію антитромбіна з тромбіном. Не виключено також зв'язування гепарина з тромбіном. Взаємодія вимагає присутності специфічного зв'язувального центру в полісахаридному ланцюзі (Wei, 2016).

Гепарин може специфічно зв'язуватися з ліпопротеїнліпазою, присутньою в стінці капілярів, і викликати вивільнення цього фермента в кровообіг. Подібним чином зв'язується з гепарином і надходить у кровообіг печінкова ліпаза, але це зв'язування відбувається з меншою спорідненістю, ніж у випадку з ліпопротеїнліпазою. Частково десульфований гепарин зв'язується з ліпопротеїнліпазою інтенсивніше, ніж з антитромбіном III.

Гепарин має здатність зв'язуватися з багатьма типами клітин, включаючи тромбоцити, клітини ендотелію артерій і печінкові клітини. Хондроїтинсульфат, дерматансульфат і гепарансульфат зв'язуються з різними ділянками клітинної поверхні, наприклад, фібробласти. Саме в цих ділянках глікозаміноглікани та протеоглікани піддаються деградації.

Гіалуронат бере участь у процесах адгезії клітин, що грає дуже важливу роль у рості та розвитку багатоклітинних організмів.

Деякі протеоглікани, ймовірно, служать рецепторами і переносниками макромолекул, в тому числі ліпопротеїнів, ліпаз і антитромбіна. Протеоглікани можуть брати участь у регуляції росту клітин, у міжклітинних взаємодіях і захисту рецепторів клітинної поверхні.

Протеоглікани та їх глікозаміногліканові компоненти, крім взаємодії з ферментами, які беруть участь в їх біосинтезі та деградації, впливають на синтез протеїна та внутрішньоядерні функції. Зокрема, гепарин може діяти на структуру хроматина й активувати ДНК-полімерази *in vitro*. Глікозаміноглікани присутні в значних кількостях у ядрах різних типів клітин. Існують дані, що підтверджують роль гепарансульфата в розвитку ембріонів морського їжака (Fujita, 2010).

Хондроїтинсульфати, дерматансульфати та гепарини можуть активувати або пригнічувати кислі гідролази лізосом. Ці ферменти здатні формувати природні комплекси з глікозаміногліканами з утворенням захищених або неактивних форм.

Численні гранули, які слугують для запасання або секреції продуктів, таких, як хромафінні гранули мозкового шару надниркових залоз, пролактінові секреторні гранули гіпофізу та базофільні гранули тучних клітин, які містять сульфатовані глікозаміноглікани. Глікозаміноглікан-

пептидні комплекси, присутні в цих гранулах, можуть грати роль у вивільненні біогенних амінів (Mulloy, 2016).

Функції глікозаміногліканів у центральній нервовій системі

Біологічні функції протеогліканів (ПГ) у ЦНС залежать як від природи корового протеїна, так і від довжини, кількості і складу ковалентно зв'язаних із ним ГАГ-ланцюгів (рис. 16).

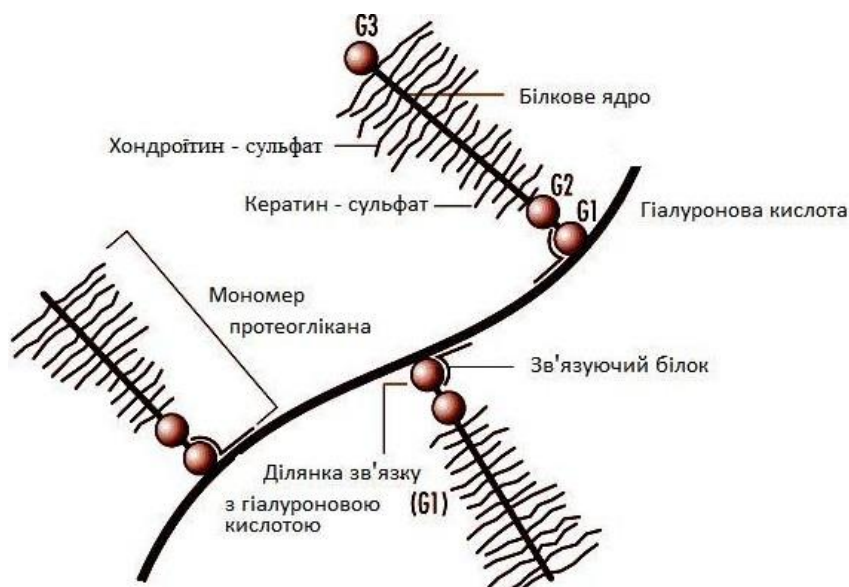


Рис. 16 Структура протеоглікана

Родина протеогліканів складається із широкого спектру високоглікозильованих протеїнів – макромолекул, які в більшості своїй містять сульфатовані глікозаміноглікани. Протеоглікани синтезуються багатьма еукаріотичними клітинами та присутні майже в усіх тканинах ссавців. Різні протеоглікани зустрічаються інколи в різних місцях локалізації визначаючи їх унікальні біологічні властивості. Фізична характеристика та біологічні функції протеогліканів базуються на фізико-хімічній природі глікозаміногліканів та структурі серцевинних протеїнів, які мають багато модифікацій. В останні роки відкрито багато нових протеогліканів, особливо у нервовій тканині. Але досі вони ідентифікуються лише за антигенними та структурними властивостями, їх функції та механізми дії поки що не вивчені. Швидка поява різноманітної інформації про ПГ потребує певної систематизації цих макромолекул. Поки що не має якоїсь затверженої класифікації ПГ, але на підставі існуючої інформації

умовно їх можна поділити на п'ять груп (деякі представники ПГ можна віднести до декількох груп водночас) (табл. 7).

Таблиця 7

Основні групи протеогліканів

Протеоглікани	Представники
Великі екстрацелюлярні	Агрекан, версікан, нейрокан, бревікан, колагени, агрін
Малі, збагачені на лейцин	Декорін, біглікан, фібромодулін, люмікан, епіфікан/ПГ Lb
Асоційовані з клітиною	Сергліцин, сіндекани, бетаглікан, гліпікани, родина CD44, тромбомодулін.
Базальної мембрани	Перлекан, малі гепарансульфат-протеоглікани, бамакан
Нервової тканини	Нейрокан, бревікан, версікан, фосфакан, агрін, NG2, декорін, бетаглікан, сіндекани, рецептор-подібний протеїн тирозин фосфатази, САТ-301, перлекан, клаустрін, інші.

Біосинтез протеогліканів залежить від біосинтезу серцевинного протеїна та глікозаміногліканів. Специфічні мРНК, що несуть копію інформації з ДНК про структуру серцевинних протеїнів, залучаються полісомами, після чого синтезовані поліпептиди транспортуються через ендоплазматичний ретикулум до апарату Гольджі, в якому відбувається біосинтез глікозаміногліканів на поверхні серцевинного протеїна та їх сульфатація.

Для встановлення ідентичності різновидів глікозаміногліканів у ЦНС, вони були екстраговані з кори головного мозку, мозочка і стовбура мозку молодих овець і деградовані різними глікозидазами (Margolis, 1975). Сприйнятливість виділених ГАГ до хондроїтинази АС або ChABC виявила незначну популяцію дерматансульфатів, яка підтверджує висновок про те, що хондроїтинсульфат-протеоглікани (ХСПГ) є найбільш поширеними ПГ у ЦНС. Крім того, глікозаміноглікани також сприйнятливі до кератиназ і гепариназ, що вказує на присутність ХС і гепарансульфата/гепарина в головному мозку.

ГАГ приєднуються до певних протеїнів ЦНС; найбільш важливими з яких є представники сімейства лектиканів (агрекан, версікан, бревікан і нейрокан) (Yamaguchi, 2000; Howell, 2012). Ця родина корових протеїнів,

які характеризуються наявністю зв'язувального домену для гіалуронана на одному кінці і домена G3, який здатний зв'язуватися з тенасцином, – на іншому. Незважаючи на схожість функційних доменів у протеїнових послідовностях, лектикани відрізняються числом бічних ланцюгів ГАГ, прикріплених до корового протеїна, а динамічна регуляція цих бічних ланцюгів визначає різні функції ПГ у центральній нервовій системі за її фізіологічного та патологічного станом. Агрекан синтезується в основному нейронами, версікан – нейронами й олігодендроцитами, бревікан зустрічається, головним чином, у нейронах, нейрокани експресуються в астроцитах і нейронах. Вони мають кілька важливих функцій при нормі та патології в ЦНС.

У нервовій тканині ссавців були знайдені майже всі представники великих гіалуронат-зв'язуючих протеогліканів (гіалолектанів, гіалоадгеринів), за винятком агрекана. Доменна структура даних ПГ має високий ступень гомології (50-60%).

Нейрокан (1D1 протеоглікан) – один із представників родини цих протеогліканів, що продукується нейронами і зв'язується специфічно із гіалуронатом. Це хондроїтинсульфат-протеоглікан, котрий був виділений вперше з мозку щурів. Зараз цей ПГ вже клонований і його первинна структура визначена. Серцевинний протеїн складають 1257 амінокислотних залишків (136 кДа). У дорослих серцевинний протеїн редукований до 68 кДа. Як й інші представники родини хондроїтинсульфат гіалолектанів (агрекан, версікан, бревікан), він має подвійну петлю для зв'язування гіалуроната та ЕФР-подібний і лектин-подібний домени на С-кінці, які зумовлюють увесь комплекс біологічних властивостей (Su, 2011).

Середній домен (595 амінокислотних залишків) не має гомології ні з якими протеїнами. Нейрокан зв'язується із різним глікопротеїнами мозку НМКА (нейрональною молекулою клітинної адгезії), Ng-CAM, тенасцином, гальмує адгезію та ріст нейритів. В останні роки нейрокан також був ідентифікований в ретині, що розвивається. Повна картина функційних здібностей цього протеїна ще не визначена.

Бревікан – недавно відкритий представник гіалолектанів. Його первинна структура була визначена Ямада у 1994 році, він має десь на 60 % гомологію до структури гіалолектанів та має найкоротшу ланку для зв'язування гіалуроната (чому і був названий від латинського слова *brevis* – короткий). Середній домен також найкоротший та відрізняється від інших протеогліканів. Цей протеоглікан відноситься до так званих тимчасових протеогліканів (тобто таких, що тільки певний час перебувають у формі ПГ, а решту часу – у дисоційованій формі). З мозку щурів виділені дві форми

бrevікана: розчинна та приєднана до мембрани через фосфатидил інозитол (145 та 80 кДа відповідно). Вважають, що бревікан найбільш представлений у мозку дорослих ссавців, крім того кількість розчинної форми бревікана збільшується на пізніх етапах розвитку. Функції цього ПГ, як і нейрокана, не вивчені (Frischknecht, 2012).

Версікан був вперше виділений із культуральної середи фібробластів легень людини ($M > 1000$ кДа). Серцевинний протеїн складає десь 400 кДа, його первинна структура визначена у 1989 році. Версікан продукується багатьма клітинами – кератоцитами, клітинами гладких м'язів, клітинами ендотелію судин, клітинами мозку. Він має характерну для гіалолектанів послідовність доменів. На своєму N-кінці версікан має дуже схожі домени до трьох петельної структури зв'язуючого протеїна хрящу, до G1 та G2 доменів агрекана, до гіалуронат-зв'язуючого рецептора CD44. Зараз вважається, що GHAР (гліальний гіалуронат-зв'язувальний протеїн), що має ідентичну послідовність до частини версікана, є продуктом часткового протеолізу версікана. Функції його також тільки вивчаються, але вже встановлені факти участі цього протеоглікана в регуляції проліферації клітин, клітинної адгезії та локомоції, встановлений зв'язок із селектинами, в регуляції поведінки клітин в мозку дорослих ссавців (Zhang, 2012).

Ще один представник гіалолектанів – агреман, що ідентифікований поки тільки у сполучній тканині.

Схожий за структурою великих екстрацелюлярних гіалолектанів був описаний ще один хондроїтинсульфат-протеоглікан – **САТ-301 антиген** (680 кДа). Він знайдений у мозку в міжклітинному просторі навколо синаптичних терміналей. Експресія САТ-301 найбільша у ранній постнатальний період. Вважається, що він також є одним із активних учасників в регуляції синаптичної пластичності. Експресія даного ПГ, як і формування нейронів, потребують активності глутаматних рецепторів. На відміну від версікана, що виявляється в гліальних клітинах, САТ-301 виявляється тільки в синаптичних терміналях нейронів (Zaremba, 1989).

Фосфакан – (3F8 чи 6B4) хондроїтинсульфат протеоглікан, який зв'язується із нейронами, в більшості випадків, вважається через адгезивні молекули нервових клітин НМКА та Ng-CAM. Фосфакан, як і нейрокан, є високоафінним лігандом до екстрацелюлярного протеїна тенасцина-С. Даний протеоглікан специфічний до нервової тканини (можливо в інших тканинах він ще не визначений). На відміну від нейрокана, фосфакан синтезується астроцитами, і є сплайсинговим продуктом, представленим екстрацелюлярним доменом типу протеїн-тирозин фосфатази, що також зустрічається у мозку як хондроїтинсульфат-протеоглікан. Тирозин

фосфатазна активність даного протеоглікана забезпечує регуляцію фосфорилування протеїнів та забезпечує передачу сигналів між клітинами нервової тканини поряд із тирозин киназною системою. Фосфакан складає десь 400 кДа, що містить чотири ланцюга хондроїтинсульфата (по 28 кДа). Кератансульфат даного протеоглікана має унікальний зв'язуючий регіон, що приєднується до серцевинного протеїна через манозу. Встановлено що фосфакан і нейрокан мають 3-сульфатовані HNK-1 карбогідратні епітопи, що часто зустрічаються у адгезивних молекулах в нервовій тканині (Caterson, 2018).

За допомогою радіоактивного йоду встановлено що, найвищий рівень зв'язування (60-80 % вихідної радіоактивності) з нейроканом та фосфоканом можна побачити у амфотеріна та HB-GAM. Але мало не вся ця активність (більше 80 %) знищується внаслідок хондроїтиназної обробки (McKeon, 1999). Завдяки відщепленню глікозаміногліканових ланцюгів від специфічних протеїнів-рецепторів, реалізується медіаторна функція хондроїтинсульфата.

Скринінг бібліотеки ДНК мозку бика з поліклональними антитілами проти протеогліканів мозку виявив клон ДНК, послідовність якої гомологічна до **рецептор-подібного протеїна тирозин фосфатази β** . Це трансмембранний протеоглікан, але він має велику ступень гомології із розчинним міжклітинним ПГ фосфаканом. Можливо ці протеоглікани є результатом альтернативного сплайсингу одного транскрипта. Однак детальна інформація поки що відсутня, як і не визначений механізм фосфатазної активності цих протеогліканів.

Агрін також відносять до групи великих міжклітинних протеогліканів. Молекулярна вага його складає десь 500 кДа. В своєму складі він має гепарансульфат. Агрін відіграє ключову роль в агрегації ацетилхолінових рецепторів під час розвитку нервово-м'язових контактів в період ембріогенезу. Клонування синапсів гепарансульфат протеоглікана дало ідентичну послідовність агріна. Агрін зв'язується із нервово-м'язовою базальною мембраною через протеїн міжклітинного матриксу ламінін (Jayakumar, 2016). Взаємодія аксонів та міоцитів із міжклітинним матриксом є важливим фактором формування нейромускулярних синапсів. Після денервації синаптична базальна ламіна містить всю необхідну інформацію, що потребується для регенерації нейромускулярних синапсів, включаючи кластеризацію ацетилхолінових рецепторів. Вважається, що найбільш активна форма агріна зустрічається тільки в нервовій тканині, при цьому встановлено, що багато типів нейронів продукують агрін, котрий відіграє

важливу роль під час синаптогенезу в ЦНС. Зараз вже встановлено декілька типів агріна, які не зустрічаються в клітиннах нервової тканини.

Агрін складається з чотирьох доменів. Місця приєднання гепарансульфатів знаходяться в домені-3, в цьому домені виявлений і SEA-модуль, який виявлений тільки в глікопротеїнах і протеогліканах. Передбачають, що він здійснює контроль за глікозилуванням. N-кінцевий домен I агріна може зв'язувати ламінін-1. Домен II, що містить фолістатин-подібні і ЕФР-подібні повтори, може або зв'язувати деякі чинники росту, захищаючи їх від дії протеаз, або функціонувати напряду як інгібітор протеазної активності. С-кінцевий домен агріна дуже схожий за структурою такого у перлекана. Можливо, що цей домен відповідальний за олігомерізацію, як і у випадку з перлеканом. Будучи гепарансульфат протеогліканом, агрін може брати участь у вуглевод-протеїнових взаємодіях з гепарином (можливо, і з гепарансульфатами клітинної поверхні). Показано, що вставка 4-19 амінокислот в С-кінцевому домені IV агріна (один із варіантів альтернативного сплайсингу) відповідальна за скріплення з гепарином і клітинною поверхнею. В експериментах з культурою кортикальних нейронів було показано, що агрін індукує експресію гена *c-fos*. Є непрямі докази того, що нейрони ЦНС експресують унікальний агріновий рецептор. Передача сигналу через цей рецептор пов'язана з внутрішньоклітинним збільшенням концентрації іонів Кальцію. Можливо, що даний сигнальний шлях є важливий для адаптивних змін генної експресії, що пов'язані з синаптичними перебудовами.

Серед протеогліканів, що зв'язані з клітинною поверхнею, у нервовій тканині виявлені N-сіндекан, гліпікани, NG2-протеоглікан та бетаглікан.

Сімейство **сіндеканів** складається з чотирьох протеїнів (20-35 кДа): сіндекан-1, сіндекан-2 (фіброглікан), сіндекан-3 (N-сіндекан) і сіндекан-4 (рюдокан, амфіглікан). Всі сіндекани є трансмембранними протеїнами типу I, з N-кінцевим сигнальним пептидом, ектодоменом, який містить декілька характерних послідовностей для приєднання глікозаміноглікана, поодинокий гідрофобний трансмембранний домен і коротким С-кінцевий цитоплазматичний домен. Амінокислотні послідовності ектодоменів сіндеканів найменш консервативні, як у різних типів сіндеканів, так і всередині одного типу в різних видів тварин. Трансмембранний і цитоплазматичний домени, навпаки, високо консервативні. Сіндекани-1, 3 і 2, 4 можуть бути об'єднані в підродини, на основі порівняння послідовностей всередині цих областей. У сіндекана-1 і 3 місця прикріплення глікозаміноглікана зустрічаються в двох різних кластерах, в одному – біля N-кінця і в другому – біля місця зіткнення з мембраною,

розділеному за допомогою «спейсера», що багатий на пролін та треонін. Останній домен найбільш важливий в N-сіндекані. Він має схожу послідовність з муцино-подібними протеїнами. Аналіз експресії мРНК сіндеканів у тканинах дорослих мишів, показує, що мозок містить мРНК сіндекана-3. У ЦНС гризунів високого рівня експресії сіндекана-3 спостерігається у ранній постнатальний період. Кількість сіндекана-3 зростає до моменту народження, досягає піку на 7-му постнатальну добу і потім спадає до низького рівня у дорослих тварин. Припускається, що сіндекани забезпечують міжклітинні взаємодії завдяки тому, що ці трансмембранні протеїни можуть водночас підтримувати контакт із різними компонентами як поза клітинною (адгезивними протеїнами, факторами росту), так і з внутрішньої сторони (зв'язуватися із цитоскелетом через актин) (Gopal, 2017).

Гліпікани – це родина гепарансульфат протеогліканів (60-64 кДа), що ковалентне пришиті С-кінцевим гідрофобним доменом до мембрани клітини за допомогою глікозилфосфатидилінозиту. На відміну від сіндеканів, гліпікани не мають внутрішньоклітинного домену. Гліпікановий серцевинний протеїн містить 6 незмінних дисульфідних містків, ймовірно, в N-кінцевій частині він має глобулярну структуру. Місця прикріплення гепарансульфатних ланцюгів лежать поблизу від плазматичної мембрани. Гліпікани можуть відщеплюватися з поверхні мембрани під дією фосфоліпази С та транспортуватися до клітини, де в ендосомах відбувається від'єднання гепарансульфата та його транспорт до ядра. Показано, що в ядрі гепарансульфат може запобігати переходу клітини із G1 до S-фази (Filmus, 2008).

У мозку ссавців виявлені два представники сімейства гліпіканів: гліпікан-1 і гліпікан-2 (цереброглікан). Особливо багато мРНК гліпікана-1 в гранулярних клітинах мозочка, великих мотонейронах стовбура мозку і СА3 пірамідальних клітинах гіпокампа. Ці дані, поряд з імуногістохімічними даними, показують, що гліпікан-1 є нейрональним продуктом у пізніх ембріональному і постнатальному періодах у нервовій системі щурів. У головному мозку щурів не виявлено помітної імунореактивності або мРНК гліпікана до 19 ембріональної доби. В нервових клітинах гліпікан виявляється не тільки на мембрані, але і в ядрі. Можливо, це означає, що він може брати безпосередню участь в процесах регуляції геному, що припускалося раніше. Амінокислотна послідовність цереброглікана на 37% ідентична послідовності гліпікана-1. Результати Нозерн блота та *in situ* гібридизації показують, що цереброглікан, експресується тільки в

ембріональний і ранній постнатальний періоди. У дорослому мозку він зникає по закінченню процесів клітинної міграції і зростання нейритів.

NG2 – це хондроїтинсульфат протеоглікан, що також асоційований із мембраною клітини. Спочатку вважалось, що він специфічний тільки для олігодендроцитів, але пізніше він був виявлений в мезенхімі, що розвивається, та в клітинах меланоми людини. Можна сказати, що NG2 має найбільший серцевинний протеїн серед визначених протеогліканів, його послідовність вже встановлена і складає 2325 амінокислотних залишків (252 кДа). В екстрацелюлярній частині NG2 має два сайти зв'язування до хондроїтинсульфата. Крім того, він має повтори із 200 амінокислотних залишків, що гомологічні до Ca-зв'язуючої частки кадгеринів. Припускається, що NG2 може виступати в ролі корецептора до факторів росту. Експресія NG2 найбільша під час розвитку тканини та співпадає з експресією колагена VI. Можливо, саме за рахунок зв'язування із колагеном відбувається регуляція взаємодії між клітиною та міжклітинним матриксом. Хоча це питання ще дискутується, оскільки колаген VI не визначається в мозку, що розвивається, але саме в цей час експресія NG2 є найвища. Припускається, що цей протеоглікан як продукт олігодендроцитів відіграє роль у процесах адгезії і міграції клітин у нормі та при трансформації клітин (Yadavilli, 2016).

Бетаглікан є рецептором трансформуючого фактору росту TGF- β III типу. Його структуру складають серцевинний протеїн із 853 амінокислотних залишків, 41-43 з них є внутрішньоклітинні, та гепаран і хондроїтинсульфатні ланцюги. У внутрішньоклітинному домені є декілька залишків серина та треоніна, які можливо фосфорилуються за участю протеїнкінази С. Позаклітинний домен має два потенційних місця зв'язування глікозаміногліканів. Поки що не встановлено будь-якої гомології в структурі бетаглікана з іншими протеогліканами. Встановлено, що бетаглікан зв'язує TGF- β коровою частиною, без участі ГАГ, призводячи до активації кіназної системи. Однак показано, що гепарансульфатні ланцюги бетаглікана можуть зв'язуватися із bFGF, діючи як резервний варіант сигнальної системи, чи як фактор, що презентує фактори росту до рецепторів з високою афінністю. Крім того, для дії бетаглікана велике значення має композиція вуглеводного компоненту (Bilandzic, 2011).

Схожу здатність до взаємодії з TGF- β має малий протеоглікан, що збагачений на лейцин, **декорін**, який має серцевинний протеїн 70 кДа та один ланцюг дерматансульфата на N-кінці. Найбільш детально характеризується декорін, що виділений зі сполучної тканини. Пізніше цей протеоглікан був також виявлений у нейрофібрилярних клубках при хворобі

Альцгеймера. Припускається, що він приймає участь у формуванні бляшки та ненормальному рості нервових клітин (Gubbiotti, 2015).

Перлекан є гепарансульфатним протеогліканом базальної мембрани. Свою назву він отримав за перлиноподібну структуру. Його серцевинний протеїн (десь 400 кДа) складається з 5 доменів. В його структуру входить безліч глобулярних областей, сполучених вудило подібними сегментами. II і IV домени містять Ig-повтори, гомологічні N-CAM (neural cell adhesion molecule), передбачають, що домен IV (14-21 Ig-повтори у різних видів) може брати участь в олігомеризації. Домен III містить область гомологічну короткому плечу ламаніна-1 і трипептид RGD (у мишей, але не у людини). Тому, можливо, мишачий перлекан може зв'язуватися з фібронектином і інтегринами. Послідовність домена V містить області, що гомологічні G-домени ламаніна-1. Цей домен відповідальний за олігомеризацію перлекана і може мати велике значення для формування базальної мембрани *in vivo*. Три можливих сайти приєднання гепарансульфатних ланцюгів (40-60 кДа) і SEA-модуль присутні в N-кінцевому домені I. Вже встановлені послідовності перлекана людини та миші, які вказують на високу ступень гомології. Існує безліч продуктів гена перлекана, які відрізняються розмірами і посттрансляційними модифікаціями. Можливо, в результаті альтернативного сплайсингу перлекан втрачає сайти приєднання гепарансульфатних ланцюгів в домені I. Таким чином, перлекан не є «постійним» протеогліканом на відміну від сіндекана і гліпікана. Функції перлекана ще вивчаються. На основі даних про особливість структури даного протеоглікана припускається важлива його роль у взаємодіях з ламініном, фібронектином, нейрональними адгезивними молекулами (Yamashita, 2018).

З базальної мембрани були ізольовані ще **малі гепарансульфат протеоглікани**. Досі не встановлена їх послідовність. Можливо, це є деривати перлекана. Окрім гомологічних ланок до перлекана вони мають специфічні, які не були ідентифіковані раніше. Також вони містять більшу кількість гепарансульфатних ланцюгів, ніж перлекан.

В останні роки встановлений ще один протеоглікан базальної мембрани – **бамакан**. Це хондроїтинсульфат протеоглікан вперше ізольований та клонований з пухлини Енгельбреч-Холм-Шварм. Серцевинний протеїн його (138 кДа) має молекулярну архітектуру відмінну від раніше відомих молекул міжклітинного матриксу: голова та хвіст мають глобулярну структуру, тоді як центральна частина формуються спіральними структурами, де знаходяться місця зв'язування для N-олігосахаридів (1-3) та трьох ланцюгів хондроїтинсульфата. Нещодавно клонована ДНК до

бамакана миші та щура. Гіперпродукція бамакана призводить до трансформації фіброblastів.

Клаустрин – кератансульфат протеоглікан ізольований з нервової тканини ембріона курча. Експресія цього протеоглікана виявляється під час розвитку нервової системи і не визначається в дорослому мозку. Взаємодія клаустрина з ламініном знижує прикріплення клітин та ріст нейритів, тоді як обробка кератиназою призводить до поновлення адгезії та росту нейритів.

У порівнянні з кількістю відомостей про добре вивчений у ЦНС хондроїтинсульфат, інформація про роль ГС не так деталізована. Основними ГСПГ у ЦНС є: агрін, присутній у синаптичній базальній пластинці; сіндекан 2, сильно виражений у дендритних шипиках і синапсах; сіндекан 3, що експресується уздовж аксонів; перлекан, відповідальний за підтримку гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ); і гліпикан, присутній у синапсах, які грають роль у розвитку пухлин і демієлінізуючих захворюваннях (Filmus, 2008; Gopal, 2017; Yamashita, 2018). На відміну від інших глікозаміногліканів, гіалуронова кислота не присутня в тканинах, ковалентно пов'язаних із протеїнами, утворюючи замість цього різні типи комплексів з протеїнами у позаклітинному матриксі (ПКМ), включаючи асоціацію з важкими ланцюгами, перенесеними від інтер- α -інгібітору в ділянках запалення. Гіалуронан також утворює високостабільні потрійні комплекси на поверхні нейронів, так звані перінейрональні мережі. Отримані комплекси ГК мають критичне значення для стабілізації міжклітинного матриксу в центральній нервовій системі.

Протеоглікани і ланцюги ГАГ залучені до великої кількості біологічних процесів під час розвитку ембріона. В цілому, гепарансульфат протеоглікани опосередковують дії чинників росту та морфогенів, локалізуючи їх у певних ділянках, щоб приєднати специфічні молекули до їх рецепторів. З іншого боку, ХСПГ часто є бар'єрними молекулами, які можуть, наприклад, грати роль у зростанні, адже є приклади певної ролі у зв'язуванні фактору росту. Неоднорідність ГАГ регулюється відповідно до типу клітин, клітинним циклом і контактом, що дозволяє взаємодіяти з різними протеїнами й ефекторами клітинної поверхні. Їх структурна різноманітність точно регулюється та дозволяє вибірково взаємодіяти з цими протеїнами в залежності від часу і просторово регульованого режиму. Сульфатовані глікозаміноглікани, що утворюються при синтезі в апараті Гольджі багатьма сульфотрансферазами, визначають зв'язування ГАГ і визначають гетерогенність структури/функції ПГ у нервовій системі. Динамічне розташування сульфатованих залишків призводить до утворення

зв'язуючих доменів для специфічних лігандів, що дозволяє розпізнавати певні фактори росту. Взаємодія гепарансульфата з факторами росту захищає їх від деградації, створює пул зберігання, діє як ко-рецептор, тим самим полегшуючи збірку сигнальних комплексів і регулюючи дифузію фактора росту в тканині.

Генетичні дослідження з використанням мутантів *Drosophila melanogaster* для біосинтетичного ГС-апарату і ГСПГ продемонстрували специфічні функції гепарансульфата в передачі сигналів цих молекул у процесі розвитку (Nakato, 2016). Ці дослідження показали, що сіндекани опосередковують керівництво аксоном Slit-Robo у середній лінії ЦНС у взаємодії з ГС (Kamimura, 2017). *D. melanogaster perlecan homologue* демонструє зниження передачі сигналу FGF і зупинку клітинного циклу нейробластів у личинковому мозку, тим самим вказуючи, що гепарансульфат протеоглікани регулюють проліферацію нейтральних стовбурових клітин. Генетичний аналіз із використанням *C. elegans*, у якому відсутні біосинтетичні ферменти ГС, а також серцевинні протеїни ГСПГ, продемонстрував, що молекулярна різноманітність ГС протеогліканів має велике значення для розвитку соматичних нейронів і аксонів (Díaz-Balzac, 2014). У мишей інформація про гепаранзв'язувальні протеїни міститься в генах *Ext1* і *Ext2*, які експресуються у всій нервовій трубці, починаючи з раннього ембріонального періоду. У мишей при *Ext*-knockout ембріональні стовбурові клітини не можуть диференціюватися, що свідчить про порушення деградації FGF і мезодермального диференціювання (Zak, 2011). Гепарансульфат синтезується у сітківці ока під час розвитку; він також необхідний для проєкції аксона гангліозних клітин сітківки на головку зорового нерву. Дослідження продемонстрували, що втрата ГС-ланцюгів призводить до аберантного розподілу морфогенів, порушуючи тим самим еволюційні ознаки, та наявність гальмівної сигналізації, що призводить до порушень розвитку.

Гіалуронова кислота відіграє важливу структурну роль у формуванні позаклітинного матриксу в мозку (Kogan, 2007). ГК утримується на поверхні клітини різними механізмами: зв'язуючись зі специфічними рецепторами (такими як трансмембранний CD44), взаємодіючи з ГК-зв'язувальними протеїнами (такими як версікан) і прикріплений за допомогою синтетичних ферментів HAS, при синтезі. Показано, що ГК специфічно взаємодіє з різними факторами зростання і цитокінами у ПКМ, включаючи TGF- β , інтерлейкін-1 β (IL-1), фактор некрозу пухлин альфа (TNF), епідермальний фактор росту (EGF), фактор росту кератиноцитів і багато інших чинників (Iio et al., 2016). У ЦНС, що розвивається, гіалуронан утворюється клітинами

нервової трубки і хорди. В ембріонах мишей E11 ГК головним чином присутня у вентральній нервовій трубці та навколо сомітів, що вистилають нервову трубку. Встановлено, що розщеплення гіалуронової кислоти за допомогою гіалуронідази запобігає міграції клітин нервового гребеня з мезенцефальних нервових складок і порушує епідермально-мезенхімальний перехід у ембріонів. Наявність ГК також добре вивчено в мозочку як у мишей, так і у щурів. Використовуючи світлову або електронну мікроскопію, гіалуронан спостерігали, головним чином, у позаклітинному просторі раннього постнатального мозочка щура. З використанням зонда (біотинілірування ГК-зв'язувального протеїна) показано, що ГК присутня у великій кількості в білій речовині 2-тижневого мозку щура. Нокаут HAS3 в ЦНС значно зменшував об'єм позаклітинного простору мозку і був пов'язаний зі змінами активності нейронів і судочками.

Ключова роль позаклітинного матриксу в подіях нейрональної пластичності була одним із відкриттів останніх років у нейробиології. Зв'язок між хондроїтинсульфат протеогліканами та пластичністю доводився за допомогою експериментів, у яких хондроїтиназу вводили в ушкоджений спинний мозок (СМ). При цьому спостерігалось швидке функційне відновлення, завдяки відновленню пластичності та помірній стимуляції регенерації аксона через гліальний рубець. Показано, що пригнічення хондроїтинази відновлює пластичність сенсорного шляху та зменшує пошкодження в моделях інсульту і травми головного мозку. Останнім часом показано, що лікування з ХСПГ допомагає продовжувати та відновлювати пам'ять у двох моделях хвороби Альцгеймера (AD). Цікаво, що зниження концентрації кератинази також сприяє появі пластичності в пошкодженому спинному мозку. У ЦНС ссавців існує постнатальний критичний період, протягом якого пластичність знаходиться на високому рівні, який через деякий час значно знижується. Цей процес обернено корелює з утворенням перинейрональних мереж (ПНМ). Зменшення щільності ПНМ пов'язують з розвитком шизофренії.

Гіалуронова кислота і хондроїтинсульфат протеоглікани є основними молекулярними компонентами ПНМ. ХСПГ також беруть участь в ініціюванні та підтримці міжнейронних зв'язків шляхом зв'язування дифундуючого фактору транскрипції/гомеобоксних протеїна OTX2 і приєднання його до інгібуючих інтернейронів. ПНМ мають структуру, дуже схожу на молекулярну організацію хряща, причому ГК-полімери працюють як основа, утримуючи (головним чином, агрекан), сполучні протеїни і тенасцин-R у щільній агрегованій структурі перичелюлярної матриці. ПНМ

прив'язані до поверхні нейронів за допомогою асоціації ГК з ферментом клітинної поверхні – HAS.

Потенційна роль гепарансульфат протеоглікана в пластичності до теперішнього часу не була добре вивчена, хоча відомо, що ГСПГ присутні в ПНМ. Показано, що глікопротеїни грають життєво важливу роль в стабілізації, утворення адгезійних комплексів і в роботі синапсів. Агрін є ГСПГ, який бере участь в утворенні нервово-м'язових синапсів і, взаємодіючи з рецептором Lrp4, бере участь в утворенні збуджуючих синапсів. Lrp4 експресується в гіпокампі й інших областях мозку, що беруть участь у пізнанні. Миші Lrp4^{-/-} не здатні утворювати нервово-м'язові синапси й вмирають. Відновлення експресії Lrp4 підвищує виживання, проте миші мають низьку щільність первинних апікальних дендритів, за рахунок чого розвивається дефіцит когнітивних функцій, включаючи навчання та пам'ять (Pohlkamp, 2014). Більш того, нещодавно показано, що мутації агріна призводять до рідкісного стану, так званого вродженого міастенічного синдрому, що є результатом порушення нервово-м'язової передачі з дистальною м'язовою слабкістю й атрофією. Гліпікан-4 і 6 взаємодіють із глутаматними рецепторами, а тварини, позбавлені гліпікана-4, мають менше рецепторів AMPA в гіпокампальних синапсах.

Усунення ГС у нейронах шляхом нокауту EHT1 призводить до ослаблення збудливою синаптичної передачі, імовірно через зниження рівня синаптично локалізованих глутаматних рецепторів типу AMPA. Недавні дослідження показали, що молекула постсинаптичної адгезії LRRTM4, що бере участь в утворенні збуджуючих синапсів, взаємодіє з пресинаптичними гепарансульфат протеогліканами. ГСПГ можуть діяти спільно з полісіальованною формою нейрональної молекули клітинної адгезії. Показано також, що ГСПГ, такі як гліпікан і сіндикани, сприяють розвитку збудливого синапсу. Дослідження показали, що астроцити секретують гліпікан 4 і 6, що сприяє утворенню функційних синапсів між нейронами гангліозних клітин сітківки, а їх виснаження знижує постсинаптичну активність (Allen, 2012). У моделі травми інфузія гліпіканів після хронічного інсульту зменшує експресію ГФКП і збільшує MAP-2, що призводить до поліпшення поведінки в експериментальній моделі на щурах. Крім того, змінений профіль експресії ГАГ також корелює з поведінковими розладами. У зв'язку з цим DSEL (DS-epi2) генетично пов'язаний з маніакально-депресивними розладами та біполярним розладом людини II типу. Крім того, нейрокан також пов'язують із біполярними розладами.

Роль протеогліканів у пошкодженій ЦНС і в регенерації аксонів

Синтез кількох ХСПГ значно залежить від утворення гліальних шрамів після пошкодження ЦНС, які перешкоджають регенерації аксонів. Саме хондроїтинсульфат протеоглікани утворюють бар'єр у рубцевій тканині. Кілька недавніх статей були присвячені передбачуваній ролі ХСПГ у блокуванні регенерації аксонів у ЦНС. Добре обґрунтованою експериментальною стратегією для посилення регенерації аксонів є використання ChABC, який також сприяє пластичності в пошкодженій.

Експериментальна модель із делецією фермента N-ацетил-галактозамінтрансферази-1, продемонструвала підвищення регенерації та відновлення після ушкодження спинного мозку. Хоча дослідження показали функційне відновлення після введення ChABC, завдяки активації регенерації та пластичності аксона, механізм, за допомогою якого ХС протеоглікани інгібують подовження аксонів і як ChABC сприяє регенерації, до кінця не зрозумілий. Після травми відбувається загальне збільшення синтезу хондроїтинсульфата на місці пошкодження зі збільшеною продукцією 4- і 6-сульфатованих гліканів. 4-сульфатовані форми особливо сильно гальмують зростання аксонів. Обробка ChABC у моделях ушкоджень СМ спричинила значне збільшення кількості попередників олігодендроцитів, таким чином підтверджуючи можливу роль ChABC у подіях ремієлінізації, які могли б сприяти відновленню після ушкодження центральної нервової системи.

Існують суперечливі погляди на роль гіалуронової кислоти в нервовій системі після травми. Було встановлено, що функція ГК залежить від її молекулярної маси; у той час як високомолекулярна (ВМ) гіалуронова кислота має протизапальні властивості, низькомолекулярна ГК (НМГК) може бути прозапальним агентом (Petrey, 2014). Під час запалення НМГК зв'язується з поверхневим клітинним рецептором CD44, який потім запускає експресію генів, пов'язаних із хемокінами та цитокінами. НМГК також активує фактори некрозу пухлини. Показано, що ГК пригнічує регенерацію аксонів у ЦНС, і ефект головним чином обумовлений НМГК (10-500 кДа). Було показано, що видалення гіалуронана з використанням гіалуронідази може частково викликати анатомічну регенерацію в пошкодженому спинному мозку. Однак спостережуваний результат може бути зумовлений деградацією ВМГК або утворенням НМГК, так і ди- або олігосахаридних продуктів гіалуронової кислоти. Крім того, недавні дослідження показали, що тетрасахариди ГК (ГК4) сприяють зростанню нейронів *in vitro*. Наприклад, занурення розрізаного малогомілкового нерву

в ГК4 призводило до посилення термінального проростання, яке зазвичай є ознакою пластичності. ГК4 додатково досліджували в СМ *in vivo*. Лікування тетрасахаридом сприяє функційному відновленню, і у піддослідних тварин було виявлена набагато більша кількість волокон, що може сприяти регенерації та проростанню аксонів. Вважається, що цей ефект ГК4 у ЦНС опосередковується за допомогою нейропротекції, знижуючи ексайтотоксичність НМДА (Liang, 2016).

Функції глікозаміногліканів і протеогліканів при нейродегенеративних процесах

Більшість із хронічних нейродегенеративних станів, які впливають на центральну нервову систему, призводять до втрати нейронів і, як правило, супроводжуються хронічними запальними змінами і в деяких випадках відкладенням агрегованих протеїнів. Супроводжуючи ці патології, часто відбуваються зміни позаклітинного матриксу та гліканів. Стає зрозуміло, що деякі з цих змін беруть участь у розвитку патології, а втручання, які змінюють характер відкладення гліканів, можуть змінити прогресування захворювання або сприяти функційному відновленню. Позаклітинний матрикс також модифікується під час нормального старіння із загальним зниженням дифузійних параметрів головного мозку, що пов'язано зі зменшенням деяких ХСПГ. Є дані, що підтверджують роль ГСПГ і ХСПГ у хворобі Альцгеймера (ХА), множинному склерозі (МС) й інших нейродегенеративних станах (Ariga, 2010).

ХА характеризується когнітивною дисфункцією та прогресуючою втратою пам'яті внаслідок цитотоксичного відкладення амілоїдного бета (А β) пептиду в головному мозку з подальшою внутрішньоклітинною тау-патологією. Хоча роль ПГ у патогенезі хвороби Альцгеймера все ще не з'ясована, нові дані вказують на можливу роль гепарансульфат протеоглікана й інших макромолекул ПГ у цьому процесі. Показано, що як ГСПГ, так і ХСПГ зв'язують протеїн-попередник амілоїда (APP) і тау, що може порушувати нормальну функцію APP-зв'язувальних протеїнів і сприяти дегенерації нейронів, зазвичай спостерігається навколо ядер амілоїдних бляшок. Кілька досліджень показують, що ГАГ можуть взаємодіяти з А β як *in vitro*, так і в бляшках і можуть сприяти агрегації А β і тау протеїн (Stopschinski, 2018).

При нейродегенеративних процесах порушення гематоенцефалічного бар'єру корелює з інфільтрацією запальних клітин. Активація мікроглії призводить до вивільнення запальних цитокінів, тим самим ініціюючи

послідовність подій, яка призводить до нейродегенерації. Запальні цитокіни, такі як TGF, експресуються в мікроглії та макрофагах і, як було показано, регулюють синтез Х6С-ПГ у головному мозку, який головним чином надходить з астроцитів. Крім того, раніше було показано, що макрофаги секретують хондроїтинсульфат протеоглікани після пошкодження ЦНС. Гепарансульфат має чітку роль у фізіології ендотелію, а перлекан, основний ГСПГ, є основним фактором базальної мембрани і важливим компонентом базальної мембрани судин. Перлекановий домен V, надмірно експресується в мозку після інсульту та має ангіомодуляційні властивості. У даний час вивчаються терапевтичні властивості перлеканового домену V у якості перспективної нової протиінсультної терапії. Кератансульфат (КС) (епітоп 5D4) виявлений в астроцитомі та гліобластомах і віднесений до малігнізаційних астроцитарних новоутворень. Повідомляється, що КС також експресується в розгалуженій мікроглії, однак його синтез пригнічується при експериментальному аутоімунному енцефаломієліті та запаленні, опосередкованої клітинами ЦНС Т-типу 1.

Множинний склероз (МС) – прогресуюче демієлінізуюче захворювання, що характеризується втратою ізолюючого мієліна в головному і спинному мозку. У той час як демієлінізовані ураження зазвичай містять клітини-попередники, які здатні дозрівати в мієлінізуючих олігодендроцитах, у хронічних бляшках ремієлінізації не відбувається, що є відмінною рисою даної патології, яка зустрічається головним чином у людей похилого віку. Гіалуронова кислота накопичувалася в склеротичних бляшках в експериментальних моделях де- та ремієлінізації. ВМГК продукується астроцитами та накопичується в пошкодженнях, де вона пригнічує диференціювання попередників у ремієлінізуючі олігодендроцити. Кілька робіт також показали, що в демієлінізованих осередках і МС-бляшках присутня висока концентрація хондроїтинсульфат протеогліканів. Їх усунення за допомогою shABC і/або блокування РТР-рецептора може посилювати мієлінізацію та збільшувати міграцію попередників олігодендроцитів у осередках ураження (Kuipers et al., 2014). Крім того, дослідження з вивчення геному в цілому показали, що існує сильна кореляція між поліморфізмом гліпікану 5 і запальними демієлінізуючими захворюваннями, такими як множинний склероз і оптикомієліт.

Мукополісахаридоз (МПС) включає сімейство споріднених лізосомальних хвороб накопичення ГАГ, які є результатом мутації в одному з генів, що кодують ферменти катаболічного шляху ГАГ. Це призводить до

порушеної деградації специфічних глікозаміногліканів і накопичення їх похідних у клітинах і тканинах, що обумовлює широке розмаїття клінічних проявів. Мукополісахаридози можна розділити на сім основних підтипів у залежності від ферментативного дефіциту: МПС I, II, III, IV, VI, VII і IX. Цікаво, що підтипи захворювання, які обумовлені накопиченням гепарансульфата, супроводжуються когнітивними порушеннями. Також висловлено припущення, що позаклітинне накопичення похідних ГС і ХС призводить до праймування й активації мікроглії та імунної відповіді у вигляді ендогенних аутоантигенів (Coutinho, 2012). Через прогресивний характер лізосомальних порушень накопичення ГАГ у кінцевому підсумку призводить до загибелі клітин і хронічної запальної відповіді, що призводить до нейродегенерації. Важливо відзначити, що сучасні схеми лікування МПС включають ферментну замісну терапію. Однак через те, що фермент неефективно перетинає ГЕБ, на даний час немає адекватного лікування дефектів ЦНС, пов'язаних із мукополісахаридозами. МПС VI призводить до порушення роботи сітківки та зорового нерву, ретинопатії та нічної сліпоти, збільшення обсягу мозку, великим ураженням білої речовини та збільшення шлуночків, передачі гідроцефалії і підвищення внутрішньочерепного тиску, компресію і пошкодження шийного відділу спинного мозку (Khan., 2017).

Сучасні методи дослідження виділених компонентів, що забезпечують міжклітинні взаємодії, дозволили визначити не тільки доменну структуру протеогліканів та окремих протеїнів, але й встановити перехресне зв'язування за рахунок наявності глікозаміноглікан-зв'язуючих центрів.

Вище вже частково відзначались ліганди, що зв'язуються із глікозаміноглікановими ланцюгами. Більш характеризовані з них ростові та трофічні фактори, які також експресуються в мозку, що розвивається, і/або в дорослому мозку ссавців. Крім класичних факторів росту в мозку ссавців виявлені нові глікозаміноглікан-зв'язуючі протеїни, що також впливають на морфогенез та поведінку нервових клітин.

Adams, K.H. (1973). A theory for the shape of the red blood cell. *Biophys J.*, 13(10), 1049–1053.

Afratis, N., Gialeli, C., Nikitovic, D., Tsegenidis, T., Karousou, E., Theocharis, A.D., Pavão, M.S., Tzanakakis, G.N., Karamanos, N.K. (2012). Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment. *FEBS Journal*, 279(7), 1177–1197.

Allen, N. J., Bennett, M. L., Foo, L. C., Wang, G. X., Chakraborty, C., Smith, S. J., & Barres, B. A. (2012). Astrocyte glypicans 4 and 6 promote formation of excitatory synapses via GluA1 AMPA receptors. *Nature*, 486(7403), 410–414.

Annovi, G., Boraldi, F., Moscarelli, P., Guerra, D., Tiozzo, R., Parma, B., Sommer, P., Quaglino, D. (2012). Heparan Sulfate Affects Elastin Deposition in Fibroblasts Cultured from Donors of Different Ages. *Rejuvenation Research*, 15(1), 22–31.

Altevogt, P., Doberstein, K. & Altevogt Fogel, M. (2016). L1CAM in human cancer. *Int J Cancer*, 138(7), 1565–1576.

Ariga, T., Miyatake, T., & Yu, R. K. (2010). Role of proteoglycans and glycosaminoglycans in the pathogenesis of Alzheimer's disease and related disorders: Amyloidogenesis and therapeutic strategies—A review. *Journal of Neuroscience Research*, 88(11), 2303–2315.

Berx, G. & van Roy, F. (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1:a003129.

Bilandzic, M., & Stenvers, K. L. (2011). Betaglycan: A multifunctional accessory. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 339(1–2), 180–189.

Bogoslovsky, T., Wilson, D., Chen, Y., Hanlon, D., Gill, J., Jeromin, A. & Diaz–Arrastia, R. (2017). Increases of Plasma Levels of Glial Fibrillary Acidic Protein, Tau, and Amyloid β up to 90 Days after Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma*, 34(1), 66–73.

Bonfanti, L. (2006). PSA–NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis. *Prog Neurobiol*, 80(3), 129–164.

Bosman, F. T., & Stamenkovic, I. (2003). Functional structure and composition of the extracellular matrix. *The Journal of Pathology*, 200(4), 423–428.

Brenner, M. (2014). Role of GFAP in CNS injuries. *Neurosci Lett.*, 565, 7–13.

Brown, N.H. (2000). Cell–cell adhesion via the ECM: integrin genetics in fly and worm. *Matrix Biol.*, 19(3), 191–201.

Bukalo, O., Fentrop, N., Lee, A., Salmen, B., Law, J., Wotjak, C., Schweizer, M., Dityatev, A. & Schachner, M. (2004). Conditional ablation of the neural cell adhesion molecule reduces precision of spatial learning, long–term potentiation, and depression in the CA1 subfield of mouse hippocampus. *J Neurosci*. 24, 156–177.

Buckley, C.D., Tan, J., Anderson, K.L., Hanein, D., Volkmann, N. & Weis, W.I., (2014). Cell adhesion. The minimal cadherin–catenin complex binds to actin filaments under force. *Science.*, 346,1254211.

Carballido–López, R. & Errington, J. (2003). A dynamic bacterial cytoskeleton. *Trends Cell Biol.*, 13(11), 577–583.

Caterson, B., & Melrose, J. (2018). Keratan sulfate, a complex glycosaminoglycan with unique functional capability. *Glycobiology*, 28(4), 182–206.

Chee, W. W., Danielle, E. D. & Deirdre, R. C. (2012). The role of immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules in cancer metastasis. *Int J Cell Biol.*, 2012, 340296.

Chernyshova, Y., Leshchyn'ska, I., Hsu, S.C., Schachner, M. & Sytnyk, V. (2011). The neural cell adhesion molecule promotes FGFR–dependent phosphorylation and membrane targeting of the exocyst complex to induce exocytosis in growth cones. *J Neurosci*, 31, 22–35.

Coutinho, M. F., Lacerda, L., & Alves, S. (2012). Glycosaminoglycan Storage Disorders: A Review. *Biochemistry Research International*, 2012, 1–16.

Cremer, H., Chazal, G., Carleton, A., Goridis, C., Vincen,t J. & Lledo, P. (1998). Long-term but not short-term plasticity at mossy fiber synapses is impaired in neural cell adhesion molecule–deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 132–137.

Danen, E.J. (2006). *Integrins: An Overview of Structural and Functional Aspects*. CRC Press, 234.

- Danielsson F., Peterson McKenzie K., Araújo H.C. & Lautenschläger, F. & Gad A.R. (2018). Vimentin Diversity in Health and Disease. *Cells*, 7(10), 147–185.
- Díaz–Balzac, C. A., Lázaro–Peña, M. I., Tecle, E., Gomez, N., & Bülow, H. E. (2014). Complex Cooperative Functions of Heparan Sulfate Proteoglycans Shape Nervous System Development in *Caenorhabditis elegans*. *Genes|Genomes|Genetics*, 4(10), 1859–1870.
- Eng, L.F., & Ghirnikar, R.S. (1994). GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol.*, 4, 229–237.
- Etienne–Manneville, S. (2013). Microtubules in cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 29, 471–499.
- Feng, Y., Ma. X., Deng. L., Yao, B., Xiong, Y., Wu, Y., Wang, L., Ma, Q. & Ma F. (2017). Role of selectins and their ligands in human implantation stage. *Glycobiology*, 27(5), 385–391.
- Filmus, J., Capurro, M., & Rast, J. (2008). Glypicans. *Genome Biology*, 9(5), 224.
- Frischknecht, R., & Seidenbecher, C. I. (2012). Brevican: A key proteoglycan in the perisynaptic extracellular matrix of the brain. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(7), 1051–1054.
- Gandhi, N. S., & Mancera, R. L. (2008). The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins. *Chemical Biology & Drug Design*, 72(6), 455–482.
- Goldmann, W.H. (2018). Intermediate filaments and cellular mechanics. *Cell Biol Int.*, 42(2), 132–138
- Gopal, S., Multhaupt, H. A. B., Pocock, R., & Couchman, J. R. (2017). Cell–extracellular matrix and cell–cell adhesion are linked by syndecan–4. *Matrix Biology*, 60–61, 57–69.
- Gubbiotti, M. A., Neill, T., Frey, H., Schaefer, L., & Iozzo, R. V. (2015). Decorin is an autophagy–inducible proteoglycan and is required for proper in vivo autophagy. *Matrix Biology*, 48, 14–25.
- Hansen, S.M., Berezin, V. & Bock, E. (2008). Signaling mechanisms of neurite outgrowth induced by the cell adhesion molecules NCAM and N–cadherin. *Cell Mol Life Sci*, 65(23), 3809–3821.
- Hemker, H. C. (2016). A century of heparin: past, present and future. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 14(12), 2329–2338.
- Herrmann, H. & Aebi, U. (2016). Intermediate Filaments: Structure and Assembly. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 8(11),1–22.
- Hinsby, A.M., Berezin, V. & Bock, E. (2004). Molecular mechanisms of NCAM function. *Front Biosci*, 9,2227–2244.
- Hirokawa, N., Niwa, S. & Tanaka, Y. (2010). Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron*. 68, 610–638.
- Hirokawa, N., Sato–Yoshitake, R., Kobayashi, N., Pfister, K., Bloom, G., & Brady, S. (1991). Kinesin associates with anterogradely transported membranous organelles in vivo. *J Cell Biol*, 114, 295–302.
- Hol, E.M. & Capetanaki, Y. (2017). Type III Intermediate Filaments Desmin, Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), Vimentin, and Peripherin. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 9 (12), pii: a021642.
- Hol, E. M., & Pekny, M. (2015). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current Opinion in Cell Biology*, 32, 121–130.

Hoshino, H., Foyez, T., Ohtake–Niimi, S., Takeda–Uchimura, Y., Michikawa, M., Kadomatsu, K., & Uchimura, K. (2013). KSGal6ST Is Essential for the 6–Sulfation of Galactose within Keratan Sulfate in Early Postnatal Brain. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 62(2), 145–156.

Howell, M. D., & Gottschall, P. E. (2012). Lectican proteoglycans, their cleaving metalloproteinases, and plasticity in the central nervous system extracellular microenvironment. *Neuroscience*, 217, 6–18.

Fujita, K., Takechi, E., Sakamoto, N., Sumiyoshi, N., Izumi, S., Miyamoto, T., Matsuura, S., Tsurugayac, T., Akasaka, K., Yamamoto, T. (2010). HpSulf, a heparan sulfate 6–O–endosulfatase, is involved in the regulation of VEGF signaling during sea urchin development. *Mechanisms of Development*, 127(3–4), 235–245.

Jakovcevski, I., Wu, J., Karl, N., Leshchyn'ska, I., Sytnyk, V., Chen, J., Irintchev, A. & Schachner, M. (2007). Glial scar expression of CHL1, the close homolog of the adhesion molecule L1, limits recovery after spinal cord injury. *J Neurosci*, 27, 7222–7233.

Jayakumar, A. R., Apeksha, A., & Norenberg, M. D. (2016). Role of Matricellular Proteins in Disorders of the Central Nervous System. *Neurochemical Research*, 42(3), 858–875.

Jones, L.J., Carballido–López, R. & Errington, J. (2001). Control of cell shape in bacteria: helical, actin–like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell*, 23;104(6), 913–922.

Iio, K., Furukawa, K.–I., Tsuda, E., Yamamoto, Y., Maeda, S., Naraoka, T. & Ishibashi, Y. (2016). Hyaluronic acid induces the release of growth factors from platelet–rich plasma. *Asia–Pacific Journal of Sports Medicine, Arthroscopy, Rehabilitation and Technology*, 4, 27–32.

Kamimura, K., & Maeda, N. (2017). Heparan sulfate proteoglycans in *Drosophila* neuromuscular development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, 1861(10), 2442–2446.

Kiefel, H., Bondong, S., Hazin, J., Ridinger, J., Schirmer, U. & Riedle, S. (2012). Altevogt L1CAM: a major driver for tumor cell invasion and motility. *Cell Adh Migr*, 6(4), 374–384.

Khalili, A.A. & Ahmad M.R. (2015). A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications *Int. J Mol Sci.*, 16(8), 18149–18184.

Khan, S., Alméciga–Díaz, C. J., Sawamoto, K., Mackenzie, W. G., Theroux, M. C., Pizarro, C. & Tomatsu, S. (2017). Mucopolysaccharidosis IVA and glycosaminoglycans. *Molecular Genetics and Metabolism*, 120(1–2), 78–95.

Kielty, C. M., & Grant, M. E. (2002.). The Collagen Family: Structure, Assembly, and Organization in the Extracellular Matrix. *Connective Tissue and Its Heritable Disorders*, 159–221.

Kiselyov, V.V., Skladchikova, G., Hinsby, A.M., Jensen, P.H., Kulahin, N., Soroka, V., Pedersen, N., Tsetlin, V., Poulsen, F.M. & Berezin, V. (2003). Structural basis for a direct interaction between FGFR1 and NCAM and evidence for a regulatory role of ATP. *Structure*, 11, 691–701.

Kimura, M., Kim, E., Kang, W., Yamashita, M., Saigo, M., Yamazaki, T., Nakanishi, T., Kashiwabara, S., Baba, T. (2009). Functional Roles of Mouse Sperm Hyaluronidases, HYAL5 and SPAM1, in Fertilization. *Biology of Reproduction*, 81(5), 939–947.

Kogan, G., Šoltés, L., Stern, R. et al. (2007) Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications *Biotechnol Lett* 29: 17.

Köster, S., Weitz, D.A., Goldman, R.D., Aebi, U. & Herrmann, H. (2015). Intermediate filament mechanics in vitro and in the cell: from coiled coils to filaments, fibers and networks. *Curr Opin Cell Biol.*, 32, 82–91

Liang, J., Jiang, D., & Noble, P. W. (2016). Hyaluronan as a therapeutic target in human diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97, 186–203.

Lobanovskaya, N., Zharkovsky ,T., Jaako ,K., Jürgenson, M., Aonurm–Helm, A. & Zharkovsky A. (2015). PSA modification of NCAM supports the survival of injured retinal ganglion cells in adulthood. *Brain Res*, 2, 1625–1629.

Loers, G., Saini, V., Mishra, B., Papastefanaki, F., Lutz ,D., Chaudhury, S., Ripoll D.R., Wallqvist, A., Gul. S., Schachner, M., & Kaur, G. (2014). Nonyloxytryptamine mimics polysialic acid and modulates neuronal and glial functions in cell culture. *J Neurochem*, 128(1), 88–100.

Lu, Z., Mathew, S., Chen, J., Hadziselimovic, A., Palamuttam, R., Hudson, B.G., Fässler, R., Pozzi, A., Sanders, C.R. & Zent, R. (2016). Implications of the differing roles of the $\beta 1$ and $\beta 3$ transmembrane and cytoplasmic domains for integrin function. *Elife*, 5, pii: e18633. doi: 10.7554/eLife.18633.

Margolis, R. U., Margolis, R. K., Chang, L. B., & Preti, C. (1975). Glycosaminoglycans of brain during development. *Biochemistry*, 14(1), 85–88. Margolin, W. (2005). FTSZ and the division of prokaryotic cells and organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 6(11), 862–871.

Matsunaga, Y., Noda, M., Murakawa, H., Hayashi, K., Nagasaka, A., Inoue S., Miyata, T., Miura, T., Kubo, K.I. & Nakajima, K. (2017). Reelin transiently promotes N–cadherin–dependent neuronal adhesion during mouse cortical development. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 114(8), 2048–2053.

McKeon, R. J., Juryneć, M. J. & Buck, C. R. (1999). The Chondroitin Sulfate Proteoglycans Neurocan and Phosphacan Are Expressed by Reactive Astrocytes in the Chronic CNS Glial Scar. *Journal of Neuroscience* 15, 19 (24) 10778–10788.

Merino, F. & Raunser S. (2018). The complex simplicity of the bacterial cytoskeleton. *PNAS* , 115 (13), 3205–3206.

Mikami, T., & Kitagawa, H. (2013). Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, 1830(10), 4719–4733.

Muñoz, D., Serrano, M. K., Hernandez, M. E., Haller, R., Swanson, T., Slaton, J. W. & Wilson, M. J. (2017). Matrix metalloproteinase and heparin–stimulated serine proteinase activities in post–prostate massage urine of men with prostate cancer. *Experimental and Molecular Pathology*, 103(3), 300–305.

Mulloy, B., Lever, R., & Page, C. P. (2016). Mast cell glycosaminoglycans. *Glycoconjugate Journal*, 34(3), 351–361.

Nakato, H., & Li, J.–P. (2016). Functions of Heparan Sulfate Proteoglycans in Development: Insights From *Drosophila* Models. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 275–293.

Niessen, C.M., Leckband, D. & Yap, A.S. (2011). Tissue organization by cadherin adhesion molecules: dynamic molecular and cellular mechanisms of morphogenetic regulation. *Physiol Rev*, 91(2), 691–731.

Niethammer, P., Delling, M., Sytnyk, V., Dityatev, A., Fukami, K. & Schachner, M. (2002). Cosignaling of NCAM via lipid rafts and the FGF receptor is required for neuritegenesis. *J Cell Biol*, 15(7), 21–32.

Papakonstantinou, E., Roth, M., & Karakiulakis, G. (2012). Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. *Dermato-Endocrinology*, 4(3), 253–258.

Pekny, M., Wilhelmsson, U., & Pekna, M. (2014). The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neurosci Lett.*, 565, 30–38.

Petrey, A. C., & de la Motte, C. A. (2014). Hyaluronan, a Crucial Regulator of Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 5. doi:10.3389/fimmu.2014.00101

Pierre, K., Bonhomme, R., Dupouy, B., Poulain, D. & Theodosis, D. (2001). The polysialylated neural cell adhesion molecule reaches cell surfaces of hypothalamic neurons and astrocytes via the constitutive pathway. *Neuroscience*. 103, 133–142.

Pomin, V. H. (2016). Paradigms in the structural biology of the mitogenic ternary complex FGF:FGFR:heparin. *Biochimie*, 127, 214–226.

Pohlkamp, T., Durakoglugil, M., Lane-Donovan, C., Xian, X., Johnson, E. B., Hammer, R. E., & Herz, J. (2015). Lrp4 Domains Differentially Regulate Limb/Brain Development and Synaptic Plasticity. *PLOS ONE*, 10(2), e0116701. Povlsen, G.K. & Ditlevsen, D.K. (2010). The neural cell adhesion molecule NCAM and lipid rafts. *Adv Exp Med Biol*, 663, 183–198.

Pozzi, A., Yurchenco, P. D., & Iozzo, R. V. (2016). The nature and biology of basement membranes. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 57–58, 1–11.

Puchkov, D., Leshchyns'ka, I., Nikonenko, A.G., Schachner, M. & Sytnyk, V. (2011). NCAM/spectrin complex disassembly results in PSD perforation and postsynaptic endocytic zone formation. *Cereb Cortex*, 21(10), 2217–2232.

Sasaki, T., Fässler, R., Hohenester, E. (2004). Laminin. *The Journal of Cell Biology*, 164 (7) 959–963.

Sadoul, K., Sadoul, R., Faissner, A. & Schachner, M. (1988). Biochemical characterization of different molecular forms of the neural cell adhesion molecule L1. *J Neurochem*, 50(2), 510–521.

Saini, V., Loers, G., Kaur, G., Schachner, M. & Jakovcevski, I. (2016). Impact of neural cell adhesion molecule deletion on regeneration after mouse spinal cord injury. *Eur J Neurosci*, 44(1), 1734–1746.

Salvo, F., Polimeni, G. & Moretti, U. (2007). Adverse drug reactions related to amoxicillin alone and in association with clavulanic acid: data from spontaneous reporting in Italy. *J Antimicrob Chemother*, 60(1), 121–126.

Santilli, V., Paoloni, M., Mangone, M., Alviti, F., & Bernetti, A. (2016). Hyaluronic acid in the management of osteoarthritis: injection therapies innovations. *Clinical cases in mineral and bone metabolism : the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases*, 13(2), 131–134.

Santuccione, A., Sytnyk, V., Leshchyns'ka, I. & Schachner, M. (2005). Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. *J Cell Biol*, 169(2), 341–354.

Samatov, T.R., Wicklein, D. & Tonevitsky, A.G. (2016). L1CAM: Cell adhesion and more. *Prog Histochem Cytochem*, 51(2), 25–32.

Sarria, A.J., Panini, S.R. & Evans, R.M. (1992). A functional role for vimentin intermediate filaments in the metabolism of lipoprotein-derived cholesterol in human SW-13 cells. *J Biol Chem.*, 267(27), 19455–19463.

Scott, R. A., & Panitch, A. (2013). Glycosaminoglycans in biomedicine. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 5(4), 388–398.

Senkov, O., Tikhobrazova, O. & Dityatev, A. (2012). PSA–NCAM: synaptic functions mediated by its interactions with proteoglycans and glutamate receptors. *Int J Biochem Cell Biol*, 44(4), 591–595.

Shamir, E.R. & Ewald, A.J. (2015). Adhesion in Mammary Development: Novel Roles for E–Cadherin in Individual and Collective Cell Migration. *Curr Top Dev. Biol.*, 112, 353–382.

Shetty, A., Sytnyk, V., Leshchyns'ka, I., Puchkov, D., Haucke, V. & Schachner, M. (2013). The neural cell adhesion molecule promotes maturation of the presynaptic endocytotic machinery by switching synaptic vesicle recycling from adaptor protein 3 (AP–3)– to AP–2–dependent mechanisms. *J Neurosci*, 33(42), 16828–16845.

Singh, P., Carraher, C., & Schwarzbauer, J. E. (2010). Assembly of Fibronectin Extracellular Matrix. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 26(1), 397–419.

Soroka, V., Kasper, C. & Poulsen, F.M. (2010) Structural Biology of NCAM. *Advances in Experimental Medicine and Biology* book series, 663, 3–22

Stoeckli, E. T., Kilinc, D., Kunz, B., Kunz, S., Lee, G. U., Martines, E., Rader, C., & Suter, D. (2013). Analysis of cell–cell contact mediated by Ig superfamily cell adhesion molecules. *Current Protocols in Cell Biology*, 61, 951–958.

Stopschinski, B. E., Holmes, B. B., Miller, G. M., Manon, V. A., Vaquer–Alicia, J., Prueitt, W. L. & Diamond, M. I. (2018). Specific glycosaminoglycan chain length and sulfation patterns are required for cell uptake of tauversus α –synuclein and β –amyloid aggregates. *Journal of Biological Chemistry*, 293(27), 10826–10840.

Sytnyk, V., Leshchyns'ka, I. & Schachner, M. (2017). Neural Cell Adhesion Molecules of the Immunoglobulin Superfamily Regulate Synapse Formation, Maintenance, and Function. *Trends Neurosci.*, 40(5), 295–308.

Su, Z., Kishida, S., Tsubota, S., Sakamoto, K., Cao, D., Kiyonari, S., Ohira, M., Kamijo, T., Narita, A., Xu, Y., Takahashi, Y. & Kadomatsu, K. (2017). Neurocan, an extracellular chondroitin sulfate proteoglycan, stimulates neuroblastoma cells to promote malignant phenotypes. *Oncotarget*, 8(63), 106296–106310.

Tang, D.D. & Gerlach, B.D. (2017). The roles and regulation of the actin cytoskeleton, intermediate filaments and microtubules in smooth muscle cell migration. *Respir Res.*, 18, 54–61.

Tsai, C.T., Zulueta, M. M. L., & Hung, S. C. (2017). Synthetic heparin and heparan sulfate: probes in defining biological functions. *Current Opinion in Chemical Biology*, 40, 152–159.

Tykhomyrov, A.A., Pavlova, A.S. & Nedzvetsky, V.S. (2016). Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP): on the 45th Anniversary of Its Discovery. *Neurophysiology*, 48 (1), 54–71.

Uchimura, K. (2015) Keratan Sulfate: Biosynthesis, Structures, and Biological Functions. In: Balagurunathan K., Nakato H., Desai U. (eds) *Glycosaminoglycans. Methods in Molecular Biology*, vol 1229. Humana Press, New York, NY doi: 10.1007/978–1–4939–1714–3_30

van Roy, F. (2014). Beyond E–cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer. *Nat Rev Cancer.*, 14(2), 121–134.

Wang, S., Sugahara, K., & Li, F. (2016). Chondroitin sulfate/dermatan sulfate sulfatases from mammals and bacteria. *Glycoconjugate Journal*, 33(6), 841–851.

Wei, H., Cai, H., Wu, J., Wei, Z., Zhang, F., Huang, X., Ma, L., Feng, L., Zhang, R., Wang Y2, Ragg, H., Zheng, Y. & Zhou, A. (2016). Heparin Binds Lamprey Angiotensinogen

and Promotes Thrombin Inhibition through a Template Mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 291(48), 24900–24911.

Weiss, R. J., Esko, J. D., & Tor, Y. (2017). Targeting heparin and heparan sulfate protein interactions. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 15(27), 5656–5668.

Wickstead, B. & Gull, K. (2011). The evolution of the cytoskeleton. *J Cell Biol.*, 194(4), 513–525.

Wobst, H., Schmitz, B., Schachner, M., Diestel, S., Leshchyns'ka, I., & Sytnyk, V. (2015). Kinesin-1 promotes post-Golgi trafficking of NCAM140 and NCAM180 to the cell surface. *J Cell Sci*, 128, 2816–2829.

Woltersdorf, C., Bonk, M., Leitinger, B., Huhtala, M., Käpylä, J., Heino, J., Gil Girol, C., Niland, S., Eble, J.A., Bruckner, P., Dreier, R. & Hansen, U. (2017). The binding capacity of $\alpha 1\beta 1$ -, $\alpha 2\beta 1$ - and $\alpha 10\beta 1$ -integrins depends on non-collagenous surface macromolecules rather than the collagens in cartilage fibrils. *Matrix Biol.*, 63, 91–105.

Yamaguchi, Y. (2000). Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57(2), 276–289.

Yamashita, Y., Nakada, S., Yoshihara, T., Nara, T., Furuya, N., Miida, T. & Arikawa-Hirasawa, E. (2018). Perlecan, a heparan sulfate proteoglycan, regulates systemic metabolism with dynamic changes in adipose tissue and skeletal muscle. *Scientific Reports*, 8(1).

Yadavilli, S., Hwang, E. I., Packer, R. J., & Nazarian, J. (2016). The Role of NG2 Proteoglycan in Glioma. *Translational Oncology*, 9(1), 57–63.

Yang, Z. & Wang, K.K. (2015). Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends Neurosci.*, 38(6), 364–74.

Yoshikazu, T., Xiaojing, Y. & Scott S. (2007). The integrins. *Genome Biol*, 8(5), 215.

Zak, B. M., Schuksz, M., Koyama, E., Mundy, C., Wells, D. E., Yamaguchi, Y. & Esko, J. D. (2011). Compound heterozygous loss of Ext1 and Ext2 is sufficient for formation of multiple exostoses in mouse ribs and long bones. *Bone*, 48(5), 979–987

Zaremba, S., Guimaraes, A., Kalb, R. G., & Hockfield, S. (1989). Characterization of an activity-dependent, neuronal surface proteoglycan identified with monoclonal antibody Cat-301. *Neuron*, 2(3), 1207–1219.

Zhang, Z., Miao, L., & Wang, L. (2012). Inflammation Amplification by Versican: The First Mediator. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(6), 6873–6882.

Zhang, F., Zhang, Z., & Linhardt, R. J. (2010). Glycosaminoglycans. *Handbook of Glycomics*, 59–80.

Розділ 3. МОЛЕКУЛЯРНА БУДОВА ЯДЕРНОЇ МЕМБРАНИ

Структура, що обмежує параметр клітинного ядра, – ядерна оболонка, характерна для еукаріотичних клітин. Вона розділяє два внутрішньоклітинних компартменти один від одного – цитоплазму від ядра. Значення такого поділу структур у просторі дуже важливо: це призводить до відокремлення процесів синтезу протеїна і процесів синтезу нуклеїнових кислот, що створює додаткові, порівняно з прокаріотами, можливості для регуляції генної активності та її реалізації у вигляді синтезу специфічних протеїнів. Активна регуляція транспорту з цитоплазми в ядро та з ядра в цитоплазму через спеціальні комплекси пор створює систему вибіркового транспорту речовин, регулюючи потоки ядерного імпорту та експорту. Крім того, як уже згадувалося, ядерна оболонка відіграє велику роль в організації тривимірної структури інтерфазного ядра, елементи ядерної оболонки є частиною ядерного протеїнового матриксу (Hutten, 2006).

Ядерна оболонка складається з двох мембран – зовнішньої і внутрішньої, між якими розташовується перинуклеарний простір (рис. 17).

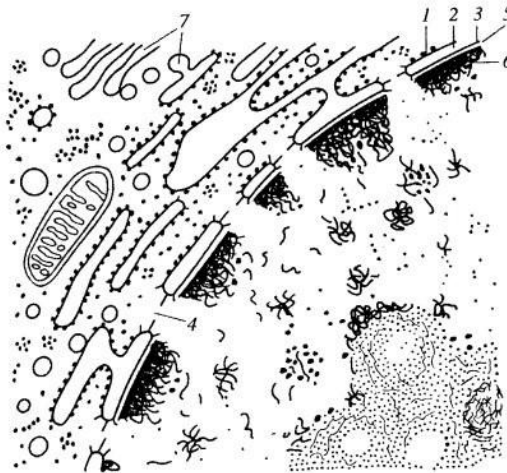


Рис. 17 Ділянка периферії ядра

1 – зовнішня мембрана ядерної оболонки ; 2 – перинуклеарний простір; 3 – внутрішня мембрана ядерної оболонки; 4 – ядерні пори; 5 – ламіни; 6 – хроматин; 7 – мембрани цитоплазми

Внутрішня мембрана ядерної оболонки структурно пов'язана з ламіною – фіброзним периферичним шаром ядерного протеїнового матриксу. У загальному вигляді ядерна оболонка може представлена, як двошаровий мішок, що відокремлює вміст ядра від цитоплазми. Однак ядерна оболонка має характерну особливість, що відрізняє її від інших двомембранних структур клітини (мітохондрій і пластид). Це наявність

особливих ядерних пор, які утворюються за рахунок численних зон злиття двох ядерних мембран і є, ніби округлі, наскрізні перфорації всієї ядерної оболонки (Webster, 2009; von Appen, 20016).

Зовнішня мембрана ядерної оболонки, що безпосередньо контактує з цитоплазмою клітини, має ряд структурних особливостей, що дозволяють віднести її до власне мембранної системи ЕПР. Так, на зовнішній ядерній мембрані зазвичай розташовується велика кількість рибосом, як і на мембранах ергастоплазми. Існують численні спостереження про безпосередній перехід зовнішньої ядерної мембрани в систему каналів ендоплазматичного ретикулула, що особливо підкреслює структурну ідентичність цих мембран (див. рис. 17).

Внутрішня мембрана ядерної оболонки рибосом на своїй поверхні не має, але пов'язана з фіброзним шаром – ядерною ламіною (lamina nucleum limitans), яка, в свою чергу, заякорює хроматин на ядерній оболонці. Зв'язок хроматину з внутрішньою мембраною оболонки є її характерною особливістю, хоча існують приклади, коли ці зв'язки порушуються при збереженні цілісності ядерної оболонки (Naetar, 2017).

Ламіна – тонкий фіброзний шар, підстилаючий внутрішню мембрану ядерної оболонки. До її складу входять також комплекси ядерних пор, які як би «вмуровано» в фіброзний шар. Часто цю частину ядерного матриксу називають фракцією «поровий комплекс – ламіна».

Структурна роль ламіни дуже велика: вона утворює суцільний фіброзний протеїновий шар по периферії ядра, достатній для того, щоб підтримувати морфологічну цілісність ядра. Так, видалення обох мембран ядерної оболонки за допомогою тритона X-100 не викликає розпаду, розчинення ядер. Вони зберігають свою округлу форму і не розпливаються навіть у разі переведення їх в низьку іонну силу, коли відбувається набухання хроматина.

Ламіни виконують такі функції:

- утворюють каріоскелет;
- взаємодіють зі скелетними протеїнами цитоплазми в районі пор;
- беруть участь в організації внутрішнього периферичного кільця порового комплексу;
- беруть участь в організації хроматина (Prokosimer, 2009; Gruenbaum, 2015).

Ламіни представлені трьома протеїнами (ламіни А, В, С). Два з них, ламіни А і С, близькі один до одного імунологічно та за амінокислотним складом. Ламін В від них відрізняється тим, що він є ліпопротеїд і тому більш міцно зв'язується з ядерною мембраною. Ламін В залишається

зв'язаним з мембранами навіть під час мітозу, тоді як ламіни А і С звільняються при руйнуванні фіброзного шару і дифузно розподіляються по клітині (de Leeuw, 2018).

Як виявилось, ламіни близькі за своїм амінокислотним складом проміжним мікрофіламентам (віментиновим і цитокератиновим), що входять до складу цитоскелета. Часто фракція виділених ядер, а також препарати ядерного матриксу містять значні кількості проміжних філаментів, які залишаються пов'язаними з периферією ядра навіть після видалення ядерних мембран (Минин, 2008).

На відміну від проміжних філаментів, ламіни при полімеризації не утворюють нитчастих структур, а організовуються в мережі з ортогональним типом укладання молекул. Такі суцільні ґратчасті ділянки підстеляють внутрішню мембрану ядерної оболонки, можуть розбиратися при фосфорилуванні ламін і знову полімеризуватися при їх дефосфорилуванні, що забезпечує динамічність як цього шару, так і всієї ядерної оболонки.

Ці фібрилярні протеїни не утворюють незмінну структуру. Фіброзний шар ламіни весь час перебудовується, особливо у зв'язку із зростанням поверхні ядра, під час клітинного циклу. Характерні для внутрішньої ядерної мембрани протеїни – ламіни А, С і В – відносяться до фібрилярних протеїнів V типу проміжних філаментів, їх фібрилярні мономери можуть утворювати димери і тетрамери, а останні утворюють фібрили товщиною близько 10 нм (Turgay, 2017). З боку каріоплазми під внутрішньою ядерною мембраною такі фібрили утворюють ортогональні структури, що чергуються з пухко розташованою мережею цих же фібрил. Ламіни мають спільну первинну структуру – центральний домен (3 альфа-спіральних ділянки) і С- і N-кінцевий глобулярні домени. Протягом 566 амінокислот ламіни А і С ідентичні. У ламіна А на С – кінці унікальний відрізок у 98 амінокислот. У ламіна С на С – кінці відрізок у 6 амінокислот.

Протеїни ламіни з мембраною пов'язані двояким чином. Так, ламін В після синтезу модифікується додаванням гідрофобної ізопентильної групи поблизу С-кінця. Ця ліпофільна група вбудовується в шар мембрани і як би заякорює ламіни на мембрані. Крім того, цілий ряд інтегральних протеїнів внутрішньої ядерної мембрани (LBR, LAR, емерін та ін.) також закріплює ламіни допомогою додаткових протеїнів, що входять до складу цього фіброзного шару. Ці ж протеїни беруть участь у зв'язуванні ядерної мембрани з хроматином.

Фізіологічне значення наявності в клітинах декількох видів преламінів і ламінів раніше вивчалось на тваринах, що дозволило

встановити їх відповідальність за надходження емерина в мембрану ядра; зокрема, у тварин, в яких в організмі одночасно відсутні обидва ламіни (А і С) ядра клітин тканин сильно деформуються, в них не надходить емерин і ряд інших важливих речовин. Такі ядра не здатні повноцінно виконувати свої функції, тому у тварин суттєво гальмується ріст організму, виникають м'язова слабкість і смерть через 5-6 тижнів після народження (Burke, 2013).

Відомо також, що порушення утворення цих речовин в організмі людини має пряме відношення до цілого ряду складних захворювань, таких як прогресивна м'язова дистрофія, вроджена міопатія, кардіоміопатія, прогерія. Майже всі ці захворювання вважаються катастрофічними, оскільки ефективно допомогти чим-небудь при даній патології практично неможливо (Worman, 2010). Зупинимося на одному з них – на прогерії.

Прогерія – синдром передчасного старіння, при якому організм людини за 12–15 років після народження «проживає» 70-річний період життя, тобто до 10-14 років хвора дитина має такі зміни тканин організму, які спостерігаються у людей літнього віку. Старіння організму протікає з неймовірно великою швидкістю, що супроводжується розвитком атеросклерозу судин, остеопорозу кісток, випадінням волосся, порушенням стану щелеп і зубів, а згодом – серця і мозку. Існує кілька форм прогерії, і практично всі вони супроводжуються серйозним порушенням утворення ламіна А в результаті генної мутації. Деякі види цього захворювання можна відтворювати в експерименті на тваринах. Для того, щоб можна було розробити способи лікування прогерії та інших подібних захворювань, слід з'ясувати всі механізми їх розвитку. З цією метою великою групою вчених із США і Швеції під керівництвом Loren G. Fong було проведено експериментальне дослідження особливостей функціонування ламінів А і С у тварин в нормі і при дії мутацій на цей процес. Вчені змінили роботу генів таким чином, що в однієї групи тварин повністю припинялося формівання ламіна А, в іншій – С (Fong, 2006).

Дослідження показали, що у тварин з відсутністю ламіна А, практично не спостерігалось відхилень від норми: вони були здоровими, не мали кісткових або м'язових хвороб; тривалість життя була звичайною. Ядра клітин тканин у них майже не мали деформації. Це підтвердило гіпотезу про несуттєве значення ламіна А для процесу старіння організму і розвитку ряду захворювань. У тварин з порушенням утворення ламіна С, навпаки, спостерігалось значна деформація ядер, і виникало захворювання, що має симптоми прогерії. Таким чином, доведено, що, на відміну від ламіна А, присутність ламіна С в клітині є обов'язковим для нормального функціонування оболонок ядер і запобігання передчасного старіння

організму. Це змінює стратегію розробки методів діагностики та лікування прогерії та аналогічних захворювань.

3.1 Протеїновий склад ядерної оболонки хребетних

Тісний зв'язок між ламіною та внутрішньою ядерною мембраною забезпечується за допомогою зв'язку ламінів з інтегральними мембранними протеїнами. Основною характеристикою цих протеїнів є наявність трансмембранного домена і сайтів зв'язування з ламінами А, В та С. До цих протеїнів відносяться ламін-В-рецепторний протеїн LBR, ламіноасоційовані протеїни LAP1 та LAP2, несприн, емерін, MAN1 (рис. 18) (Barton, 2015).

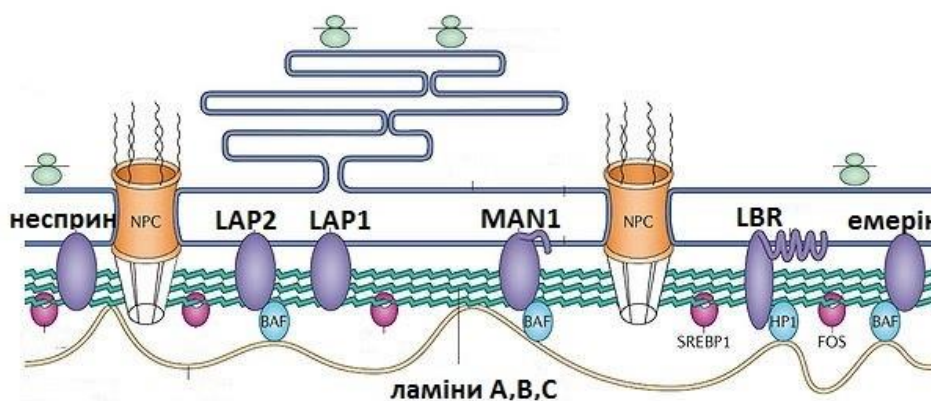


Рис. 18 Протеїни внутрішньої ядерної мембрани

Ламін-В-рецепторний протеїн був одним із перших добре описаних протеїнів внутрішньої ядерної мембрани. Цей протеїн має молекулярну масу 60 кДа та має 8 трансмембранних доменів, розташованих з його С-кінця. Перші 60 амінокислот протеїна відповідають за зв'язування з ламіном В типу, а його N-кінцевий домен відповідає за зв'язування з гістоном H1 та негістоновими протеїнами.

Протеїни групи LAP1 позначаються як протеїни LAP1A, LAP1B, LAP1C з молекулярними масами 75, 68, 55 кДа відповідно. Кожна ізоформа даної групи протеїнів має один трансмембранний домен і зв'язується з ламінами з різною афінністю.

Група протеїнів LAP2 також має 3 ізоформи LAP2 α , LAP2 β , LAP2 γ , з молекулярними масами 51, 39 та 75 кДа відповідно. LAP2 β та LAP2 γ є інтегральними мембранними протеїнами, а LAP2 α має трансмембранний домен та знаходиться на периферії нуклеоплазми.

Протеїн MAN1 вперше виявлений у 2000 році завдяки виявленню антитіл до нього у крові пацієнтів. Він має N-кінцевий домен, який так як і C-кінцевий розміщений з боку нуклеоплазми, та два трансмембранних сегменти, за допомогою яких протеїн закріплюється на втутрішній ядерній оболонці.

Емерін був відкритий у 1994 році при клонуванні гена, який знаходиться в 28 хромосомі людини, мутація якого викликає прогресивну м'язову дистрофію Емері-Дрейфуса. Має молекулярну масу 34 кДа. Емерін є гідрофільний, збагачений на серин протеїн, має на C-кінці гідрофобний домен для закріплення на ядерній мембрані. Протеїн емерін виконує такі функції:

- бере участь у зв'язуванні ядерної мембрани з ядерної ламіною;
- утворенні міжклітинних контактів у кардіоміоцитах;
- підтримки цілісності цитоскелета за рахунок зв'язку емерін-ламін А.

Цей протеїн важливий у клітинах, що мають підвищене механічне навантаження (Shimojima, 2017).

3.2 Ядерно-поровий комплекс

Найбільш характерною структурою в складі ядерної оболонки є ядерна пора. Пори в оболонці утворюються за рахунок злиття двох ядерних мембран у вигляді округлих наскрізних отворів, або перфорацій, з діаметром близько 100 нм. При альдегідній фіксації або використанні методу заморожування і сколювання в електронному мікроскопі видно, що округлий наскрізний отвір в ядерній оболонці заповнений складно організованими глобулярними і фібрилярними структурами (рис. 19).

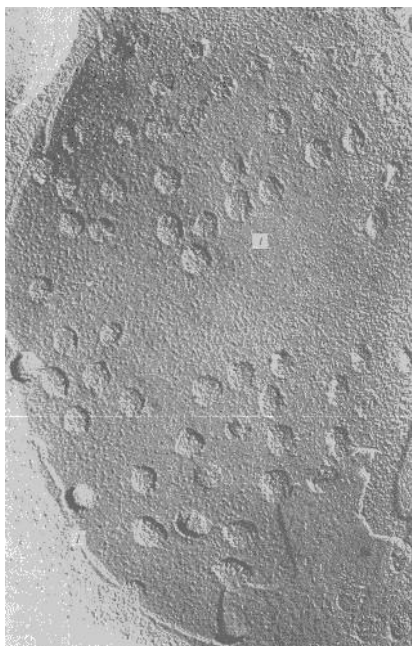


Рис. 19 Мікрофотографія поверхні клітинного ядра (метод заморожування-сколювання), отримана за допомогою електронного мікроскопа.

Сукупність мембранних перфорацій і цих структур називають комплексом ядерних пор. Тим самим підкреслюється, що ядерна пора не просто наскрізна дірка в ядерній оболонці, через яку безпосередньо можуть взаємодіяти речовини ядра й цитоплазми. Компоненти комплексу пор

мають протеїнову природу (Rout,2000; Köhler, 2010).

Ядерний поровий комплекс (ЯПК, або NPC – nuclear pore complex) є супрамолекулярною структурою з молекулярною масою більше 125×10^3 кДа, що складається з понад 1000 протеїнів, маса яких у 30 разів більше, ніж рибосома. Протеїни ЯПК носять назву **нуклеопоринів**. Налічується 50-100 видів цих структур; вони зібрані приблизно в 12 субкомплексів (Adam, 2006).

Останнім часом вдалося отримати виразні зображення ЯПК за допомогою електронного мікроскопу, що дає можливість зрозуміти їх структурну організацію. Зовнішній діаметр порового комплексу становить близько 100 нм, а висота – 75 нм. В цілому він має циліндричну фігуру з ознаками октогональної симетрії. Незважаючи на вражаючі зображення виділених ЯПК, різні автори дають різні схеми будови цього складного комплексу, що має симетрію восьмого порядку.

Якщо подивитися на ЯПК на ультратонкому зрізі, то впадає в очі, що його периферія представлена вісьмома глобулами (рис. 20 і 21).

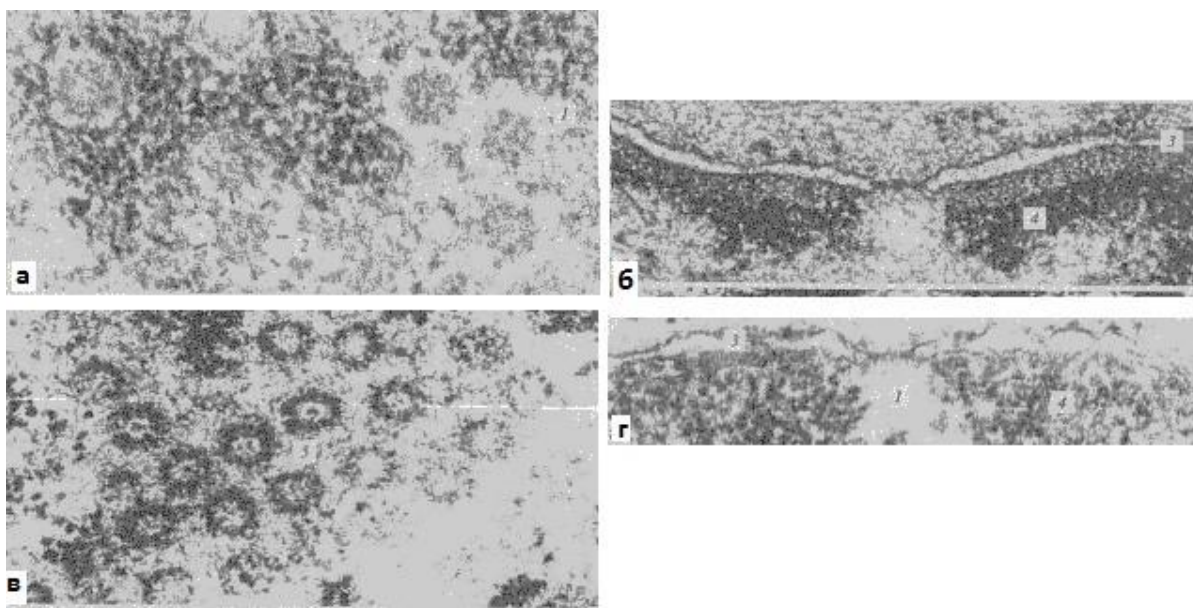


Рис. 20 Комплекси ядерних пор на ультратонких зрізах
 а , в – продольні; б, г – поперечні зрізи; 1 –ЯПК; 2 – вісім периферичних субодиниць (глобул), 3 – ядерна оболонка, 4 – хроматин; 5 – центральна гранула «транспортер»

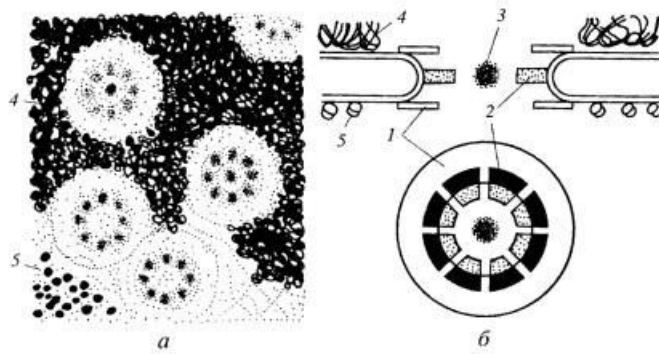


Рис. 21 Загальна схема будови ядерних пор

а – зовнішній вигляд ядерної пори в ядрі ооцитів ; б – схема будови ядерної пори;
1 – кільце; 2 – спиці; 3 – центральна гранула; 4 – хроматин; 5 – рибосоми

На виділених ж ЯПК в першу чергу видно кільчасті структури. Від периферичних компонентів ЯПК у бік цитоплазми простягаються фібрилярні вирости. З боку ядра фібрилярні вирости утворюють корзинкоподібну структуру, об'єднану термінальним кільцем. У більшості моделей центр циліндричної фігури ЯПК містить «корку» (центральну гранулу, або транспортер). За однією з моделей цитоплазматичні філаменти відходять від цитоплазматичного кільця, що складається з восьми субодиниць. Між ним і зовнішньою ядерною мембраною розташовується тонке кільце, а потім зірчасте кільце. Цитоплазматичне кільце пов'язане внутрішніми філаментами з транспортером, який знаходиться в центрі і заповнює простір між зовнішньою і внутрішньою ядерною мембраною. Схожа структура знаходиться на внутрішній мембрані: нуклеоплазматичне кільце підтримує філаменти «кошика». Інші варіанти моделей показані на рис. 22.

ЯПК закріплюється інтегральними протеїнами – глікопротеїдами gp 210 і POM 121 – у стінці мембранної перфорації. За складністю організації і, головне, за функційної значущості комплекс ядерної пори можна було б віднести до органел клітини, так як їх роль полягає в контролі за ядерно-цитоплазматичними зв'язками.

Розмір ядерних пор і їх структура стандартні не тільки для конкретної клітини, а й для всіх клітин організму, більше того – для всіх еукаріот. Число ядерних пор залежить від метаболічної активності клітин: чим вище синтетичні процеси в клітинах, тим більше пор на одиницю поверхні клітинного ядра. Кількість пор може змінюватися протягом клітинного циклу.

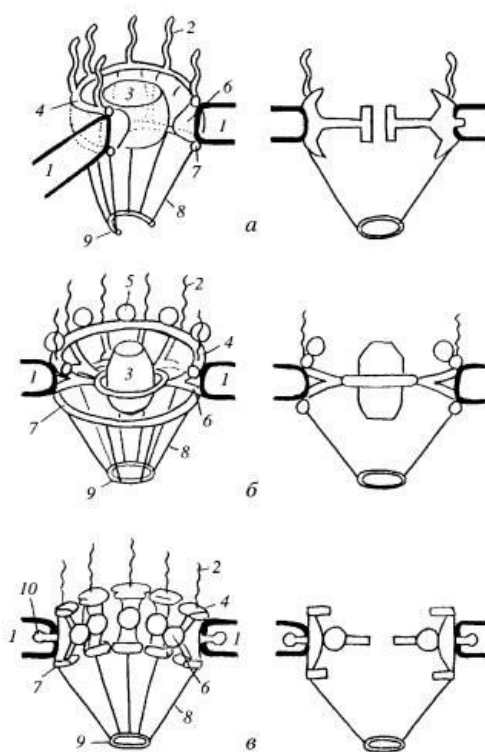


Рис. 22 Різні моделі будови комплексу ядерної пори

а – за Lodish і співавт. (2000), б – за Karp (1999); в – за Alberts і співавт. (1994). Зліва – тривимірні моделі, праворуч – пори в розрізі.

1 – ядерна оболонка; 2 – цитоплазматичні філаменти; 3 – центральна гранула «транспортер»; 4 – цитоплазматичне кільце; 5 – цитоплазматична субодиноця; 6 – спиця; 7 – ядерне кільце; 8 – фібрили кошики; 9 – термінальне кільце; 10 – аннулярні субодиноці (Губанова та Киселева, 2007).

По поверхні ядра пори розташовуються більш-менш рівномірно, але їх кількість різко падає в місцях асоціації з ядерною оболонкою ділянок гетерохроматина, ядерцевого організатора і теломерних ділянок.

Порові комплекси можуть зустрічатися і в інших мембранних компонентах клітини, але набагато рідше, ніж в ядерній оболонці. Іноді порові комплекси видно в складі мембран жорсткого ЕПР. Вони виявляються у складі вікончатих мембран цитоплазми, які тісно розташовані в пачки замкнутих пласких мембранних мішків, суцільно пронизаних поровими комплексами, що мають таку ж структуру, як і пори в ядерній оболонці (Adam, 2006).

3.3 Транспорт через ядерні пори

Після відкриття ядерної мембрани й опису її будови дійшли висновку, що ядерна оболонка може слугувати регулятором в ядерно-цитоплазматичному обміні, головна роль у цих процесах відводилася

ядерним порам. Обмін продуктами між ядром і цитоплазмою справді дуже великий: всі ядерні протеїни надходять з цитоплазми й всі форми РНК виводяться з ядер. І в цьому процесі комплекс пор виступає як супрамолекулярний комплекс, який виконує роль не тільки транслокатора – механізму перенесення, а й роль сортувальника, який розпізнає та вибірково переносить молекули (Сорокин, 2007).

У процесі ядерно-цитоплазматичного транспорту ядерні пори функціонують як молекулярне сито, пропускаючи частинки певного розміру пасивно, за градієнтом концентрації. Так, йони, цукри, нуклеотиди, АТФ і гормони вільно надходять до ядра. Водночас ядерні пори здійснюють вибіркового транспорту.

Транспорт через ядерні пори відбувається за рахунок спеціальних транспортних протеїнів – **каріоферинів**, які специфічно розпізнають і зв'язують молекули, та курсують між ядром та цитоплазмою, переносючи зв'язану молекулу в одному напрямку: із цитоплазми до ядра – імпортини, із ядра до цитоплазми – експортини. Щоб молекула пройшла через ядерну пору, вона повинна бути помічена спеціальною амінокислотою послідовністю, яка називається «сигнал ядерної локалізації». Протеїни каріоферини впізнають цю послідовність, підхоплюють помічений нею субстрат і переносять його до ядра. При проходженні через ядерну пору всі каріоферини зв'язуються з FG-нуклеопоринами, які вистилають внутрішню поверхню пори і мають FG-повтори (фенілаланін – F, гліцин G). Вважають, що саме цей механізм лежить в основі сучасної моделі ядерно-цитоплазматичного транспорту (Морозова, 2007).

3.4 Ядерні глікозаміноглікани

При вивченні ядерних протеогліканів клітин печінки мишей отримані дані, які показали, що в ядрах клітин печінки мишей ідентифіковані 2 різних класи глікозаміногліканів – гепарансульфат та дерматансульфат. У клітинних ядрах глікозаміноглікани представлені у формі протеогліканів. Склад ядерних протеогліканів гетерогенний і містить як прості протеоглікани (дерматансульфат протеоглікан), так і складні, на протеїновому корі яких є ланцюги гепарансульфата та дерматансуфата. Протеоглікани різних класів мають різну внутрішньоядерну локалізацію – дерматансульфат локалізований у хроматиновій фракції ядра, а гепарансульфат у фракції розчинних ядерних протеїнів. За умов злоякісної трансформації склад ядерних протеогліканів змінюється – відбувається збільшення відносного вмісту гепарансульфата, і в ядрах клітин гепатоми

з'являється хондроїтинсульфат, який відсутній в ядрах нормальних клітин. Дерматансульфат протеоглікан, що становить основну масу ядерних протеогліканів, виділяється у вигляді макромолекулярного агрегату з багатими олігорибонуклеотидами певної довжини (9-10 нуклеотидів) (Григорьева, 2006).

3.5 Ядро та проміжні філаменти

Однією з важливих функцій проміжних філаментів (ПФ) є локалізація ядер. Ядро в клітині має певне положення, яке обумовлено його взаємодією з різними компонентами цитоскелета. Структура оболонки ядра повинна відповідати двом критеріям, які пов'язані з розташуванням ядра в клітині: по-перше, повинні існувати протеїни, які б зв'язували цитоскелет з ядерним матриксом, тобто забезпечували зв'язок через дві мембрани і міжмембранним простором, і, по-друге, повинні існувати протеїни, які дозволяють відрізнити зовнішню оболонку ядра від ендоплазматичного ретикулуму. В еукаріотичних клітинах знайдені такі протеїни, вони утворюють дві родини KASH і SUN, які з'єднують зовнішню і внутрішню мембрану ядра і пов'язують цитоскелет і ядерні ламіни (Luxton, 2014). Протеїни SUN мають консервативний домен на С-кінці і, принаймні, один трансмембранний домен. Передбачається, що ці протеїни розташовуються на внутрішній мембрані ядра і взаємодіють своїм С-кінцем з протеїнами KASH, а їх N-кінець взаємодіє з ламінами і може слугувати лінкером для хромосом під час мейозу. Протеїни родини KASH мають кілька різних функцій. На С-кінці вони містять трансмембранний домен, який необхідний для локалізації в оболонці ядра; N-кінцевий домен цих протеїнів виходить назовні в цитоплазму і може взаємодіяти з актиновими філаментами, центросомами і ПФ. Роль ПФ у локалізації ядра вивчена поки що недостатньо. Швидше за все, вона полягає в утриманні ядра на місці і в залученні протеїнів, які могли б взаємодіяти з іншими компонентами цитоскелета.

Вплив цитоплазматичних проміжних філаментів на локалізацію і форму ядра досліджено на прикладі культивованих клітин, позбавлених віментину, – в таких клітинах спостерігалось заглиблення ядерної мембрани та інші порушення. В інших роботах показано, що в міоцитах, позбавлених десміна, ядра розташовуються нерівномірно і утворюють агрегати. Вражаючі результати нещодавно отримані на мишах, позбавлених десміна в результаті нокауту його гена. Якщо в нормальних клітинах скелетних м'язів сотні ядер розташовані рівномірно і окремо один від одного, то в

м'язах тварин, позбавлених десміна, ядра збиралися в щільні кластери. Крім того, вони мали овальну форму і не могли вишикуватися вздовж довгої осі клітин. Отже, встановлено, що С-кінцеві ділянки віментина і десмін здатні взаємодіяти з ламіном В, і таким чином ламін В заякорює ПФ на ядрі.

Такий же фенотип мали клітини з мутантним протеїном Syne-1, що свідчило про участь обох протеїнів у локалізації ядер у м'язових клітинах. Нещодавно виявлений протеїн неспрін-3 з родини KASH, який також, можливо, з'єднує зовнішню мембрану ядра і ПФ. Відомо, що цей протеїн локалізується на зовнішній ядерній мембрані і в міжмембранному просторі взаємодіє з протеїном SUN, локалізованим у внутрішній ядерній мембрані (Tapley, 2013). Крім того, він взаємодіє з плектином, який може бути пов'язаний з ПФ і актином. Оскільки неспрін-3 зв'язується з актинзв'язувальним доменом лектина, він забезпечує його взаємодію з ПФ. Отже неспрін-3 виконує важливу роль в організації архітектурного каркасу клітини (Минин та Молдавер, 2008).

3.6 Динаміка ядерної оболонки в мітозі

Під час мітоза комплекс ядерної пори з молекулярною масою 120 кДа розбирається на субкомплекси масою приблизно по 1 кДа. Розбирання пір починається з фосфорилування нуклеопоринвмісної cdc2/ціклін В-кінази.

Ядерна оболонка перетворюється на скупчення дрібних мембранних бульбашок, оточуючих зону колишнього інтерфазного ядра. Такі бульбашки морфологічно не можна відрізнити від інших дрібних вакуолей у цитоплазмі, вони, ймовірно, зливаються з вакуолями ендоплазматичного ретикулуму. У метафазі мембранні елементи цитоплазми відтісняються до периферичних зон клітин мікротрубочками веретена поділу.

Наприкінці анафази, коли припиняється рух хромосом до протилежних полюсів клітини, мембранні пухирці цитоплазми, в першу чергу мембрани шорсткого ЕПР, починають контактувати з поверхнею хромосом. Ці контакти відбуваються спочатку в невеликому числі точок, але потім починається перебудова і зростання цих первинних зачатків ядерної оболонки. Вони з дрібних бульбашок перетворюються на плоскі вакуолі, які ростуть в ширину і обволікають поверхню деконденсуючих хромосом. Ділянки таких зростаючих плоских мембранних мішків зливаються, замикаючи і відгороджуючи вміст нового інтерфазного ядра. Цікаво, що ядерні пори з'являються на найраніших етапах реконструкції

ядерної оболонки, коли подвійні мембранні цистерни ще зімкнулися і фактично нічого не поділяють.

При реконструкції ядерної оболонки відбувається збірка ядерних пор. Вона починається з утворення ямки при злитті зовнішньої і внутрішньої ядерних мембран, яка потім перетворюється на отвір. У цьому процесі беруть участь інтегральні протеїни gr 210 і POM 121, які згодом будуть закріплювати ЯПК на мембранах. Потім з'являються внутрішні структури ЯПК: комплекс кільця, спиць, додавання зірчастого кільця та інших структур і, нарешті, філаментів.

Для реконструкції ядерної оболонки необхідною умовою є деконденсація хромосом. Показано, якщо викликати передчасну деконденсацію метафазних хромосом, то вони дуже швидко контактують з мембранними бульбашками і кожна одягається своєю ядерною оболонкою, внаслідок чого в клітині виникає безліч так званих мікроядер, кожне з яких виникло з однієї хромосоми.

Фіброзний шар ламін деполімеризується паралельно розпаду ядерних мембран і конденсації хроматину. Цьому передують значне (в 7 разів вище, ніж в інтерфазі) фосфорилування ламінів. Ламіни А і С при цьому деполімеризуються до димерів і тетрамерів і, переходячи в розчинний стан, рівномірно розподіляються в цитоплазмі поза зв'язком з іншими структурами. Ламін В теж деполімеризується до олігомерів, але залишається пов'язаним з мембранними бульбашками, що виникли з ядерної оболонки.

При збірці ядерної оболонки в телофазі протеїни ламіни імунохімічно починають виявлятися в центромерних і теломерних ділянках хромосом. Там же виявляються перші ознаки утворення нової ядерної оболонки і накопичуються антитіла до протеїнів порового комплексу. У безклітинній системі цитоплазматичного екстракту ооцитів показано, що асоціація розчинних у мітозі ламін А і С відбувається незалежно від ламіна В. Виявилось, що якщо систему реконструкції ядерної оболонки позбавити ламіна В, то ламіни А і С зв'язуються з поверхнею хромосом, але збірки ядерної оболонки не відбувається. В екстракті, позбавленому ламінів А і С, ламін В зв'язується з хромосомами, але нормальна ядерна оболонка також не формується (Курчашова, 2008).

Зміни порового комплексу в результаті злоякісної трансформації клітини призводять до порушення експресії генів та генетичної нестабільності, так і, ймовірно, до порушення здатності регуляції активного переносу протеїніназ з цитоплазми в ядро, що викликають фосфорилування внутрішньоклітинних структур, і подальший поділ

клітини. Зокрема, мова йде про специфічну серин/треонін-протеїнкіназу яка носить назву фактор дозрівання (MPF, від англ. maturation promoting factor), яка каталізує фосфорилування протеїнів, що беруть участь у мітозі, наприклад, гістона H1, протеїна, що входить до складу хроматина або ламіни – компоненти цитоскелета, що входить до складу ядерної мембрани. Патологічна зміна порового комплексу призводить також і до порушення формування цитоскелета клітини.

Таким чином, якщо раніше визначенням ракової трансформації був термін «безмежне нерегульоване клітинне розмноження», то зараз найбільш вживаним терміном є «дезорганізація функцій клітини». У зв'язку з цим актуальною є постановка питання про ті ключові клітинні структури, які відіграють провідну роль в організації цих функцій. Клітинною органелою, що відповідає за таку організацію, є поровий комплекс ядерної мембрани.

Adam, S.A. (2006). The nuclear pore complex. *Genome biology*, 2(9), reviews 0007.1-007.6

Berk, J.M., Tifft, K.E. & Wilson, K.L. (2013). The nuclear envelope LEM-domain protein emerlin. *Nucleus*, 4(4), 298–314.

Barton, L.J., Soshnev, A.A. & Geyer, P.K. (2015). Networking in the nucleus: a spotlight on LEM-domain proteins. *Curr Opin Cell Biol*, 34, 1–8.

Burke, B. & Stewart, C.L. (2013). The nuclear lamins: flexibility in function. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14, 13–24.

de Leeuw, R., Gruenbaum, Y. & Medalia, O. (2018). Nuclear Lamins: Thin Filaments with Major Functions. *Trends Cell Biol*, 28(1), 34–45.

Gruenbaum, Y. & Foisner, R. (2015). Lamins: nuclear intermediate filament proteins with fundamental functions in nucleomechanics and genome regulation. *Annu Rev Biochem*, 84, 131–64.

Hutten, S. & Kehlenbach, R.H. (2006). How to build a yeast nucleus. *Mol. Cell Biol.*, 26, 6772–6785.

Köhler, A. & Hurt, E. (2010). Gene regulation by nucleoporins and links to cancer molecular (review). *Cell*. 38, 9–11.

Fong, L. G., Ng, J. K., Lammerding, J., Vickers, T. A., Meta, M., Coté, N., Gavino, B., Qiao, X., Chang, S. Y., Young, S. R., Yang, S. H., Stewart, C. L., Lee, R. T., Bennett, C. F., Bergo, M. O., Stephen, G. & Young G.S. (2006). Prelamin A and lamin A appear to be dispensable in the nuclear lamina. *The Journal of clinical investigation*, 116(3), 743–752.

Luxton, G.W. & Starr, D.A. (2014). KASHing up with the nucleus: novel functional roles of KASH proteins at the cytoplasmic surface of the nucleus. *Curr Opin Cell Biol*, 28, 69–75.

Naetar, N., Ferraioli, S. & Foisner, R. (2017). Lamins in the nuclear interior - life outside the lamina. *J Cell Sci*, 130(13), 2087–2096.

Prokocimer, M., Davidovich, M., Nissim-Rafinia M., Wiesel-Motiuk, N., Bar, D.Z., Barkan, R., Meshorer, E. & Gruenbaum Y. (2009). Nuclear lamins: key regulators of nuclear structure and activities. *J Cell Mol Med*, 13(6), 1059–1085.

Rout, M.P. (2000). The yeast nuclear pore complex: Composition, architecture, and transport mechanism. *J. Cell Biol*, 148(4), 635–651.

Shimojima, M., Yuasa, S., Motoda, C., Yozu, G., Nagai, T., Ito, S., Lachmann, M., Kashimura, S., Takei, M., Kusumoto, D., Kunitomi, A., Hayashiji, N., Seki, T., Tohyama, S., Hashimoto, H., Kodaira, M., Egashira, T., Hayashi, K., Nakanishi, C., Sakata, K., Yamagishi, M. & Fukuda, K. (2017). Emerin plays a crucial role in nuclear invagination and in the nuclear calcium transient. *Sci Rep*, 7, 44312. doi: 10.1038/srep44312.

Strelkov, S.V. & Aebi, U. (2007). Intermediate filament, from cell architecture to nanomechanics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8, 562–573.

Tapley, E.C. & Starr, D.A. (2013). Connecting the nucleus to the cytoskeleton by SUN-KASH bridges across the nuclear envelope. *Curr Opin Cell Biol*, 25(1), 57–62.

Turgay, Y., Eibauer, M., Goldman, A.E., Shimi, T., Khayat, M., Ben-Harush, K., Dubrovsky-Gaup, A., Sapra, K.T., Goldman, R.D., Medalia, O. (2017). The molecular architecture of lamins in somatic cells. *Nature.*, 543(7644), 261–264.

von Appen, A. & Beck, M. (2016). Structure Determination of the Nuclear Pore Complex with Three-Dimensional Cryo electron Microscopy. *J Mol Biol*, 22(428), 2001–2010.

Webster, M., Witkin, K.L. & Orna Cohen-Fix, O. (2009). Sizing up the nucleus: nuclear shape, size and nuclear-envelope assembly. *Journal of Cell Science*, 122, 1477–1486.

Worman, H.J., Ostlund, C. & Wang, Y. (2010). Diseases of the nuclear envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2:a000760.

Минин, А.А., Молдавер, М.В. (2008) Виментиновые промежуточные филаменты и их роль во внутриклеточном распределении органел. *Успехи биологической химии*, 48, 221–252.

Григорьева, Э.В. (2006). Изучение ядерных протеогликанов клеток печени мышей, автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. биол. Наук (03.00.25); Институт цитологии и генетики СОРАН. - Новосибирск, 26 с.

Губанова, Н.В., Киселева, Е.В. (2007). Структурная организация, функция и динамика ядерных пор. *Цитология*, 49(4), 17–25.

Курчашова, С.Ю. (2008). Иммунохимическое исследование белков, ассоциированных с ядерной оболочкой, в интерфазе и митозе, автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. хим. Наук (03.00.25) / Светлана Юрьевна Курчашова; Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова.- Москва, 29 с.

Морозова, К.Н., Губанова, Е.В., Киселева, Е.В. (2007). Структурная организация и возможная функциональная роль пористых пластинок, содержащих цитоплазматические поры. *Цитология*, 47 (8), 667–678.

Сорокин, А.В., Ким, Е.Р. (2007). Ядерно-цитоплазматический транспорт. *Успехи биологической химии*, 47, 98–128.

Розділ 4. МІЖКЛІТИННІ ВЗАЄМОДІЇ ЗА ПАТОЛОГІЇ

4.1 Міжклітинні взаємодії в міокарді

Передача імпульсу для скорочення від клітин вузлової частини провідної системи серця до найвіддаленіших скоротливих кардіоміоцитів забезпечується особливою системою спеціалізованих міжклітинних контактів у складі провідних кардіоміоцитів, формування якої починається на ранніх етапах кардіогенезу і не завершується до народження. Диференціювання провідних кардіоміоцитів, яке супроводжується паралельним утворенням між ними різного типу контактів, відбувається під дією генетичних факторів і має чітку залежність від мікрорегіональних умов, що, відповідно, впливає і на швидкість «дозрівання» контактів (Bruneau, 2013).

Контакти утворені протеїнами і забезпечують безпосередній зв'язок між клітинами. Міжклітинні контакти виникають у місцях зіткнення клітин у тканинах і служать для міжклітинного транспорту речовин і передачі сигналів (міжклітинної взаємодії), а також для механічного скріплення клітин між собою.

Структурна цілісність серця є необхідною умовою для його нормального функціонування, забезпечується інтеркальованими дисками (ІД). Клітини часто розгалужені, і тісно пов'язані спеціалізованими переходами. Область, де кінці клітин з'єднані з іншою клітиною, називається інтеркальованим диском (рис. 23).

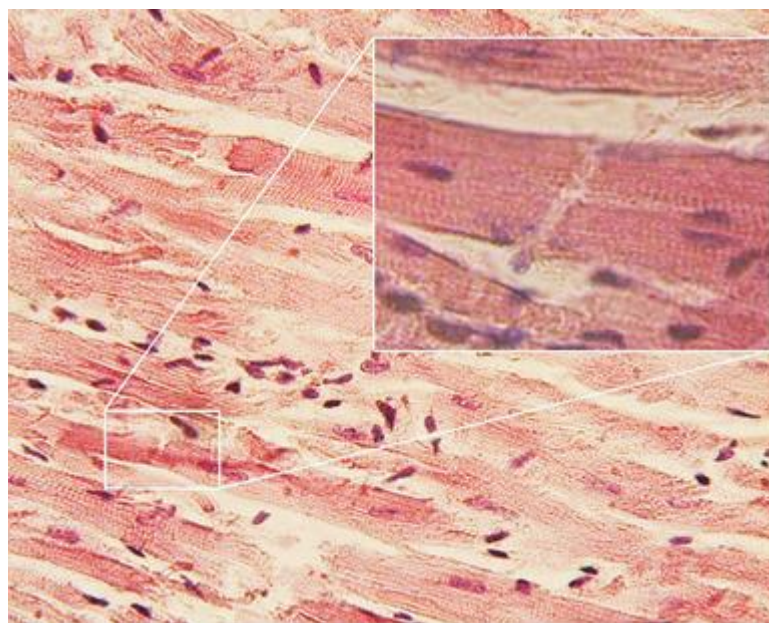


Рис. 23 Інтеркальований диск міокарда
(https://en.wikipedia.org/wiki/Intercalated_disc)

Область між вставним диском і саркомерним цитоскелетом є нещодавно визначеною і називається перехідним контактом. Ця область багата структурними протеїнами, в тому числі спектрином, анкірином-G, α -актином і NH_2 -кінцевою областю тайтина, який зазвичай локалізується в Z-дисківі (Vermij, 2017). Високий ступінь складності і організацій контактів ІД передбачає тісний взаємозв'язок між механічною і електричною діяльністю. Руйнування механічної або електричної взаємодії призводить до неправильної провідності електричних імпульсів і погіршення серцевої функції, що в подальшому призводить до розвитку порушень серцевого ритму (Vite, 2014).

ІД містять три головні зв'язувальні комплекси: адгеринові контакти (АК), щілинні контакти (гар-контакти) та десмосоми.

Щілинний контакт складається з дванадцяти протеїнів – коннексинів, найбільш поширеним у серцевому м'язі ссавців є коннексин-43, у меншій кількості містяться коннексин-45 і -40 (Leybaert, 2017). Кожен кардіоміоцит має шість мономерів коннексина, що утворюють канал або коннексон. За допомогою цього зв'язку передаються електричні сигнали і малі сигнальні молекули з сусідніх кардіоміоцитів. Ці канали відповідають за виникнення синхронних скорочень серця. Отже, за відсутності коннексинових каналів нормальне стиснення серця порушується і розвиваються летальні аритмії (Sheikh, 2009).

Адгезивні контакти (АК) полегшують передачу скорочувальної сили від однієї клітини до інших і мають вирішальне значення в підтримці механічної міцності. Вони в основному складаються з трансмембранних кадгеринів і цитозольних катенінів. АК забезпечують сильну міжклітинну адгезію і формуються протеїнами кадгерино-катенінового комплексу.

Адгезивні контакти часто чергуються зі щілинними контактами вздовж сарколеми на ІД, і, як правило, орієнтовані перпендикулярно поздовжній осі кардіоміоцитів, оптимізуючи передачу механічної сили.

Десмосоми забезпечують структурну підтримку за допомогою взаємодії десмосомальних кадгеринів із системою філаментів. Усі ці з'єднувальні комплекси повинні бути правильно організовані у структурі інтеркалярних дисків для того, щоб підтримувати нормальний механічний та електричний зв'язок між кардіоміоцитами (Півень, 2010).

Десмосоми забезпечують структурну підтримку кардіоміоцитів, які піддаються сильному стресовому скороченню. Десмосоми, подібно адгезивним контактам, складаються з міжклітинних і внутрішньоклітинних компонентів. Міжклітинний компонент складається з десмосомальних кадгеринів – десмоколіна і десмоглеїна, які утворюють гетероциклічний

комплекс у межах позаклітинного простору, який з'єднує дві суміжні клітини, тоді як внутрішньоклітинний компонент складається з протеїнів сімейства катенінів (плакоглобін і плакофілін) і плакінів (десмоплакін). Десмоплакін безпосередньо взаємодіє з проміжними філаментами для стабілізації структури десмосом. Важливо відзначити, що висока частота мутацій у генах, що кодують десмосомні протеїни, пов'язана з розвитком аритмогенної кардіоміопатії правого шлуночка (ARVC) (Heuser, 2006).

Найважливішим і найпоширенішим типом міжклітинної адгезії є адгезія, що обумовлена членами родини Ca^{2+} -залежних протеїнів, кадгеринів. Більшість видів клітин експресують декілька типів кадгеринів; зокрема, скелетні м'язи експресують R-, M- та N-кадгерини. На противагу скелетним, у серцевому м'язі експресується лише один класичний кадгерин – N-кадгерин. N-кадгерин експресується на високому рівні як в ембріональному, так і в дорослому міокарді, де він локалізується в ІД та в місцях тісного контакту сусідніх кардіоміоцитів.

У тканині міокарда N-кадгерин не лише виконує важливу функцію у формуванні ІД, а й бере участь у стабілізації та функціонуванні порових контактів. Так, з використанням культивованих кардіоміоцитів щурів показано, що N-кадгерин концентрується в ділянках міжклітинного контакту ще до того, як там з'являється коннексин. Це підтверджує гіпотезу, що N-кадгерин необхідний і для формування порових контактів (Mu, 2015).

Як відомо, для кадгеринів характерний гомофільний тип взаємодії: кадгерини своїм екстрацелюлярним доменом взаємодіють з іншими кадгеринами того ж типу, нагадуючи блискавку. Внутрішньоклітинний домен класичних кадгеринів має сайти зв'язування з катенінами, які забезпечують зв'язок кадгеринів та актинового цитоскелета клітини. Таким чином і відбувається ефективна комунікація між кардіоміоцитами.

Родина катенінів включає α E-катенін та α T-катенін, один β -катенін, плакоглобін та нещодавно описаний протеїн, асоційований з класичним кадгерино-катеніновим комплексом – p120ctn (Oas, 2013).

Детальні біохімічні дослідження класичного кадгерино-катенінового білкового комплексу показали, що такий комплекс має чіткий порядок організації. З'ясовано, що α -катенін завжди локалізується на периферії кожного кадгерино-катенінового комплексу і виконує «коннекторну» роль – сполучення кадгерино-катенінового комплексу з актином безпосередньо або опосередковано через зв'язок з α -актиніном.

Кадгерин у своїй структурі також має спільний зв'язувальний сайт для β -катеніна або плакоглобіна, які у свою чергу зв'язуються з α -катеніном. Таким чином, два незалежних класичних кадгерино-

катенінових комплекси в одній і тій же клітині можуть містити у своєму складі один β -катенін або один плакоглобін. Варто також зауважити, що плакоглобін вперше виділений та описаний як головний компонент десмосом, а проведений біохімічний аналіз показав високу спорідненість плакоглобіна з β -катеніном, що пояснює здатність плакоглобіна функційно компенсувати останній при утворенні адгезивного контакту (Piven, 2017).

Тож, класичний кадгеріно-катеніновий комплекс має чітку структуру та організацію, що і забезпечує утворення і функціонування АК як у тканині міокарда, так і в інших тканинах організму.

Компоненти кадгеріно-катенінового комплексу, окрім структурної функції у стабілізації та організації міжклітинної адгезії, залучені і до кількох основних сигнальних механізмів клітини. Перш за все, це β -катенін, що відіграє ключову роль у канонічному Wnt сигналінгу, а саме, виступає у ролі кофактора транскрипції (Lorenzon, 2017; Majidinia, 2018). Окрім того, відомо, що кадгеріно-катеніновий комплекс бере участь у регуляції активності тирозинової кінази (ТК), що має важливе значення для розвитку багатоклітинних організмів. Показано, що E-кадгерин інгібує ТК сигналінг, а формування АК може викликати тимчасову його активацію. Альфа-катенін та p120 беруть участь у контролюванні ядерного фактора κ B сигнального шляху, який, у свою чергу, має важливе значення у клітинному стресі та виживанні, а також досить часто гіперактивується при канцерогенезі.

Нещодавні дослідження показали також, що α -катенін є негативним регулятором Hedgehog сигнального шляху, який відіграє важливу роль у регуляції ембріонального розвитку хребетних.

Структурна й сигнально-регуляторна роль протеїнів кадгеріно-катенінового комплексу свідчать про те, що вони мають важливе значення не лише для підтримання архітектури та гомеостазу тканини, а й ключове значення у формуванні та розвитку ембріонального серця. З розвитком нокаутних та трансгенних технологій створено експериментальні моделі мишей, які дозволяють вивчати функцію окремих генів у розвитку та гомеостазі тієї чи іншої структури. Використовуючи таких тварин, досліджено значення протеїнів кадгеріно-катенінового комплексу в ембріогенезі ссавців.

З використанням нокаутних тварин досліджена і функція окремих протеїнів – компонентів інтеркальованих дисків у функціонуванні дорослого серця ссавців (табл. 8).

Індуковані порушення структури інтеркальованих дисків, що призводять до розвитку патологій функції міокарда (Півень, 2010)

Генетична мутація	Тип успадкування / модель	Фенотип захворювання
Дефекти АК		
N-кадгерин	Тканино-специфічна делеція гена	Спонтанна тахікардія шлуночка, уповільнення провідної функції, РСС, провокує розвиток кардіоміопатії обох шлуночків
N-кадгерин	Гетерозиготні нокаутні миші	Порушення організації порових з'єднань (зменшення експресії коннексина 43), підвищений ризик розвитку серцевої аритмії
α E-катенін	Тканино-специфічна делеція гена	Кардіоміопатія, смертність внаслідок серцевого стресу
β -катенін	Тканино-специфічна делеція гена	Підвищення експресії плакоглобіна у тканині серця, гіпертрофія
Плакоглобін	Гетерозиготні нокаутні миші	Схильність до розвитку АКМПШ ПШ внаслідок фізичних навантажень, але без фіброзу тканини серця та порушень експресії коннексина 43
Вінкулін/ метавінкулін (Arg975Trp; Leu954del; Ala934Val)	Гетерозиготні нокаутні миші	Підвищена смертність та кардіальна дисфункція
Вінкулін	Тканино-специфічна делеція гена	Раптова смерть внаслідок тахікардії, розвиток дилатаційної кардіоміопатії, порушення структури ІД
Дефекти десмосом		
Плакоглобін	Гетерозиготні нокаутні миші	Схильність до розвитку АКМП ПШ внаслідок фізичних навантажень, але без фіброзу тканини серця та порушень експресії коннексина 43
Дефекти порових з'єднань		
Коннексин 40	Делеція у гермінативних клітинах	Блокування атріовентрикулярної функції, індукована тахіаритмія передсердь

Коннексин 43	Тканино-специфічна делеція гена	Спонтанна тахікардія шлуночка, уповільнення провідної функції, РСС
Коннексин 43 (Gly60Ser)	Аутосомний домінантний	Кардіальна дисфункція, блокування атріовентрикулярної функції, брадикардія

Примітка. АКМП ПШ – аритмогенна кардіоміопатія правого шлуночка; РСС – раптова серцева смерть.

Оскільки порушення адгезивних контактів у ранньому ембріогенезі мають летальні наслідки, то дослідження ролі протеїнів кадгеріно-катенінового комплексу в кардіогенезі можливе лише за умови їх делеції не у зиготі, а виключно у тканині ембріонального серця. Тобто вже після диференціювання стовбурових клітин у клітини-попередники кардіоміоцитів та після закладки первинної і вторинної ділянки серця. Саме на прикладі використання такої експериментальної моделі показано, що N-кадгерин має принципове значення у кардіогенезі ссавців, делеція цього протеїна, на відміну від його цитоплазматичних партнерів, спричиняє порушення формування ембріонального серця та ембріональну смертність.

Показано, що делеція N-кадгерина у дорослому серці призводить до яскраво вираженої тахікардії шлуночка, внаслідок якої спостерігали смерть дослідних мишей протягом 2 місяців. Як виявилось, втрата N-кадгерина в міокарді дорослих мишей призводила до повної дисоціації структурних компонентів ІД–АК, десмосом та порових контактів, які в нормі забезпечують міжклітинну взаємодію. Спостерігали фіброз тканини серця мутантних тварин та підвищення кількості багатоядерних кардіоміоцитів. Окрім того, делеція N-кадгерина в серці мишей супроводжувалася суттєвим зменшенням рівня експресії коннексина 43, основного протеїна порових контактів міокарда, що і спричиняло порушення системи генерації та підтримання електричного імпульсу. Таким чином, запропоновано новий механізм розвитку серцевої аритмії, який є наслідком втрати N-кадгерина у тканині серця.

Зв'язок між N-кадгерином та коннексином 43 показано і у дослідженнях гетерозиготних за делецією N-кадгерина у тканині серця мишей. Не лише повна відсутність кадгерина, а й його дефіцит у тканині міокарда призводить до порушення генерації та передачі електричного імпульсу внаслідок зниження експресії коннексина 43. У таких тварин спостерігали розвиток спонтанної серцевої аритмії. Отримані дані доводять

важливе значення N-кадгерина для підтримки та забезпечення нормальної функції дорослого серця і підтверджують попереднє припущення авторів, що порушення організації кадгеринового комплексу у тканині дорослого серця внаслідок дефіциту або повної відсутності N-кадгерина може бути механізмом розвитку серцевої аритмії (табл. 9).

Таблиця 9

Мутації, що призводять до порушень структури інтеркальованих дисків і пов'язані з серцевою аритмією у людей (Півень, 2010)

Генетична мутація	Тип успадкування	Фенотип
Дефекти АК		
Плакоглобін (2157del2TG)	Аутосомний рецесивний	АКМП ПШ (аритмія, РСС, фіброз тканини міокарда, серцева недостатність), синдром Naхos (підвищене оволосіння, кератодермія)
Вінкулін/ метавінкулін (Arg975Trp; Leu954del; Ala934Val)	Аутосомний домінантний	Дилатаційна та гіпертрофічна кардіоміопатія, прогресуюча серцева недостатність
Дефекти десмосом		
Плакоглобін (2157del2TG)	Аутосомний рецесивний	АКМП ПШ (аритмія, РСС, фіброз тканини міокарда, серцева недостатність), синдром Naхos (підвищене оволосіння, кератодермія)
Десмоплакін (Ser229Arg)	Аутосомний домінантний	АКМП ПШ
Десмоплакін (2034insA)	Аутосомний домінантний	Лівостороння АКМП ПШ, захворювання шкіри
Десмоплакін (7901del1G)	Аутосомний рецесивний	Синдром Carvajal (кардіоміопатія лівого шлуночка, підвищене оволосіння, кератодермія)
Десмоплакін (Gly2375Arg)	Аутосомний рецесивний	АКМП ПШ, підвищене оволосіння
Плакофілін 2	Аутосомний рецесивний	АКМП ПШ
Дефекти порових з'єднань		
Коннексин 40 (-44G→A; +71A→G)	Аутосомний рецесивний	Асистолія передсердь

Правильна організація адгезивних контактів є необхідною для підтримання функції дорослого серця. Ймовірно, мутації, що спричиняють порушення міжклітинної адгезії та ефективної комунікації між кардіоміоцитами, можуть бути однією з причин виникнення аритмій, кардіоміопатій та інших розладів функції міокарда і у людини. Деякі молекулярно-генетичні та імуногістохімічні дослідження зразків тканини міокарда хворих людей підтверджують зв'язок між мутаціями генів ІД та порушеннями роботи серця у людини.

Аритмогенна кардіоміопатія шлуночка входить до сімейства захворювань, викликаних мутаціями протеїнів, котрі формують десмосоми та ІД міжклітинної адгезії кардіоміоцитів. Це захворювання характеризується ранніми проявами шлуночкової аритмії, котрі виникають до з'явлення порушень функцій серця.

Виявлено, що імунний сигнал плакоглобіна (γ -катеніна) ІД міокарда зменшується при АКМШ. Така ж тенденція зменшення плакоглобіна спостерігалася при хибно позитивному випадку АКМШ, але справжньою причиною захворювання був кардіосаркоїдоз, руйнівна форма грануломатозного міокардита, що також пов'язано з аритмією. І дійсно, клінічні симптоми у більшості дублюють один одного.

Вчені досліджували втрату плакоглобіна при грануломатозному міокардиті, і дійсно спостерігали значні втрати цього адгезивного протеїна у складі десмосом. Запропоновано, що у вищеперерахованих процесах грають не останню роль цитокіни, котрі беруть участь у грануломатозному міокардиті і таким чином призводять до швидкої втрати плакоглобіна в міжклітинних контактах.

Отже, кардіоміоцити з'єднуються між собою за допомогою так званих вставних дисків, які на гістологічних препаратах мають вигляд темних смужок і розташовані поперек волокна. У поперечних ділянках вставного диска є міжклітинні контакти трьох типів: щілинні (нексуси), адгезивні контакти і десмосоми. Відмінною особливістю провідної системи серця є наявність в її клітинах великої кількості нексусів. Ці контакти є місцем переходу збудження з однієї клітини на іншу. Такі ж контакти є і між клітинами провідної системи і робочого міокарда. Завдяки наявності контактів міокард, що складається з окремих клітин, працює як єдине ціле.

Протеоглікани відіграють також активну роль у регулюванні диференціації міофібробластів і тим самим фіброзу міокарда у відповідь на механічне напруження. Перевантаження артеріальним тиском викликає ремоделювання міокарда, що в кінцевому підсумку призводить до серцевої

недостатності. Пропонують, що протеоглікани, які розташовані в екстрацелюлярному матриксі (ЕЦМ-локалізовані) і в плазматичній мембрані (мембранно-зв'язані) активно регулюють фіброз міокарда, викликаючи диференціювання міофібробластів і продукцію компонентів ЕЦМ у відповідь на механічний стрес (рис. 24).

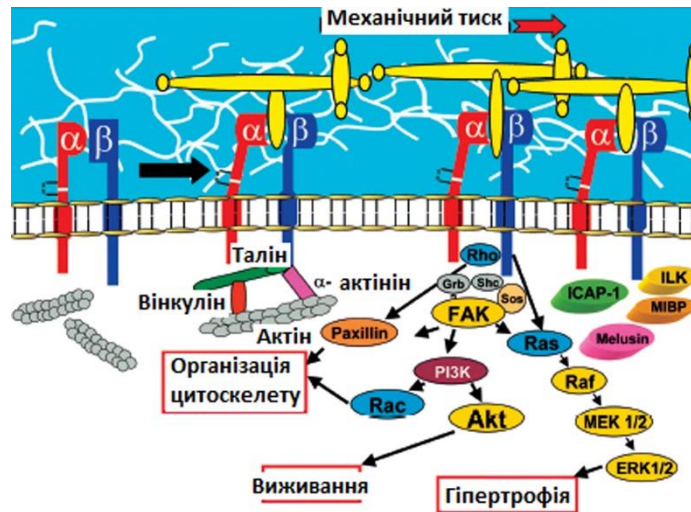


Рис. 24 Схема впливу механічного тиску на міжклітинні контакти у серці

Існування великої кількості міжклітинних контактів збільшує надійність проведення збудження в міокарді. Порушення стану міжклітинних контактів призводить до патологій в серці.

4.2 Зміна міжклітинних контактів у периферичній нервовій системі

Доля будь-якої клітини організму залежить від сигналів, що надходять до неї ззовні. Вони регулюють процеси, що визначають виживання клітин, їх здатність до поділу та диференціювання, функційну активність або загибель останніх.

Під впливом зовнішніх сигналів відбуваються різні біохімічні перетворення всередині клітин, змінюється рівень експресії генів, спостерігаються перебудови цитоскелета – клітина реагує на подразнення.

Найважливішим етапом міжклітинної комунікації є передача сигналу від клітини до клітини. Для її успішного здійснення необхідно, як мінімум, два елементи: клітина, що генерує сигнал, і клітина здатна до сприйняття цього сигналу.

Нервова система складається з сотень мільярдів нейронів, з'єднаних у функційні нейронні мережі, що лежать в основі функційної спроможності ПНС та ЦНС (Jiao, 2017).

Пропускна здатність нейронів для іннервації і функціонування всередині мережі опосередкована через спеціалізовані клітинні контакти, відомі як синапси.

Синапси – макромолекулярні структури, які регулюють міжклітинні зв'язки в нервовій системі і є основними зберігачами інформації всередині нейронних мереж.

Таким чином, наші знання про формування синапсів має велике значення для розуміння організації нервової системи, а також для розуміння процесів, що відбуваються при неврологічних розладах.

Поняття синапс запропоновано понад сто років тому Шеррінгтоном. Синапс – це з'єднувальна зона між нейронами, та між нейронами й ефекторними клітинами. У той час здатність світлового мікроскопа була надто обмежена, тому структура нервового контакту залишалася спірним питанням. За «ретикулярної» теорії нервова система розглядалася як єдине ціле, що складається з клітин, об'єднаних анастомозами або дифузними каналами нервових волокон. Навпаки, «нейронна» теорія припускала, що сукупність нейронів з'єднані між собою специфічними контактами. Більше того, протягом десятирічч залишалося неможливим відповісти на альтернативні пропозиції Реймонда в 1848 році, згідно з якими шлях передачі нервових імпульсів був або електричним, або хімічним. Тим не менше, ряд досліджень призвели до припущення, що сигналізація відбувається за допомогою випуску хімічної речовини з пресинаптичної мембрани нейронів до рецепторів постсинаптичної мембрани клітини.

Вирішальний прорив зроблений у 1921 році в дослідах Леві, який продемонстрував хімічну природу нервової передачі. Леві стимулював блукаючий нерв ізольованого серця жаби і спостерігав, що серце б'ється. Він зібрав фізіологічний розчин, що виходить із серця та ввів до другого ізольованого серця. Друге серце перестало битися без попередньої стимуляції блукаючого нерву. Леві дійшов висновку, що речовина, яка вивільнена з кінцевої частини блукаючого нерву, діяла на м'язову тканину серця. Так ацетилхолін (АХ) був ідентифікований як хімічна речовина, що діяла в експериментах Леві. Ацетилхолін також визнаний як медіатор постгангліонарних парасимпатичних волокон, прегангліонарних вегетативних волокон, кінців рухового нерву і деяких шляхів центральної нервової системи. Тоді АХ розглядався як один з двох класичних

нейромедіаторів (інша речовина – норадреналін) периферичної нервової системи хребетних.

Поняття синапс отримав чітке морфологічне визначення в роботах Коутекса (1947) на нервово-м'язових синапсах. Структура синапса остаточно з'ясована завдяки першим зображенням нервового контакту, отриманих методом електронної мікроскопії, між 1954 і 1956 рр. Ці зображення показали наявність синаптичного простору між пре- і постсинаптичною мембранами клітин. У синаптичній області бульбашки від 30 до 50 нм в діаметрі регулярно спостерігалися в нервових закінченнях біля цитоплазматичної мембрани пресинаптичного нейрона. Ці синаптичні пухирці послужили морфологічною основою для вивільнення нейротрансмітерів з нервових закінчень, виявлені електрофізіологічною реєстрацією. Таким чином, синаптичні везикули розглядалися в якості місця зберігання та звільнення нейромедіаторів. Ці спостереження довели, що нервова система складалася з клітин, відокремлених один від одного синаптичним позаклітинним простором, в якому, відповідно з експериментами Леві, хімічний передавач вивільнявся з нервових закінчень.

Іннервація скелетних м'язів – багатоступінчастий процес, що веде до формування нервово-м'язового контакту (НМС). Молекулярний механізм організації та функціонування синапсів є дуже складним. Нервово-м'язові контакти збираються на м'язових волокнах формуючи так звані кінцеві пластини. Ацетилхолінові рецептори (АХР) на кінцевій пластині потрібні для точної синаптичної передачі (Molgó, 2009).

Іннервація рухового нейрона (мотонейрона) є найбільш значущою подією в розвитку скелетних м'язів, русі, а також диханні. Іннервація має на увазі складні взаємодії між аксонами мотонейронів і кінцевими пластинами на м'язових волокнах, що призводить до розвитку високоспеціалізованих синапсів, які називаються нервово-м'язові синапси. Після того, як потенціал дії досягає аксонів, він викликає відкриття Ca^{2+} -каналів пресинаптичної мембрани нерву. Приплив Ca^{2+} дозволяє звільнити нейротрансмітер ацетилхолін у синаптичну щілину. АХ розсіюється і зв'язується з ацетилхоліновими рецепторами, локалізованими на постсинаптичній мембрані м'язового волокна. Цей зв'язок дозволяє ацетилхоліновим рецепторам бути проникними для Na^+ і K^+ , відкриваються відповідні закриті Na^+ -канали на мембрані міоцита, яка, у свою чергу, ініціює потенціал дії за рахунок Ca^{2+} . Ацетилхолінестерази, які розташовані на синаптичній частини базальної мембрани, що охоплює м'язове волокно, швидко інактивують АХ, вивільнений з пресинаптичної мембрани, щоб концентрація ацетилхоліна в синаптичній щілині зменшувалася швидко і

нейротрансмісія зупинялася. Правильна нервово-м'язова передача імпульсів вимагає складну мережу взаємодіючих сигнальних шляхів для забезпечення просторової і часової точності процесу.

Рухові нервові закінчення в гладкій м'язовій тканині побудовані простіше – безмієлінові пучки аксонів проникають між гліоцитами до пласту гладких м'язів і утворюють булавоподібні розширення, які містять холінергічні і адренергічні бульбашки.

Дефекти сигнальних шляхів, які регулюють диференціювання і функціонування НМС, можуть призвести до цілого ряду вроджених нервово-м'язових розладів – вроджені міастенічні синдроми, для яких характерні м'язова слабкість і втома. Втрата нервових сигналів, викликана дегенерацією рухових нейронів, призводить до виснажливої втрати м'язової маси, атрофії і паралічу. Тому розуміння молекулярних основ функціонування нервово-м'язового синапса є основою терапевтичного підходу до таких розладів (Ferraro, 2012).

Одна з основних цілей у галузі неврології є розуміння організаційних принципів, що лежать в основі клітинного зв'язку, і подальша інтеграція молекул, що призводить до функціонування нервової системи. Ряд досліджень виявили молекули, які полегшують синаптичну передачу, а також відповідальні за пре- і постсинаптичну спеціалізацію. Молекули клітинної адгезії відіграють важливу роль у створенні НМС. Нейрональні молекули клітинної адгезії (НМКА) беруть участь у кожній стадії розвитку, які ведуть до формування функційних нервово-м'язових синапсів (рис. 25).

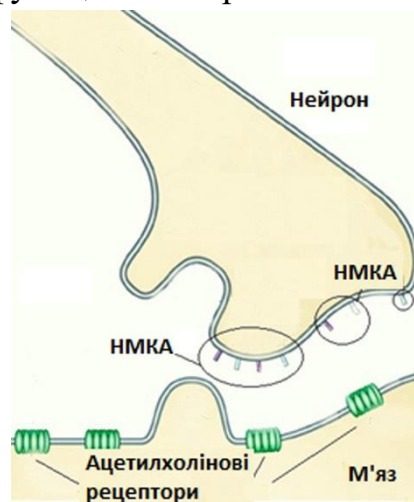


Рис. 25 Участь нейрональних молекул клітинної адгезії у формуванні синапса

Структурою, яка відіграє ключову роль в регенерації нервово-м'язових синапсів, є синаптична базальна мембрана, яка знаходиться між нервовим закінченням і м'язовою мембраною. Синаптична базальна

мембрана є інтенсивно забарвлюючою позаклітинною речовиною, що складається з протеогліканів і глікопротеїнів. Проведено серію досліджень, вивчаючи роль синаптичної базальної мембрани в диференціюванні нерву й м'яза. Успіх цих робіт базувався на використанні дуже зручної експериментальної моделі тонкого шкірно-грудного м'яза жаби, в якій положення кінцевих пластинок легко помітне в живому м'язі. На першому етапі клітини в певній ділянці м'яза локально руйнували або перерізанням нерву і м'язових волокон, або повторним накладанням металевої пластини, охолодженої рідким азотом. Протягом декількох днів частина м'язових волокон у ділянці пошкодження дегенерувала разом з нервовими закінченнями і була фагоцитована, але базальна мембрана залишалася при цьому інтактною. Місце вихідного нервово-м'язового контакту легко розпізнано за характерною морфологією базальної мембрани м'яза і шваннівських клітин (лемоцити, допоміжні клітини нервової тканини, які формуються вздовж аксонів периферичних нервових волокон; створюють, а іноді і руйнують, електроізолюючу мієлінову оболонку нейронів; виконують опорну (підтримують аксон) і трофічну (живлять тіло нейрона) функції), що залишаються в зоні синапса, а також за наявністю холінестерази, що зберігається на синаптичній базальній мембрані і в синаптичних складках (Nitkin, 1983). Через два тижні після пошкодження в зоні синаптичної базальної мембрани формувалися нові м'язові волокна, що контактували з регенеруючими аксональними закінченнями. Стимуляція нервів викликала скорочення новостворених м'язових волокон. Майже всі регенеровані синапси локалізувалися точно на вихідних синаптичних зонах, що виявлялося після фарбування м'яза на присутність холінестерази. Таким чином, зроблений висновок про наявність сигналів, асоційованих з синаптичною базальною мембраною, які визначають успіх регенерації синапсів (Павлов, 2009).

Для подальшого дослідження природи сигналів, асоційованих з синаптичною базальною мембраною, м'язи пошкоджували, нерв роздавлювали, а регенерацію м'язового волокна запобігали рентгенівським опроміненням. Регенеруючі аксони росли до вихідних синаптичних зон і формували активні зони для звільнення медіатора точно навпроти ділянок базальної мембрани, пов'язаних з вторинними синаптичними складками, - і все це відбувалося за відсутності клітинних елементів постсинаптичної мішені. У паралельній серії експериментів продемонстровано, що синаптична базальна мембрана в регенеруючих м'язових волокнах містить фактори, що запускають диференціювання постсинаптичної мембрани. М'язи ушкоджувалися, як було описано раніше, а реіннервація

попереджувалась видаленням великого сегменту нерву. При регенерації нові м'язові волокна утворювали вторинні складки і кластери АХ рецепторів і ацетилхолінестерази точно в зоні контакту з вихідною синаптичною базальною мембраною. Таким чином, сигнали, асоційовані з синаптичною базальною мембраною, при регенерації можуть ініціювати формування синаптичних спеціалізацій як в м'язових волокнах, так і в нервових закінченнях (Maselli, 2012).

Для ідентифікації сигналу, пов'язаного з базальною мембраною, що ініціює постсинаптичне диференціювання, використовували морського ската *Torpedo californica*. З електричних органів цієї тварини приготували екстракти, що містять базальні мембрани. Додані до культури м'язових волокон, екстракти стимулювали ефекти синаптичної базальної мембрани у напрямку регенерації м'язових волокон, а саме індукували формування кластерів АХ рецепторів разом з іншими компонентами постсинаптичної мембрани.

Активний білок екстрактів, названий агріном, був очищений і охарактеризований. Імуногістохімічні дослідження показали, що агрін синтезується мотонейронами, транспортується до аксона і, звільняючись, індукує диференціювання постсинаптичного апарату в нервово-м'язових синапсах, які розвиваються. Потім агрін стає частиною синаптичної базальної мембрани, де бере участь у збереженні постсинаптичного апарату і запускає диференціювання під час регенерації. Специфічний для м'язів рецептор тирозинкінази (MuSK), утворює частину агринового рецептора (Xiong, 2017). Активація MuSK ініціює внутрішньоклітинне фосфорилування, що слугує пусковим сигналом для агрегації ацетилхолінових рецепторів (Бобров, 2011).

Нервово-м'язові синапси хребетних – найбільш вивчена модель для розуміння механізмів, що беруть участь у формуванні синапсів через його відносно великі розміри, простоту структури та експериментальної доступності. Під час розвитку нервово-м'язового контакту, кожне м'язове волокно виділяє навколо своєї позаклітинної поверхні протеїни позаклітинного матрикса, які формують базальні пластинки. Вони грають важливу роль у нервово-м'язовому з'єднанні. Перш ніж більшість молекулярних компонентів ЕЦМ стали відомі, було ясно, що синаптичний позаклітинний матрикс м'язів є унікальний за складом і містить достатньо факторів для диференціації компонентів пре- і постсинаптичних мембран. Біохімічні, генетичні та мікроскопічні дослідження підтвердили, що агрін, ламінін, колаген IV ($\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$), колаген XIII, перлекан і ColQ – синаптичні протеїни ЕЦМ у нервово-м'язовому синапсі (Burden., 2018).

Протеїни екстрацелюлярного матрикса в нервово-м'язовому з'єднанні присутні у вигляді синаптичної базальної мембрани, яка містить ламінін і колаген IV в якості основних білкових компонентів. Нервово-м'язовий синапс має синаптичну щілину приблизно 50 нм. Багато протеїнів, присутніх в цій зоні можуть перевищувати 50 нм (наприклад, ламінін, агрін і колаген IV), тому вони контактують як з пре-, так і з постсинаптичною мембранами. Найбільш вивченим з них є ламінін.

Ламініни є тримерними протеїнами (глікопротеїнами), що складаються з трьох різних субодиниць: α , β і γ ланцюга. Нова номенклатура була узгоджена, щоб вказати субодиничний склад індивідуального тримера (наприклад, ламінін $\alpha4\beta2\gamma1$ це ламінін 421 і так далі). Три α ланцюги ламініна ($\alpha2$, $\alpha4$ і $\alpha5$) утворюють тримери з ламініном $\beta2$ і ламініном $\gamma1$, в результаті утворюються ламініни 221, 421 і 521. У нервово-м'язовому синапсі ламініни 221, 421 і 521 визначені як синаптичні з варіативним α -ланцюжком (Rogers, 2017).

Агрін це гепарансульфатний протеоглікан ЕЦМ і відіграє істотну роль у синаптичному розвитку. Агрін є практично лінійним білком розміром 95 нм. N-кінцева частина молекули містить сполучний домен для ламініна і дев'ять фолістатин-подібних повторів. Здатність індукувати утворення постсинаптичної спеціалізації в основному залежить від C-кінцевого домена.

Іншим основним класом м'язових протеїнів базальної пластинки є колаген IV, близько 400 нм у вигляді довгих ниткоподібних катушок, що складаються з трьох гомологічних поліпептидних ланцюгів. Кожен колаген IV – тример, що містить N-кінцевий домен, багатий на цистеїн, спіральний домен і C-кінцевий домен. N- і C-кінцеві області слугують для контактів сусідніх тримерів. У скелетних м'язах, колаген IV $\alpha1$ і $\alpha2$ є основними формами колагена IV, а колаген IV $\alpha3$, $\alpha4$, $\alpha5$ і $\alpha6$ – виключно в нервово-м'язовому синапсі.

У НМС колаген XIII виявляється на дуже низькому рівні в ранньому післяпологовому періоді, рівень зростає після двохтижневого віку. Колаген XIII виражений в багатьох тканинах. Відсутність його призводить до неповної адгезії пре- і постсинаптичної мембран НМС (Zainul, 2018).

Ще одна форма колагена в нервово-м'язовому з'єднанні – ColQ - колагенова субодиниця ацетилхолін естерази (АХЕ). АХЕ в синаптичній щілині інактивує ацетилхолін після нервового збудження. ColQ взаємодіє з перлеканом, який, у свою чергу, взаємодіє з ламініном, колагеном IV та іншими компонентами базальної мембрани НМС. Перлекани – гепарансульфат протеоглікани (Singhal & Martin, 2011).

На відміну від даних про ламінін, колаген, гепарансульфат протеоглікани, мало відомо про локалізацію або роль нідогенів в НМС. *Caenorhabditis elegans* (вільноживучі нематоди) мають єдиний ген нідогена, необхідний для формування НМС. На відміну від безхребетних геномів, в організмі ссавців присутні два гени нідогена, що кодують нідоген-1 і нідоген-2 (Fox, 2008). У багатьох тканинах ссавців нідогени – компоненти базальної мембрани, а генетичні дослідження показали, що вони відіграють важливу роль у розвитку НМС. Мало дефектних фенотипів спостерігали в мутантів, які позбавлені або нідогена-1, або нідогена-2. Нідоген-1 і нідоген-2 здатні компенсувати один одного. У той час, мутанти, позбавлені і нідогена-1, і нідогена-2 гинуть з дефектами у розвитку легень, серця, кінцівок. Нідоген -1 і -2 схожі за доменною структурою, але відрізняються за послідовністю (46 % подібності амінокислот у людини, 43 % у мишей). Нідоген-2 вибірково пов'язаний з синаптичною БМ і необхідний для дозрівання і підтримки НМС дорослого організму. Також отримані генетичні докази того, що синаптична локалізація кожного з чотирьох сімейств компонентів БМ не залежить від інших трьох (Anglade, 2010).

Таким чином, протеїни позаклітинного матрикса, які знаходяться в межах синаптичної щілини в нервово-м'язовому синапсі відіграють найважливішу роль практично у всіх аспектах синаптичного розвитку, в тому числі синаптичного ініціювання, топографії, ультраструктури, дозрівання, стабільності та передачі.

Нейрон має розвинений і складний цитоскелет, що проникає в його відростки. Цитоскелет підтримує форму клітини, його нитки слугує «рейками» для транспорту органел і упакованих в мембранні пухирці нейромедіаторів.

Внутрішню структуру (цитоскелет) аксона становить система поздовжньоорієнтованих мікротрубочок і дрібніших та численних нейрофіламентів, скріплених поперечними зв'язками. На відміну від тіл клітин аксони позбавлені рибосом та зернистої ендоплазматичної сітки й тому необхідні для підтримки їх життєдіяльності протеїни й компоненти цитоскелета синтезуються в тілі клітини і лише потім за допомогою аксональних транспортних систем надходять до найвіддаленіших частин аксонів.

Мікрофіламенти – це ниткоподібні полімерні утворення товщиною 5-7 нм, які формуються з мономерів протеїна F-актина, розчиненого в цитоплазмі.

Мікротрубочки – це порожні трубки діаметром близько 25 нм, що йдуть по всій довжині аксона. Вони утворюють тонкі відростки через

регулярні проміжки. Стінки мікротрубочок складаються з протеїна тубуліна.

Нейрофіламенти (НФ) представляють собою ниткоподібні утворення товщиною 8-10 нм у цитоплазмі нейронів. Вони відносяться до проміжних філаментів, є компонентами цитоскелета і по своїй товщині займають проміжне положення між мікротрубочками (24-25 нм) і актиновими філаментами (7-8 нм). Нейрофіламенти містяться тільки в нервових клітинах, і однією з їх функцій є забезпечення повільного аксонального транспорту. Нейрофіламенти складаються з трьох субодиниць, які представляють собою поліпептиди з N-кінцевим головним доменом, C-кінцевим хвостовим доменом і центральним стрижневим доменом. Субодиниці відрізняються за молекулярною масою: низькомолекулярні протеїни нейрофіламентів (НФ-L) з молекулярною масою 68-73 кДа, середні (НФ-M) – 140-160 кДа і високомолекулярні (НФ-N) – 195-200 кДа. Співвідношення даних протеїнів є важливою умовою для реалізації функції нейрофіламентів. Збірка протеїнів у загальну структуру здійснюється в перикаріоні, після чого нейрофіламенти транспортуються в аксон і фосфорилуються. В ембріогенезі спочатку синтезуються L і M ізоформи НФ, пізніше формуються N. Враховуючи, що в нормі в дорослому організмі нейрофіламенти розташовуються, головним чином, в аксонах нервових клітин, їх виявлення за допомогою антитіл застосовується при дослідженнях іннервації різних органів і порушенні цього процесу. Імуногістохімічні виявлення протеїнів НФ-M і НФ-N широко застосовують для вивчення регенерації пошкоджених периферичних нервів. Це пов'язано з тим, що саме в довгих периферичних нервових волокнах міститься найбільша кількість протеїнів нейрофіламентів (Петрова, 2012).

У 1983 р. французькі дослідники виділили протеїн, який отримав назву «периферин». Він був представлений як потенційний маркер периферичної нервової системи. Периферин відноситься до протеїнів проміжних філаментів і має молекулярну масу 57 кДа. Показано, що він має здатність самозбірки і може кооперуватися з протеїнами НФ, формуючи мережу проміжних філаментів в нервових клітинах. Він експресується переважно в тих нейронах, аксони яких розташовуються на периферії. Питання про функції, які виконуються периферином в клітинах, до сих пір залишається дискусійним. Для з'ясування ролі цього протеїна застосовуються різні експериментальні підходи: культура клітин, нокаутні лінії мишей, трансгенні тварини з гіперекспресією периферина. Дослідження показали, що одна з функцій периферина – підтримка структури і форми клітини. У трансгенних тварин з гіперекспресією

периферина в нейронах спостерігаються зміни, подібні з виявленими при нейродегенеративних захворюваннях: накопичення в цитоплазмі агрегатів з протеїнів проміжних філаментів. Ще одна функція периферина пов'язана зі стабілізацією діаметра аксона і забезпеченням нормальної швидкості проведення нервового імпульсу. Імуногістохімічний метод виявлення периферина широко використовується для вивчення іннервації різних органів і регенерації периферичних нервів (Yuan, 2012).

Антитіла до протеїнів синаптичних везикул і протеїнів нейрофіламентів використані в дослідженні пресинаптичної диференціації, її відношення до утворення кластерів ацетилхолінових рецепторів, розвиток нервово-м'язового синапса.

На 14 дні ембріонального розвитку миші протеїни синаптичних везикул присутні по всьому претермінальному нейриту (аксона), але в більш пізньому періоді поступово переміщуються до дистальних відділів (далі від центру). Протеїни НФ займають більш проксимальні регіони (ближче до центру). Обмеження протеїнів синаптичних везикул виключно в терміналях не відбувається до другого тижня постнатального періоду. Під час їх першої появи (14 пд), до 50 % кластерів АХР не були пов'язані з нейритами; точна локалізація вимагає 12-36 годин, щоб розвинути. Результати досліджень показують, прогресивне обмеження як пре-, так і постсинаптичних компонентів синапсів в процесі розвитку.

Вражаючою особливістю нервово-м'язового контакту дорослого організму є надходження специфічних протеїнів у специфічні регіони пре- і постсинаптичних просторів. Під час розвитку м'язів, АХР спочатку дифузно розподілені на поверхні м'язових волокон, але щільність їх зростає поблизу ділянок нервово-м'язових контактів.

На ранніх стадіях розвитку за природних умов (*in vivo*), протеїни синаптичних везикул присутні вздовж усього нейриту, а також у конусах росту. Розподілення цих протеїнів настає лише на другий і третій постнатальний тиждень.

Як у ході розвитку, так і в дорослому організмі, протеїни НФ розподіляються комплементарно (взаємодоповнюють) до протеїнів синаптичних везикул. У дорослих НМС, протеїни НФ займають аксон до основи нервового закінчення. Під час розвитку, протеїни везикул поступово обмежуються терміналем, розподіл протеїнів НФ відбувається дистально (тобто далі), досягнувши термінальної області тільки через 1-2 тижні після народження. У процесі розвитку протеїни везикул і протеїни НФ займають суміжні регіони нейритів.

Дослідження показали, що кластери АХР вперше були виявлені на 14-15 добу постнатального розвитку, близько половини з них не були приведені в функційний стан нейритами. Агрегати АХР без асоціювання з нейритами були також помічені в ембріональних м'язах курячих крил і електричному органі *Torpedo*. Протягом 12-36 годин після первинного формування АХР, всі вони стають у відповідність з аксонами (Lupa, 2008).

Нервово-м'язові синапси не розвиваються в довільних місцях у м'язах, вони зібрані у вузькій центральній області м'язових волокон, так що багато цих синапсів розташовані в ряд, формуючи кінцеві пластини. АХР локалізовані на постсинаптичній мембрані м'язів і їх просторовий розподіл є точним для синаптичної функції. Висока щільність АХР у синапсах необхідна для запуску синаптичних потенціалів дії в м'язовому волокні. Навколо синапсів і в решті частини волокна щільність АХР повинна бути низькою, щоб дозволити повне дозрівання нервово-м'язового синапса.

Механізми, що призводять до кластеризації АХР в постсинаптичній мембрані вимагають точної взаємодії між сигналами мотонейронів і м'язовими волокнами. Утворення кластерів залежить не тільки від позитивних сигналів (концентрація АХР підвищується в синаптичній області), але також і від негативних сигналів, коли необхідно зменшити концентрацію рецепторів уздовж всього волокна.

Найкраще характеризує сигналізаційну відповідальність за накопичення АХР на НМС є агрін / ліпопротеїнзв'язувальний протеїн 4 (Lrp4). Агрін і MuSK – два важливих компоненти збірки НМС. MuSK - рецепторні тирозинкінази (м'язові кінази), що знаходяться в постсинаптичній мембрані НМС, де локалізуються спільно з АХР. Основна роль агріна полягає в ініціюванні фосфорилування та активації MuSK. Тим не менш, MuSK також можуть бути активовані агрін-незалежним способом. Нещодавно відкритий агриновий корецептор – трансмембранний протеїн Lrp4 зосереджений на НМС і необхідний для стимулювання агрином фосфорилування MuSK і кластеризації АХР. Відповідно до цієї моделі, Lrp4 може взаємодіяти з MuSK за відсутності агріна. Після фосфорилування MuSK активує сигнальні шляхи. Активація MuSK агрином також призводить до концентрації в синапсах інших протеїнів, таких як ацетилхолінестерази (АХЕ), рапсіна та нейрегулінових рецепторів (ErbBs). Після фосфорилування стикувальний протеїн-7 (Dok-7, docking protein-7), некаталітичний протеїн, стимулює подальше фосфорилування і діяльність MuSK. Щоб правильно регулювати формування нервово-м'язового синапса, Dok-7 залучає два адаптерних протеїни Crk і CrkL.

Субодиниці АХР вибірково транскрибуються в синаптичному ядрі м'язових волокон. Шляхи активації транскрипції в субсинаптичних регіонах як і раніше залишаються нез'ясованими. Один з активаторів - нейрегулін-1 - глікопротеїн, який працює як позаклітинний сигнал, який стимулює АХР та інші синапс-специфічні компоненти транскрипції., він діє шляхом зв'язування з мембраноасоційованими тирозинкіназними рецепторами ErbB 2-3-4. Позитивні сигнали супроводжуються підвищенням АХР в синаптичній області. Для досягнення правильного формування кластерів АХР в НМС потрібні негативні сигнали, які знижують концентрацію АХР в сусідніх частинах волокна, не пов'язаної з синаптичною областю, що є необхідним. Негативні сигнали пригнічують локалізацію АХР вздовж м'язового волокна шляхом стимуляції протеїнкінази С (ПКС) і Ca^{2+} -кальмодулін-залежної кінази II (СаМК II). Активація ПКС і СаМК II відбувається за рахунок високої концентрації Ca^{2+} . Пригнічення транскрипції АХР відбувається через інгібування міогеніна. Міогенін є основним фактором транскрипції, який активує гени АХР.

Таким чином, як тільки м'яз дотикається до нерва, АХ виділяється з мотонейрона і викликає постсинаптичний потенціал, який стабілізує кластери АХР в контактну зону (Ferraro, 2012).

4.3 Порушення нервово-м'язового синапса при аутоімунній міастенії

Міастенію відносять до найбільш вивчених аутоімунних захворювань (рис. 26). Міастенія рідка хвороба: близько 10 з одного мільйона людей діагностуються щорічно, і лише 10 відсотків тих, у кого діагностовано стан, – діти.



Рис. 26 У людей, які мають міастенію, нерви і м'язи не мають правильну комунікацію.

Головною мішенню при міастенії є структури синапса, безпосередньо м'язова тканина. Даної точки зору дотримуються далеко не всі дослідники. У розвитку порушень нервово-м'язової передачі, на їх думку, беруть участь і спадковий фактор, і хімічна нестійкість основного рухового медіатора ацетилхоліна, порушення коригуючих впливів на м'язовий тонус з боку гіпоталамуса внаслідок його травматичного або інфекційного ураження, і гормонально-ендокринна дисрегуляція з боку щитоподібної залози, надниркових залоз, тимусу, статевих залоз. Тому питання подальшого дослідження патогенезу міастенії є досі актуальними, оскільки вони визначають сучасні терапевтичні підходи.

Ацетилхолінові рецептори – основна вражаюча мішень при міастенії – можуть розглядатися як перетворювачі сигналу, функцією яких є передача позаклітинних сигналів усередину клітини (рис. 27) (Engel, 2012).

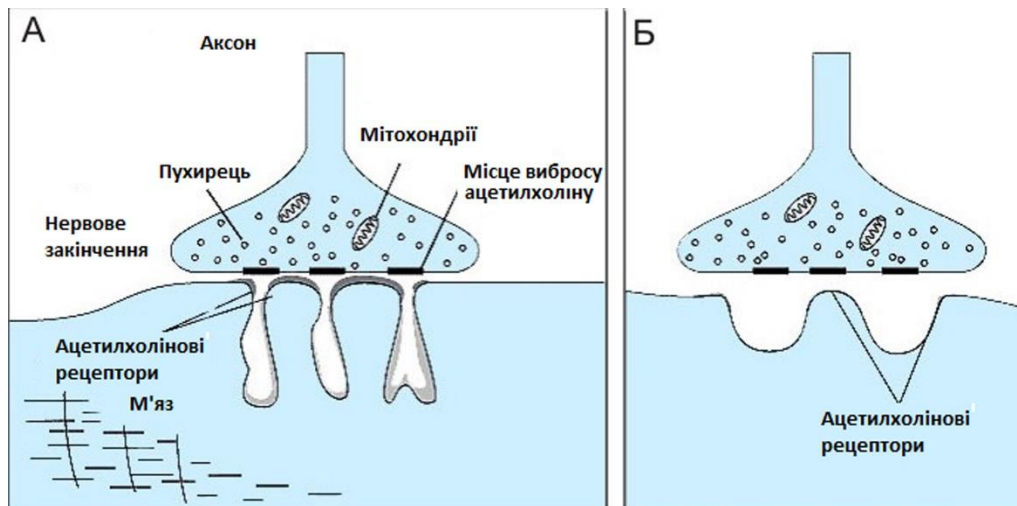


Рис. 27 Порушення ацетилхолінових рецепторів, що призводить до розвитку міастенії

Слід зазначити, що існуюча різноманітність антигенних протеїнів при міастенії визначає не тільки поліморфізм її клінічних проявів, а й серйозні діагностичні труднощі, оскільки не завжди вдається зафіксувати в крові присутність ідентичних аутоантитіл і, відповідно, провести адекватну імюнокорекцію. У зв'язку з цим становить інтерес визначення участі інших посередників імунологічних реакцій при міастенії, що дозволяють верифікувати відповідний діагноз. До теперішнього часу встановлено, що існують дві субпопуляції Th - клітин CD4 + (Th1 і Th2), що розрізняються за профілем синтезованих ними цитокінів. Th1-цитокіни стимулюють утворення в сироватці крові анти-АХР-аутоантитіл, які фіксують

комплемент у м'язовому синапсі і мають високий патогенний потенціал внаслідок комплемент-опосередкованого лізиса комплексів антиген-антитіло, які виявлені шляхом електронної мікроскопії в експериментальних роботах на тваринах. Переключення імунної відповіді в бік переважання Th2-типу, характеризуються тим, що цитокіни, що продукуються цими клітинами, стимулюють синтез IgA, IgE, IgY антитіл, що не фіксують комплемент і не призводять до пошкодження АХР. Антитіла, що продукуються при обох типах імунної відповіді мають загальну антигензв'язуючу ділянку (Fab – фрагмент), але не відрізняються Fc-фрагментом, що зв'язує комплемент. Отже, при міастенії присутні два види аутоімунної відповіді, вираженість однієї з яких визначає присутність і прогресування міастенії (Мироненко, 2009).

Аутоімунна міастенія – аутоімунне нервово-м'язове захворювання, що характеризується патологічною, швидкою стомлюваністю поперечно-смугастих м'язів. Основним клінічним проявом міастенії є синдром патологічної м'язової стомлюваності (посилення проявів міастенії після фізичного навантаження і зменшення їх після відпочинку).

Останнім часом захворюваність міастенією зростає, на сьогоднішній день поширеність становить приблизно 5-10 осіб на 100 000 населення.

Провокуючим фактором може бути стрес, перенесене ГРВІ, порушення функції імунної системи організму веде до утворення антитіл проти власних клітин організму – проти ацетилхолінових рецепторів постсинаптичної мембрани нервово-м'язових синапсів. Аутоімунна міастенія спадково не передається.

На самому початку захворювання міастенією хворі відзначають подвоєння в очах, у них мимоволі опускаються повіки, вони швидко втомлюються. Після відпочинку зазвичай перші симптоми міастенії зникають. З часом симптоматика стає більш явною, м'язова слабкість наростає, а полегшення не настає навіть після тривалого відпочинку і сну. У патологічний процес втягуються все нові групи м'язів. Хворому важко пережовувати і ковтати їжу, ворухити язиком, розмовляти. До симптомів міастенії відносять також зміна голосу, порушення дикції і рухової активності, розлад дихання. У свій час прогноз захворювання був більш песимістичним. Сьогодні, завдяки прогресу в області лікувальних та фармакологічних заходів, лікування міастенії дозволяє позбутися від важких наслідків хвороби, уникнути летальності і нівелювати її симптоми.

Раніше міастенія була важким захворюванням з високою летальністю – 30-40 %. Однак при сучасних методах діагностики та лікування летальність стала мінімальною – менше 1%, близько 80% на тлі лікування

досягають повної/неповної ремісії. Але все-таки захворювання є хронічним, серйозним і вимагає ретельного нагляду та лікування.

Конгенітальна міастенія – генетичне захворювання, яке передається у спадок. Це набагато більш рідкісне захворювання, ніж аутоімунна міастенія. Причиною вродженої міастенії є мутації в генах різних протеїнів, що відповідають за побудову і роботу нервово-м'язових синапсів. У синапсах (зокрема, в кінцевих пластинках нервово-м'язових синапсів) ацетилхолінестераза присутня у вигляді тетрамера, приєднаного до колагеноподібного білку, який кодується окремим геном COLQ. Мутація цього гена є однією з найбільш поширених причин спадкової міастенії (дефіцит ColQ). Також мутації генів ламініна В2 і агріна викликають вроджені міастенії у зв'язку з дефіцитом цих протеїнів. Іншою поширеною причиною міастенії є різні мутації субодиниць нікотинного рецептора ацетилхоліна (нікотинний ацетилхоліновий рецептор – підвид ацетилхолінових рецепторів, який забезпечує передачу нервового імпульсу через синапси і активується нікотинном, крім ацетилхоліна).

Міастенічні синдроми за клінічними проявами нагадують картину міастенії, але відрізняються від неї своєрідністю порушення синаптичної передачі, специфікою міографічної картини. Міастенічні синдроми діляться на декілька груп залежно від:

- порушення виходу ацетилхоліна з пресинаптичних просторів (при бронхогенній карциномі, тиреотоксикозі);
- порушення утворення ацетилхоліна при наявності ураження периферичного мотонейрона;
- швидкого блокування нервово-м'язової передачі при міотонії;
- вроджених нервово-м'язових розладів (міопатії з міастенічним компонентом);
- пухлинних і запальних процесів стовбурової локалізації (стовбурової арахноенцефаліт, пухлина стовбура мозку).

Найчастіше зустрічається міастенічний синдром Ламберта-Ітона, який визначається при бронхогенній карциномі, а також раку шлунка, прямої кишки.

Міастенічний синдром може передувати клінічним проявам раку. Відзначаються м'язова слабкість, атрофія, зниження глибоких рефлексів, патологічна стомлюваність. М'язи обличчя вражаються рідко (Engel, 2012).

У неврологічній практиці міастенічний синдром часто спостерігається також при ствольовому арахноенцефаліті, пухлині стовбура мозку. При цих патологічних станах страждає ретикулярна формація, відбувається

неузгодженість дій різних м'язових груп, що беруть участь в руховому акті, настає патологічна м'язова стомлюваність.

Саркопенія – атрофічна дегенеративне зміна скелетної мускулатури, асоційована з віком і приводить до поступової втрати м'язової маси і її сили. Втрата м'язової маси сильно погіршує якість життя в літньому віці, що пов'язана з підвищеним ризиком захворюваності та смертності. Етіологія саркопенії поки що не з'ясована. Однак багато досліджень припускають, що порушення структури і функцій нервово-м'язового синапса грає ключову роль в атрофії м'язів в процесі старіння. Зміни в морфології НМС залежать від типу м'язів і включають в себе зміни розміру нервових закінчень, кінцевої пластини, кількості синаптичних везикул.

Ботулізм – це гостра форма отруєння при вживанні в їжу продуктів, що містять токсин, який виробляється ботулістичною паличкою *Clostridium botulinum*. Ботулістичний токсин блокує нервово-м'язову передачу в холінергічних нервових волокнах. Токсин або пригнічує вивільнення ацетилхоліна, або зв'язує його в пресинаптичній щілині в місці його вивільнення або поблизу його (Maselli, 2012).

Отже, дефекти сигнальних шляхів, які регулюють диференціювання і функціонування НМС можуть призвести до цілого ряду вроджених нервово-м'язових розладів. Втрата нервових сигналів, викликана дегенерацією рухових нейронів, призводить до виснажливої втрати м'язової маси, атрофії і паралічу. Тому розуміння молекулярних основ функціонування синапсів є основою терапевтичного підходу до таких розладів. Морфогенез і патогенез багатьох захворювань у наш час може бути розкритий з принципово нових позицій, тобто в ході розуміння порушень міжклітинних взаємодій.

4.4 Пластичність міжклітинних контактів у нервовій системі

Раніше більше уваги приділяли вивченню синаптичної пластичності між нейронами. На сьогодні вже багато дослідних даних, які вказують на те, що щілинні контакти мають вирішальне значення для мієлінізації і аксонального виживання в ПНС і ЦНС (Elias, 2007; Kleopa, 2015). Типи щілинних контактів розрізняються в мієліні ПНС і ЦНС, включаючи їх функції та участь у неврологічних розладах. Щілинні контакти є посередниками міжклітинних зв'язків між шваннівськими клітинами в ПНС, і серед олігодендроцитів, і між олігодендроцитами й астроцитами в ЦНС. Щілинні контакти регулюють фізіологічні процеси, такі, як ріст клітин, проліферацію, кальцієву сигналізацію, а також беруть участь у позаклітинній сигналізації через вивільнення нейротрансмітерів. У ЦНС,

щільні контакти утворюють гліальні сітки між олігодендроцитами та астроцитами. Це трансцелюлярний зв'язок. Гомеостаз підтримується шляхом відновлення мембранного потенціалу після аксональної діяльності через електричні зв'язки і перерозподіл йонів Калію. Дослідження останніх десятиріч виявили внесок різних коннексинів у формування контактів та регуляцію субклітинних механізмів, що лежать в основі демієлінізації та когнітивних дефектів. Визначено експресію коннексинів і залежно від цього регуляцію щільних контактів, що забезпечило краще розуміння реалізації функцій мієліна в нервовій системі (Bosone, 2016; Vasu, 2018).

Щільні контакти є агрегатами міжклітинних каналів, які дають прямий міжклітинний перенос йонів і невеликих молекул між сусідніми клітинами. Щільні контакти знаходяться практично у всіх тканинах. Щільні, з'єднувальні канали складаються з гексамерів інтегральних протеїнів: коннексинів та інексинів.

У більшості клітин щільні контакти представлені кількома коннексинами. Мутації в *Cx32*, що пов'язані з X-хромосою призводять до периферичної нейропатії, які асоційовані з недостатністю мієліна в шваннівських клітинах. *Cx32* утворює «рефлексивні» щільні контакти. Вимірювання швидкості дифузії між відсіками цитоплазми в окремих клітинах підтримує це поняття. Тим не менш, немає ніякої істотної різниці між швидкостями дифузії. Щоб пояснити цю розбіжність, висловлено припущення, що *Cx29* може замінити втрату *Cx32*. *Cx29* не накопичується в розривах сполучної бляшки в клітинах за природних умов. З іншого боку, *Cx29* дійсно показує дефект мієліна, але той, який обмежений тілами нейронів спірального ганглія (Клеора, 2010).

Роль коннексинів доведено під час розвитку неокортекса. Нокдаун гена коннексина призводить до зриву міграції нейронів уздовж радіальної глії в проміжній зоні і втрати клітин, які перебувають в нижній і верхній корковій пластинці. Експерименти показали, що нормальна міграція залежить не стільки від нейронів, як від коннексинів гліального походження. Адгезивні властивості коннексинів необхідні для правильної міграції нейронів (Leybaert, 2017)

Слід відзначити, що адгезія і геміфузія цитоплазматичних ліпідних мембран мієліна сильно залежить від ліпідного складу. Спостерігають вплив йонів кальцію на механізм адгезії, а саме у мієліні підтримується ліпідний бішар мембран різного складу. Вплив ліпідного складу на механізм злиття, і сили зчеплення між бішарами ліпідів мієліна, можна резюмувати наступним чином: якщо буфер без кальцію, то здорові мембрани не представляють ніяких ознак адгезії. Додавання кальцію сприяє адгезії і

геміфузії мембран, незалежно від їх складу, але механізми, залучені в ці два процеси, різні: у «здоровому» бішарі представлені систематично сильніші сили зчеплення і спостерігається нижній енергетичний бар'єр для злиття в порівнянні з «хворим» бішаром. Ці результати особливо важливі для розуміння розвитку ураження (дем'єлінізації) при мієлінових захворюваннях, пов'язаних із розсіяним склерозом і його відношенням до ліпідних доменів у мієлінових оболонках.

Розрив сполучного зв'язку має важливе значення для підтримки мієліна в ЦНС. Досліджено внесок коннексина 47 (Cx47) в олігодендроцитах і Cx30 в астроцитах у розриві сполучних мереж, а також порушення функцій мієліна за умов видалення обох коннексинів. Спостерігали повне руйнування олігодендроцитів та зв'язку астроцитів у білій речовині за умов відсутності Cx30/Cx47, у той час олігодендроцити та їх зв'язок був збережений. Встановлено кількісні відмінності. Спостерігали ранній початок патології мієліна за умов 40 % дефіциту Cx30/Cx47, за умов подвійного дефіциту цих протеїнів тварини помирали протягом 42 до 90 діб після пологів, патологія супроводжувалася тяжкими порушеннями. Гістологічний та ультраструктурний аналіз показав серйозну вакуолізацію і дефекти мієлінізації у білій речовині ЦНС. Крім того, Cx30/Cx47 подвійно-дефіцитні миші демонстрували зменшення числа олігодендроцитів, важкий астрогліоз і активацію мікроглії (Tress, 2012).

Функційна взаємодія між олігодендроцитами залежить також від інтегринів, що експресуються на клітинній поверхні нейронів та ламініна міжклітинного матрикса. Інтегрини відповідають за зв'язок між ЕЦМ і актином цитоскелета. Зокрема, інтегринова сигналізація пов'язана з FG-опосередкованим виживанням і розповсюдженням олігодендроцитів.

Олігодендроцити диференціюються і дозрівають під впливом інтегринів. У відповідь на взаємодію інтегринів, кінази (ензими форсфорилування) активують різні сигнальні шляхи.

ЕЦМ протеїни регулюють різні аспекти біології олігодендроцитів. Ключові компоненти ЕЦМ, такі, як фібронектин (ФН), вітронектин (ВН), і ламінін-2 (Лн2) пов'язані з розвитком та розповсюдженням олігодендроцитів. Ці протеїни зв'язуються з інтегринами і є посередниками клітинної адгезії та двобічної передачі сигналів. Експресія інтегринів регулює процес розвитку і різні типи клітин показують різноманітні масиви інтегринів залежно від стадії диференціювання.

Під час дозрівання олігодендроцити відчувають підвищену експресію проапоптичних молекул, у той час, як антиапоптична активність

залишається незмінною. Олігодендроцити особливо сприйнятливі до запрограмованої загибелі клітин у процесі розвитку.

Інтегринові контакти з компонентами ЕЦМ є ключовим фактором у поширенні і виживанні олігодендроцитів. Паралельно, трофічні фактори, такі, як тромбоцитарний фактор росту (ТФР) і нейрегулін-1 також підтримують проліферацію і виживання цих клітин.

У той час як інтегринова адгезія не сприяє виживанню олігодендроцитів, інтегринові контакти з ЕЦМ впливають позитивно на рахунок сигналізації. Це явище спостерігається в ряді досліджень з $\alpha\beta 1$ інтегринами, де ламінін-2, підвищує чутливість. $\alpha\beta 1$ інтегрини є ламінін-залежним рецептором сімейства інтегринів, припускають, що $\alpha\beta 1$ інтегрини несуть відповідальність за ламінін-2-опосередковане підвищення сигналізації для виживання олігодендроцитів. За нормальних умов, $\alpha\beta 1$ інтегринові рецептори зв'язуються з ламініном-2, у той час, як інтегрин $\alpha 5$ містять рецептори переважно пов'язані з фібронектином.

Інтегринові рецептори мають важливе значення для нормального морфологічного розвитку олігодендроцитів. Оскільки багато аксональних ділянок ЦНС вислані ламініном, то $\alpha\beta 1$ інтегрин відіграє важливу роль у мієлінізації. Зокрема, $\beta 1$ субодиниця рецептора $\alpha\beta 1$ особливо важлива для олігодендроцитного дозрівання. Внутрішньоклітинні протеїни, які пов'язані з $\beta 1$ -інтегриновою сигналізацією, включають інтегрин-зв'язувальну кіназу (ІЗК), кіназу фокальної адгезії (КФА), Akt, Rac1, Cdc42, і Rho. Ці протеїни беруть участь в реконструкції цитоскелета і можуть відігравати важливу роль у морфологічному розвитку олігодендроцитів у відповідь на $\beta 1$ -інтегринову активацію (Berken, 2003).

Порушення взаємодії ЕЦМ-інтегринів призводить до вад розвитку ЦНС та ПНС.

Інтегринова активація через позаклітинні ліганди досліджена в різних типах клітин. Знайдено сигнальні протеїни координаційних сайтів адгезії. КФА і Akt два такі протеїни. КФА бере участь у розповсюдженні олігодендроцитів, в той час як Akt сприяє їх виживанню. Збільшення КФА і Akt активації у відповідь на ламінін-2 опосередковує сигналізацію.

Нокдаун КФА запобігає розширенню адгезії у відповідь на ламінін-2. Тому $\beta 1$ -інтегринова сигналізація в період дозрівання необхідна для нормального морфологічного розвитку. Після виснаження $\beta 1$ -інтегринів активність Akt знижується. Зниження активності Akt, ймовірно, лежить в основі вади мієлінізації.

Умовний нокаут КФА під час початку мієлінізації призводить до зменшення кількості мієлінових аксонів.

Cdc42, Rac1, і Rho є ГТФази, які продукують переважно олігодендроцити. ГТФ-зв'язані Cdc42 і Rac1 будують нитки актина, в той час як ГТФ-зв'язані Rho деполімеризують нитки актина. Інтегринова сигналізація відіграє важливу роль у ГТФ-опосередкованій морфологічній диференціації нервових клітин. Діяльність Rho протеїна сильно впливає на розвиток олігодендроцитів. Таким чином, аксональні шляхи забезпечують багате середовище для молекулярних сигналів, впливаючи на долю олігодендроцитів. Позаклітинний матрикс є субстратом, на якому клітини мігрують, розмножуються і диференціюються. Він бере участь у підтримці цитоархітектоніки, регуляції гомеостазу, і впливає на взаємодію між клітинами і молекулами за допомогою специфічних рецепторів. Накопичено багато інформації про роль ЕЦМ у периферичних тканинах, але мало відомо про структуру та функції ЕЦМ у ЦНС. Однак, помітні зміни в експресії компонентів ЕЦМ зареєстровані за умов різних неврологічних розладів, наприклад, розсіяного склерозу.

Функційна активність центральної нервової системи також залежить від базальної мембрани (БМ), складові якої переважно пов'язані із судинною сіткою (рис. 28).

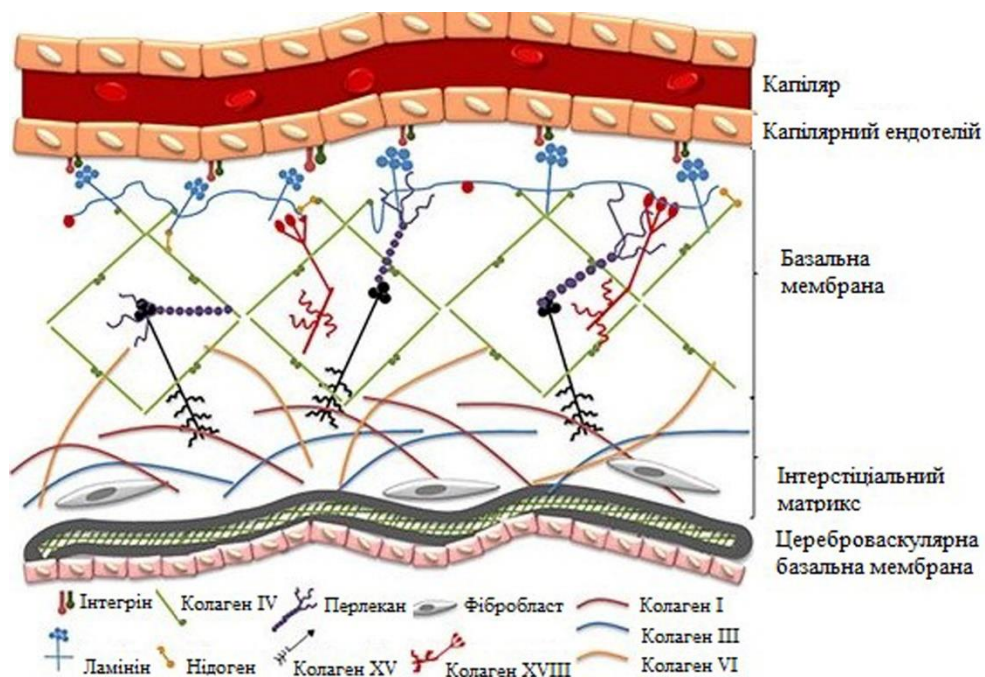


Рис. 28 Структура базальної мембрани

Однак, при запальних станах, продукція компонентів БМ може змінитися. Дослідження розподілу декількох компонентів БМ, у тому числі ламініна, колагена типу IV і гепарансульфат протеогліканів за різних

порушень, обумовлених розсіяним склерозом, виявили певну закономірність між зміною складових базальної мембрани та розвитком розсіяного склерозу (РС) (Dulamea, 2017). В активних осередках РС виявлено щільну мережу протеїнів базальної мембрани. Ці паренхіматозні мережі не спостерігаються при хронічних ураженнях неактивного РС і не неврологічного ушкодження. Досліджено також розподіл трансформуючого фактору росту-бета1 (ТФР-β1), так як він відомий як модулятор продукції ЕЦМ. Лейкоцити, зокрема, CD68-позитивні макрофаги, мають високий рівень ТФР-β1 і розташовані в безпосередній близькості від паренхіматозної БМ. Такі мережі можуть відігравати певну роль у подальшому ураженні запальних клітин і утворюють бар'єр для регенерації аксонів.

Ремієлінізація, як потенційне лікування демієлінізуючих захворювань, таких, як розсіяний склероз, вимагає детальних знань аксогліальних взаємодій, що регулюють диференціацію олігодендроцитів з клітин-попередників. Досліджено, що деякі ізоформи нейрофасцина, NF155, який є одним із регуляторів такої взаємодії. Хоча загальна продукція NF155 не змінюється, імунореактивність NF155 може збільшуватися, що вказує на розширення доступності NF155 епітопів. Фібронектин впливає на внутрішньоклітинний розподіл і мембранну асоціацію NF155 в олігодендроцитах на початку розвитку. Фібронектин і асоціація NF155 інгібують морфологічну диференціацію олігодендроцитів. Показано, що асоціація NF155 знижена в спинному мозку щурів. Отримані результати свідчать, що асоціація NF155 для мікродоменів у мембрані олігодендроцитів необхідна для участі в міжмолекулярних взаємодіях, що є важливими для мієлінізації та мієлінової цілісності (Lipí, 2018).

4.5 Особливості міжклітинних контактів гладенької мускулатури

Гладенькі м'язи – скоротна тканина, на відміну від поперечносмугастих м'язів, не має поперечної смугастості. У деяких безхребетних гладкі м'язи утворюють всю мускулатуру тіла. У хребетних вони входять до складу оболонок внутрішніх органів: кишківника, кровоносних судин, дихальних шляхів, видільних і статевих органів, а також багатьох залоз. Це тканина ентомезенхімного походження, яка ділиться на два види: вісцеральну і судинну. В ембріональному гістогенезі навіть електронно-мікроскопічно важко відрізнити мезенхімні попередники фібробластів від гладеньких міоцитів. У малодиференційованих гладеньких міоцитах розвинені гранулярна ендоплазматична сітка, комплекс Гольджі. Тонкі філаменти орієнтовані вздовж довгої осі клітини (рис. 29).

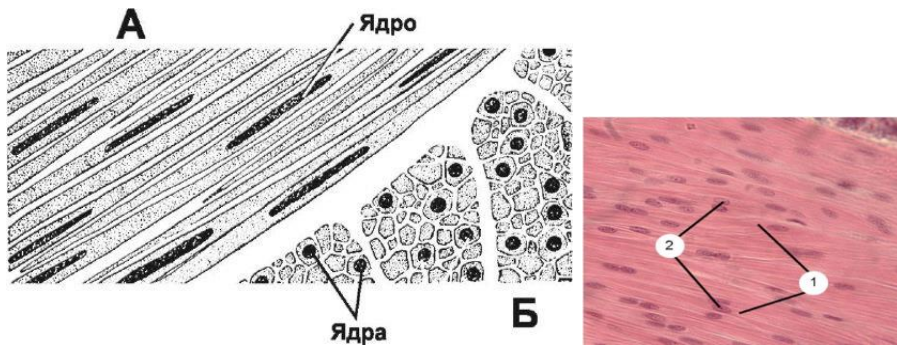


Рис. 29 Схема та гістологічний зріз гладеньком'язової тканини

А – продольний розріз, Б – сагітальний розріз, 1 – гладеньком'язові клітини,
2 – паличкоподібні ядра

У міру розвитку розміри клітини і число філаментів в цитоплазмі зростають. Поступово обсяг цитоплазми, зайнятий скорочувальними філаментами, збільшується, розташування їх стає все більш впорядкованим. Проліферативна активність гладеньких міоцитів в міогенезі поступово знижується. Це відбувається в результаті збільшення тривалості клітинного циклу, виходу клітин з циклу репродукції й переходу в диференційований стан.

Однак і в дефінітивному стані у гладенькій м'язовій тканині клітинна регенерація у вигляді розмноження міоцитів повністю не припиняється. Існують дані про те, що проліферація і диференціювання більшою мірою властива субпопуляції малих (за розмірами) гладеньких міоцитів.

Структура дефінітивних гладеньких міоцитів (лейкоміоцитів), що входять до складу внутрішніх органів і стінки судин, має багато спільного, але в той же час характеризується гетероморфією. Так, у стінках вен і артерій виявляють овоїдні, веретеноподібні міоцити з відростками довжиною 10-40 мкм, що доходять іноді до 140 мкм. Найбільшої довжини гладенькі міоцити досягають в стінці матки – до 500 мкм. Діаметр міоцитів коливається від 2 до 20 мкм. Залежно від характеру внутрішньоклітинних біосинтетичних процесів розрізняють контрактильні та секреторні міоцити. Перші спеціалізовані на функції скорочення, але разом з тим зберігають секреторну активність. Плазмолема послабленої клітини має рівну поверхню, а при скороченні стає складчастою. У центрі клітини мається паличкоподібне ядро, яке при скороченні клітини спіралевидно згинається. Практично всі ядра міоцитів містять диплоїдну кількість ДНК. Гладенька ендоплазматична сітка займає приблизно 2-7 % обсягу цитоплазми, а

гранулярна сітка в контрактильних міоцитах виражена погано. Мітохондрії дрібні, сферичні або овоїдні, розташовані біля полюсів ядра (рис. 30).

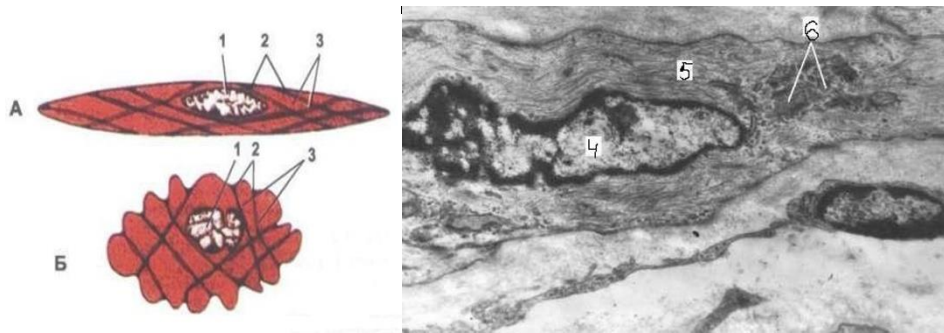


Рис. 30 Структура гладеньких міоцитів

А – стан послаблення; Б – стан скорочення; 1 – ядро; 2 – щільні тільця, що прикріплені до цитолемі; 3 – проміжні міофіламенти; 4 – ядро; 5 – цитоплазма з міофіламентами; 6 – комплекс Гольджі

Характерною ознакою гладеньких міоцитів є наявність безлічі кавеол плазмолемі, що містять йони Кальцію.

Секреторні міоцити (синтетичні) за своєю ультраструктурою нагадують фібробласти, проте містять в цитоплазмі пучки тонких міофіламентів, розташованих на периферії клітини. У цитоплазмі добре розвинені комплекс Гольджі, гранулярна ендоплазматична сітка, багато мітохондрій, гранул глікогена, вільних рибосом і полісом. За ступенем зрілості такі клітини відносять до малодиференційованих.

Скорочувальний апарат міоцитів представлений тонкими актиновими філаментами (гладеньком'язовим альфа-актином), пов'язаного з тропоміозином. Товсті нитки складаються з міозина, мономеру якого розташовуються поблизу філаментів актина. Співвідношення актинових і міозинових філаментів в гладенькому міоциті становить 12 до 1. Важливим компонентом контрактильного (скорочувального) апарату міоцитів є електронно-щільні структури – тільця прикріплення, розташовані вільно в цитоплазмі (щільні тільця) або тісно пов'язані з плазмолемою. Основними білковими компонентами щільних тілець є альфа-актинін, актин (нем'язовий) і кальпонін, що дозволяє розглядати їх як функційний еквівалент Z-ліній міофібрил скелетних м'язів. Актинові філаменти фіксуються на щільних тільцях. Проміжні філаменти, що включають десмін і віментин, забезпечують зв'язки між щільними тільцями і плазмолемою, утворюючи прикріплюючі пластини.

Скоротливі протеїни формують гранчасту структуру, закріплену по колу плазмолемі, тому скорочення виражається в скороченні клітини, яка

набуває складчасту форму, тоді як у стані спокою клітина витягнута. При виникненні нервового імпульсу, що поширюється по плазмолемі міоцита, відбувається підвищення рівня внутрішньоклітинного Ca^{2+} , який надходить у цитоплазму з кавеол, виходить у цитоплазму у вигляді бульбашок. Вивільнення йонів Кальцію призводить до каскаду реакцій, в результаті якого відбувається полімеризація міозина і утворення перехресних зв'язків міозина уздовж актинових філаментів у міру розвитку м'язового скорочення. Послаблення м'яза виникає при відновленні концентрації вихідного рівня Ca^{2+} всередині клітини шляхом його переміщення всередину саркоплазматичної сітки. При цьому утворений в присутності йонів Кальцію зв'язок між актином і міозином порушуються, актин-міозиновий комплекс розпадається, гладенький міоцит розслабляється. Гладенькі міоцити синтезують протеоглікани, глікопротеїди, проколаген, проеластін, з яких формуються колагенові і еластичні волокна і основна речовина міжклітинного матрикса.

Гладенька м'язова тканина вісцерального та судинного видів має значну чутливість до впливу екстремальних факторів. У активованих міоцитах зростає рівень біосинтетичних процесів, морфологічним вираженням яких є синтез скоротливих протеїнів, укрупнення і гіперхроматоз ядра, гіпертрофія ядерця, зростання показників ядерно-цитоплазматичних відносин, збільшення кількості вільних рибосом і полісом, активація ферментів аеробного і анаеробного фосфорилування, мембранного транспорту. Клітинна регенерація здійснюється як за рахунок диференційованих клітин, що мають здатність вступати в мітотичний цикл, так і за рахунок активізації камбіальних елементів (міоцитів малого обсягу). При дії ряду факторів відзначається фенотипічна трансформація контрактильних міоцитів у секреторні. Дана трансформація часто спостерігається при пошкодженні інтими судин, формуванні її гіперплазії при розвитку атеросклерозу.

Взаємодія міоцитів здійснюється за допомогою цитоплазматичних мостиків, нексусів, десмосом або ділянок простих мембранних контактів клітинних поверхонь (рис. 31).

Десмосоми – міжклітинні контакти, діаметром до 0,5 мкм, їх функційна роль базується, головним чином, у механічному зв'язку між клітинами. Існують три типи десмосом: точкові, опоясувальні і напівдесмосоми, які міцно склеюють клітини. Якщо вони утворюються між клітинами і позаклітинним матриксом, то вони називаються напівдесмосомами. Кількість десмосом на одній клітині може досягати 2000 (Kowalczyk, 2013).

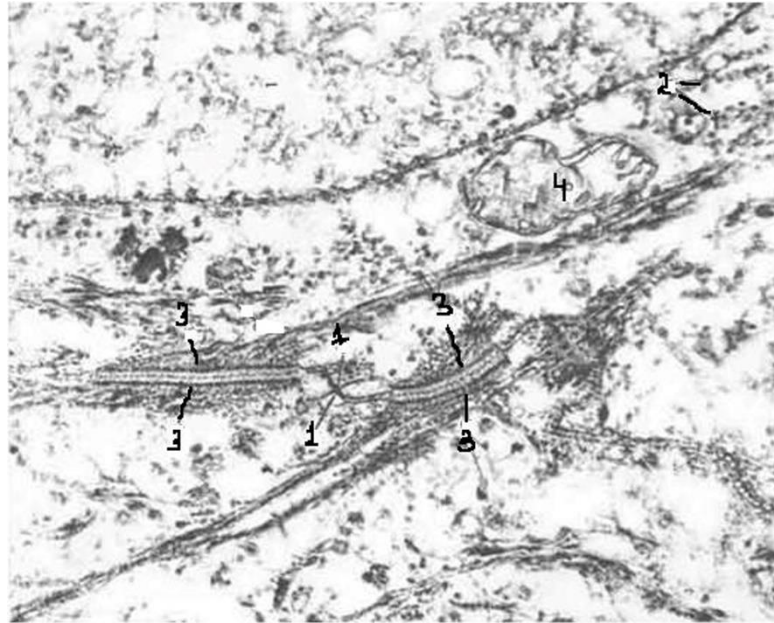


Рис. 31 Схема міжклітинних контактів

1 – клітинна мембрана; 2 – рибосоми; 3 – десмосоми; 4 – мітохондрії

Десмосома складається з протеїнів клітинної адгезії з сімейства кадгеринів і сполучних (адапторних) протеїнів, які з'єднують їх з проміжними філаментами. Протеїни клітинної адгезії, що формують десмосоми – десмоглеїн і десмоколін. Як і інші кадгерини, ці трансмембранні протеїни мають по п'ять позаклітинних доменів і вони відносяться до кальційзв'язувальних протеїнів. Вони забезпечують гомофільні контакти клітин – між собою з'єднуються дві однакові за будовою молекули протеїна. Тип проміжних філаментів залежить від типу клітин: у більшості епітеліальних клітин вони кератинові, а в клітинах серцевого м'яза – десмінові. З порушенням функції десмосом пов'язані шкірні хвороби, які об'єднані під назвою «пухирчатка».

Щілинні контакти або нексуси мають важливе значення для різних функцій багатоклітинних тварин, які вимагають високого ступеня координації між клітинами. У хребетних щілинні контакти складаються з каналів, так званих коннексонів («подвійні» пори, які утворюються за рахунок суміщення пор одна з одною, які належать мембранам двох клітин, вони складаються з протеїнів коннексинів). У геномі людини ідентифікований 21 ген щілинних контактів. Функції щілинних контактів дуже різноманітні і включають в себе обмін метаболітів і електричних сигналів між клітинами, а також функції, які, мабуть, не пов'язані з міжклітинними взаємодіями. В області нексуса мембрани сусідніх клітин зближені, відстань між ними становить 2-4 нм (Nielsen, 2012).

Протеїни коннексини (Cx) – протеїни, які забезпечують координацію клітинної поведінки. В гладеньком'язових клітинах присутні Cx40, Cx37 і Cx43. Це основні протеїни щільних контактів серед гладеньком'язових клітин судин, регулюють рух йонів та інших сигнальних молекул через щільні міжклітинні взаємодії і грають важливу роль в підтримці нормального функціонування судин, проте сигнальні механізми, які контролюють Cx43 у гладеньком'язових клітинах, чітко не описані. Встановлено, що в гладеньком'язових клітинах судин також експресується Cx45, але не у всіх судинах, а тільки в артеріолах. Дуже важливу роль відіграють коннексини при розвитку атеросклерозу. Особливо підвищується рівень Cx43 при розвитку раннього атеросклерозу (Schmidt, 2012; Pfenniger, 2012; Joshi, 2012).

Артеріальні гладеньком'язові клітини (ГМК) зазвичай розташовані в артеріальній стінці в диференційованій скорочувальній формі. Різні пошкодження, викликані, наприклад, пластичною операцією на судинах, стентуванням або хронічні стани, наприклад, атеросклероз, призводять ГМК у менш диференційований стан, який часто називають дедиференційованим, синтетичним або проліферативним. Такі ГМК можуть реагувати на фактори росту, мігрувати і розмножуватися. У той же час, вони втрачають декілька маркерів диференціювання цитоскелета, здатність реагувати на скоротливі стимули і скорочення судин.

Давно відомо, що існує зворотний зв'язок між проліферацією ГМК і експресією маркерів диференціювання цитоскелета. Дуже важливе розуміння фактів, регулюючих диференціювання ГМК, оскільки, підтримання в нормальній диференціації ГМК запобігло б повторний стеноз під час пластичної операції на судинах і розвиток незворотних атеросклеротичних уражень, які характеризуються проліферацією і міграцією цих клітин.

Одним з важливих чинників, що визначає диференціацію ГМК є позаклітинний матрикс, який оточує ці клітини. ГМК, які виділені із стінки артерії і покриті ламініном, зберігають свій диференційований фенотип більшою мірою, ніж гладеньком'язові клітини, які покриті фібронектином. Цікаво, що позаклітинний матрикс, який оточує ГМК, регулює не тільки диференціацію цих клітин, але також визначає, чи здатна клітина реагувати на дію факторів росту, таких як тромбоцитарний фактор росту. Позаклітинний матрикс при атеросклерозі і стенозі різко змінюється і була висунута теорія, що такі зміни передують дедиференціації, проліферації і міграції ГМК. Позаклітинний матрикс контролює фенотип цих клітин за допомогою великої кількості інтегринів та інших молекул адгезії. Протеїни

позаклітинного матрикса, які допомагають підтримувати диференційований фенотип, наприклад, фібрилярний колаген 1-го і 4-го типу, так само, як і інтегрини, експресуються в нормальних непошкоджених судинах.

Інтегрин $\alpha 7\beta 1$ відноситься до групи інтегринів, які беруть участь у диференціюванні ГМК. Цей протеїн продукт гена ITGA7. Але ліганд, який відповідає за цей ефект, ще не був ідентифікований. Порушення гена ITGA7 призводить до вродженої м'язової дистрофії, яка проявляється в перші місяці життя гіпотонією, м'язовою слабкістю і контрактурою суглобів (Raines, 2010).

Показано, що інтегрин $\alpha 7\beta 1$ опосередковує диференціацію ГМК через тромбоспондин 5 (адгезивний протеїн тромбоцитів). Інтегрин $\alpha 7\beta 1$ є рецептором для ламініна. С іншого боку, інтегрини, які сприяють дедиференціації ГМК, часто вже не експресуються за нормальних умов. Так, наприклад, рецептор фібронектина, $\alpha 5\beta 1$ не експресується в судинах *in vivo*, тим не менше, після пошкодження або травм, $\alpha 5\beta 1$ посилює свою активність в менш диференційованих ГМК. Крім того, колаген 8, який не є складовою частиною нормальної стінки судин, регулює тканину, стимулюючи міграцію ГМК і беручи участь у синтезі матричної металопротеїнази. Вітронектин є компонентом плазми, проникає в стінку судини після травми або ендотеліальної дисфункції *in vitro* і викликає втрату скоротливості через інтегрин $\alpha 5\beta 1$. Таким чином, інтегрини через взаємодію з компонентами міжклітинного матрикса, деякі з яких динамічно змінюються після різних ушкоджень, можуть контролювати диференціацію фенотипу гладеньком'язових клітин.

Серед важливих факторів регуляції стану ГМК є одні із глікозаміногліканів міжклітинного матрикса – гіалуронова кислота (ГК). Рівень ГК збільшується у позаклітинному матриксі за атеросклеротичних пошкоджень і є особливо видним в період ранніх ушкоджень, де є активне швидке збільшення і переміщення клітини. ГК також присутня в областях ушкоджень, які містять макрофаги і лімфоцити і можуть слугувати субстратом для цих клітин через взаємодії з рецепторами ГК, такими, як CD44.

Гіалуронова кислота, разом із версіканом, накопичується в зонах пошкодження протягом місяців після атеректомії. Ці молекули займають великі області, заповнені розчином, у межах ушкоджень, які характеризуються відсутністю інших молекул ЕЦМ. Дослідження *in vitro* показали, що ГК добре помітна навколо гладеньких м'язових клітин і збільшена у відповідь на запальні цитокіни, такі як фактор некрозу пухлини- β (ФНП- β) і фактор росту тромбоцитів (ФРТ). Блокування зв'язування ГК з

поверхнею гладеньких м'язових клітин за допомогою олігосахаридів гальмує швидке збільшення і переміщення цих клітини у відповідь на ФРТ. Участь ГК в ранніх фазах судинної хвороби передбачає, що дослідження молекулярних механізмів метаболізму ГК може розкрити корисну стратегією для запобігання розвитку атеросклерозу та рестенозу (Вайт, 2009).

Гіалуронова кислота накопичується на різних стадіях при атеросклерозі і рестенозі. Атеросклероз – хвороба мускульних і пружних артерій, яка розвивається протягом декількох десятиліть життя. Атеросклеротичне пошкодження складається з рельєфних фокусних бляшок, які мають ліпідне ядро, оточене ЕЦМ і клітинами так само, як відкладенням кальцію. З часом розмір бляшок збільшується і це може призвести до розриву, приводячи також до згортання і формуванню тромбу. Присутність ГК впливає на біомеханічні властивості цих бляшок, їх цілісність і стабільність. Неясно, чи є накопичення ГК раннім або пізнім випадком у розвитку атеросклеротичного пошкодження та/або чи регулює ГК події, які сприяють формуванню цих ушкоджень.

З'ясовано, що експериментальне поранення кровоносної судини зондовим катетером у тварин, що знаходились на дієті з високим вмістом жирів, змусило атеросклеротичні ушкодження формуватися передбачуваним способом з тимчасової залежністю. Пошкодження, які сформувалися охарактеризовані змінами у складі ЕЦМ, які включали ГК і молекули, що зв'язуються з нею, наприклад, такі, як версікан, рецептор CD44 і TSF-6. Такі дослідження припускають, що ГК може впливати на швидке збільшення гладеньких м'язових клітин і переміщення їх за розвитку атеросклерозу.

Швидке розширення рестенозних пошкоджень може в значній мірі статися через зміни, які створюються ГК та молекулами, що з нею зв'язуються. Втрата або розщеплення ГК можуть призвести до зневоднення, викликаючи стиснення тканини і скорочення артеріальної окружності. Таким чином, це перетворення може залучити компоненти ЕЦМ у процес формування шраму.

Гіалуронова кислота синтезується клітинами артеріальної стінки: клітинами ендотелію, гладенькими м'язовими клітинами і адвентиціальними фібробластами. Як і в інших типах клітин, синтез ГК підвищений, коли гладенькі артеріальні м'язові клітини стимулюються, щоб ділитися й мігрувати. Ці результати плюс спостереження за гладенькими м'язовими клітинами, що діляться і мігрують в травмованих і рестенозних

артеріях, припускають, що ГК грає фундаментальну роль у швидкому збільшенні розмірів гладеньких м'язових клітин і їх переміщенні.

Цитокіни, такі як ФРТ, стимулюють швидке збільшення і переміщення гладеньких м'язових клітин, збільшують формування позаклітинного матрикса і подальшу взаємодію ГК з версіканом. Таким чином, ГК-комплекси важливі для швидкого збільшення і переміщення, дестабілізують здатність клітини до прилипання і полегшують зміни у формі клітини.

Міграція судинних гладеньком'язових клітин – це важлива клітинна подія в різних судинних захворюваннях, включаючи атеросклероз і рестеноз. Мало що відомо про вплив протизапальних інтерлейкінів на міграцію ГМК. Були проведені дослідження з перевірки гіпотези того, що інтерлейкін 19 (ІЛ-19) може привести до зниження рухливості ГМК. ІЛ-19 значно зменшив міграцію ГМК і скоротив поширеність ГМК у відповідь на тромбоцитарний фактор росту. Щоб визначити молекулярний механізм для цих клітинних ефектів, також досліджувався вплив ІЛ-19 на активацію протеїнів цитоскелета, які регулюють динаміку і пересування ГМК. ІЛ-19 зменшив активацію декількох регуляторних протеїнів цитоскелета, які відіграють важливу роль у рухливості клітин, це такі регуляторні протеїни, як протеїн теплового шоку – 27 (HSP27), легкий ланцюг міозина (MLC) і кофілін. Цю активацію посилював тромоцитарний фактор росту. Також ІЛ-19 знижував активацію протеїнів сімейства Rac1 і RhoA, які є важливими перемикачами міграційних сигналів і грають важливу роль в клітинній проліферації, апоптоза, експресії генів і в безлічі інших спільних клітинних функціях. Ці дані першими показують, що ІЛ-19 може мати важливу інгібуючу дію на моторику ГМК судин і активацію регуляторних протеїнів цитоскелета. Це має важливе значення для використання протизапальних цитокінів в лікуванні оклюзійних захворювань судин (Gabunia, 2011).

Хірургічні процедури з видалення атеросклеротичних уражень і відновлення кровотоку може пошкодити стінку артерій, сприяючи фенотипічним змінам, проліферації та міграції гладеньком'язових клітин, а також стенозу артерій. Тому визначення ефективних антистенозних факторів є пріоритетним завданням для дослідження цих клітин при серцево-судинних захворюваннях.

У дослідженнях *in vitro* вивчали ефекти шаруватих подвійних гідроксидів в якості системи доставки ліків для боротьби зі стенозом в комплексі з низькомолекулярним гепарином. Цитотоксичні тести показали, що шаруваті подвійні гідроксиди самі мали дуже обмежену токсичність при концентрації нижче 50 мкг/мл протягом 6 діб інкубації. Гідроксидні

наночастинки, завантажені низькомолекулярним гепарином були протестовані на судинних гладеньком'язових клітинах щурів. Після 3-7 днів інкубації встановлено, що кон'югати гідроксидів з низькомолекулярним гепарином збільшили свою здатність інгібувати проліферацію та міграцію клітин на 60 %, порівняно з контрольною групою. Клітинні дослідження показали, що шаруваті подвійні гідроксиди разом з низькомолекулярним гепарином проявляли більшу біологічну функцію на гладеньком'язові клітини в перебігу тривалого часу, ніж без гепарина. Отримані результати свідчать про можливість застосування кон'югатів шаруватих подвійних гідроксидів і гепарина в якості ефективного препарату для лікування стенозів (Gu, 2010).

Гепарансульфат у великій кількості присутній у позаклітинному матриксі гладенької мускулатури і на поверхні клітин. У структурі гепарансульфата був видалений фермент NN-діацетилаза-сульфотрансфераза 1, що призводило до зниження сульфатації ланцюга гепарансульфата в гладеньком'язових клітинах. Видалення цього фермента призвело до зниження проліферації цих клітин в стеговій артерії у дорослих і новонароджених мишей. У відповідь на пошкодження судин у мишей, які були позбавлені фермента NN-діацетилаза сульфотрансфераза 1, спостерігали значне зниження ураження судини. Таким чином, ці дані дають нові докази того, що зміни в структурі гепарансульфата значно знижує проліферацію гладеньком'язових клітин, а також змінює ремоделювання судин (Adhikari, 2010).

Взаємодія клітин в судинах відбувається через рецептори на поверхні клітини і відіграє дуже важливу роль у зборці та підтримці судин. Ці сигнальні взаємодії передають важливу інформацію, яка змінює функції клітин шляхом зміни динаміки протеїнів та експресії генів. Були проведені роботи по дослідженню сіндекана-2, експресія гена якого індукується в гладеньком'язових клітинах при фізичному контакті з ендотеліальними клітинами.

Сіндекан-2 – це протеоглікан, є дуже важливим для багатьох процесів, у тому числі для ангиогенеза. Виявлено, що ендотеліальні клітини індують експресію мРНК сіндекана-2 в клітинах гладеньких м'язів шляхом активації рецептора Notch. Розглядали 2 рецептори, Notch 2 і Notch 3, які підвищували експресію сіндекана-2, а також самі по собі були незалежними від ендотеліальних клітин. Сімейство сіндеканів слугує рецептором для передачі сигналів між молекулами. Доведено, що сіндекан-2 регулюється рецептором Notch 2 і фізично взаємодіє з Notch 3. За відсутності цих рецепторів, діяльність сіндекана-2 в гладеньком'язових

клітинах послаблюється, а разом з цим і припиняється експресія α -актина, який є маркером диференціювання гладеньких м'язів. Ці результати показують новий механізм, в якому рецептори Notch контролюють свою активність через експресію сіндекана-2, що бере участь в сигнальних механізмах гладеньком'язових клітин (Zhao, 2012).

4.6 Вплив позаклітинного матрикса на гладеньком'язові клітини лейоміоми та міоми матки

Лейоміома матки – це доброякісна пухлина, яка виникає в більшості випадків у жінок репродуктивного віку. Незважаючи на високу поширеність цих пухлин, мало що відомо про їх етіологію. Відмінною рисою лейоміоми є надлишкове відкладення позаклітинного матрикса, в основному колагенів 1 і 3 типу. Відомо, що колагени особливо модулюють клітинну поведінку і функціонують через взаємодії з інтегринами та факторами росту (Koohestani, 2013).

Щоб краще зрозуміти патогенез лейоміоми матки і роль колагенів позаклітинного матрикса у її рості, проведені дослідження по взаємодії пухлинних гладеньком'язових клітин лейоміоми з двома різними формами колагена: з неполяризованим колагеном (мономірним) і фібрилярним колагеном, у відсутності і присутності тромбоцитарного фактору росту. Первинні культури лейоміоми матки людини були отримані від пацієнтів і вирощені з двома різними колагенами окремо, також оцінювали клітинну проліферацію і сигнальні шляхи. Результати показали, що клітини гладеньких м'язів лейоміоми мали різну морфологію в присутності різних колагенів, а також фактори росту тромбоцитів по-різному стимулювали проліферацію клітин. Ці відмінності в проліферації супроводжувалися змінами клітинного циклу і білку p21, який є внутрішньоклітинним білком-інгібітором клітинного циклу (інгібітор циклінзалежної кінази, відіграє критичну роль у клітинній відповіді на пошкодження ДНК). Крім цього, виявлені зміни в фосфорилуванні адгезійної кінази і цитоскелеті, також виявлена активація мітоген-кінази, яка бере участь у сигнальному шляху. Отже, можна сказати, що результати демонструють прямий вплив позаклітинного матрикса на проліферацію гладеньком'язових клітин лейоміоми матки через взаємодію різних колагенів і тромбоцитарного фактору росту.

Міома матки – це доброякісна, вельми різноманітна і, як правило, множинна пухлина, яка росте з незрілих міоцитів судинної стінки. Міома матки розвивається з м'язової клітини. До теперішнього часу є різні погляди

на природу цього захворювання: істинна пухлина або так зване пухлиноподібне утворення, яке представляє собою гіперпластичний процес міометрія. За даними ряду клініко-морфологічних досліджень, проста міома матки є доброякісною, неактивною, повільно зростаючою пухлиною з перевагою сполучнотканинних елементів, фенотипічною трансформацією міоцитів і зниженням кровотоку в міометрії і міоматозних вузлах.

Безсумнівно, міома матки є гормонозалежною пухлиною. До теперішнього часу не відомі механізми, що запускають ріст пухлини, але, безсумнівно, центральна роль статевих стероїдів – естрогена, прогестерона та їх рецепторів у моделюванні росту, диференціюванні і функції міометрія. Відомо, що ключову роль у контролі росту і розвитку міоматозних вузлів грають естрогени. Іншим потенційним механізмом утворення міоми матки є гальмування механізмів апоптоза. Таким чином, розвиток проліферативних процесів, до яких належить і міома матки, обумовлене не тільки підвищеною проліферацією клітин, але, можливо, і ослабленням індукції апоптоза.

У реалізації впливу статевих стероїдів беруть участь місцеві ауто-і паракринні фактори (фактори росту, цитокіни та ін), продукція яких перебуває під контролем естрогенів і прогестерона. Мітогенну дію естрогенів опосередковано місцевими регулюючими факторами росту. результатом їх надлишкової продукції є прискорення клітинної проліферації, гіпертрофія клітин, збільшення обсягу міжклітинного матрикса і нерідко відзначається поєднання цих явищ. Найбільш значимими факторами росту для міоми є трансформуючий фактор росту-бета, стимулюючий вплив на продукцію якого надає також і прогестерон. Естрогени діють і на міжклітинний матрикс, надаючи безпосередній стимулюючий вплив на колаген типу I і III і протеїн коннексин-43 щільних міжклітинних контактів.

Таким чином, стероїдні гормони можуть надавати стимулюючий вплив на проліферацію пухлинної тканини шляхом впливу і на місцеві фактори росту, які продукуються гладенькими м'язовими клітинами і фібробластами. Вплив медіаторів різних факторів клітинного росту, також як і статевих стероїдів, здійснюється через клітинні рецептори, концентрація і чутливість яких грають важливу роль в регуляції пухлинного росту. Основними модуляторами клітинного росту, що мають виражену мітогенну властивість на міометрії і тканину міоми, є інсуліноподібний фактор росту 1 (ІПФР-1), епідермальний фактор росту (ЕФР), трансформуючий фактор росту-бета (ТФР-бета) і група ангіогенних факторів росту (Сидорова, 2012).

Таким чином, численні дослідження, присвячені патогенезу даного захворювання, виявили ряд факторів росту і рецепторів, що впливають на проліферацію гладеньком'язових клітин, апоптоз, продукцію міжклітинної речовини, на проліферацію та міграцію ендотеліоцитів, що грають важливу роль у процесі розвитку пухлини. Отримані наукові дані внесли не тільки певну ясність у розуміння механізмів росту міоми матки, але намітили нові напрямки в медикаментозному лікуванні.

Adhikari, N., Basi, D.L. & Townsend, D. (2010) Heparan sulfate Ndst1 regulates vascular smooth muscle cell proliferation, vessel size and vascular remodeling. *J Mol. Cell Cardiol.* 4, 4–15.

Anglade, P. & Larabi – Godinot, Y. (2010) Historical landmarks in the histochemistry of the cholinergic synapse, Perspectives for future researches. *Biomed. Res.*, 31(1), 1–12.

Basu, R. & Sarma, J.D. (2018) Connexin 43/47 channels are important for astrocyte/oligodendrocyte cross – talk in myelination and demyelination. *J Biosci*, 43(5), 1055–1068.

Berken, A., Abel, J. & Unfried, K. (2003) beta1 – integrin mediates asbestos – induced phosphorylation of AKT and ERK1/2 in a rat pleural mesothelial cell line. *Oncogene*. 2003, 228524–8528.

Bosone, C., Andreu, A. & Echevarria, D. (2016) GAP junctional communication in brain secondary organizers. *Dev Growth Differ*, 58(5), 446–455.

Bruneau, B.G. (2013). Signaling and transcriptional networks in heart development and regeneration. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5,a008292.

Burden, S.J., Huijbers, M.G. & Remedio, L. (2018) Fundamental Molecules and Mechanisms for Forming and Maintaining Neuromuscular Synapses. *Int J Mol Sci*, 19(2). pii, E490. doi, 10.3390/ijms19020490.

Dulamea, A.O. (2017) Role of Oligodendrocyte Dysfunction in Demyelination, Remyelination and Neurodegeneration in Multiple Sclerosis. *Adv Exp Med Biol*, 958, 91–127.

Elias, L.A., Wang, D.D. & Kriegstein, A.R. (2007) Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature*, 448(7156), 901–907

Engel, A.G. (2012) Current status of the congenital myasthenic syndromes. *Neuromuscul Disord.*, 22(2), 99 – 111.

Fox, M.A., Ho, M.S., Smyth, N. & Sanes, J.R. (2008) A synaptic nidogen, developmental regulation and role of nidogen – 2 at the neuromuscular junction. *Neural. Dev.*, 25, 3–24.

Ferraro, E., Molinari, F. & Berghella, L. (2012) Molecular control of neuromuscular junction development. *Cachexia Sarcopenia Muscle*, 3 (1), 13–23.

Franklin, R.J., Ffrench – Constant, C., Edgar, J.M. & Smith, K.J. (2012) Neuroprotection and repair in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*, 8(11), 624–634.

Gabunia, K., Jain, S. & England, R.N. (2011) Anti – inflammatory cytokine interleukin – 19 inhibits smooth muscle cell migration and activation of cytoskeletal regulators of VSMC motility. *Am J Physiol Cell Physiol*. 4, 23–36.

Gu, Z. & Thomas, A.C. (2010) Enhanced effects of low molecular weight heparin intercalated with layered double hydroxide nanoparticles on rat vascular smooth muscle cells. *Biomaterials*. 20, 10–17.

- Jiao, Q., Li, X., An J., Zhang Z., Chen, X., Tan, J., Zhang, P., Lu, H. & Liu, Y. (2017) Cell – Cell connection enhances proliferation and neuronal differentiation of rat embryonic neural stem/progenitor cells. *Front Cell Neurosci*, 200.doi, 10.3389/fncel.2017.00200.
- Joshi, C.N., Martin, D.N. & Shaver, P. (2012) Control of vascular smooth muscle cell growth by connexin 43. *Front Physiol.*, 11, 33 – 40.
- Kleopa, K.A., Orthmann – Murphy, J., Sargiannidou, I. (2010). Gap junction disorders of myelinating cells. *Rev Neurosci*. 2010; 21(5), 397–419.
- Kleopa, K.A, & Sargiannidou, I. (2015). Connexins, gap junctions and peripheral neuropathy. *Neurosci Lett*, 596, 27–32.
- Koohestani, F., Braundmeier, A.G. & Mahdian, A. (2013) Extracellular matrix collagen alters cell proliferation and cell cycle progression of human uterine leiomyoma smooth muscle cells. *PLoS One.*, 5, 22–35.
- Kowalczyk, A.P. & Green, K.J. (2013) Structure, function, and regulation of desmosomes. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 13, 18–31.
- Leybaert, L., Lampe, P.D., Dhein, S., Brenda R., Kwak B.R., Ferdinandy, P., Beyer, E.C., Laird, D.W., Naus, C.C., Colin R., Green, R.C. & Schulz, R. (2017) Connexins in Cardiovascular and Neurovascular Health and Disease, Pharmacological Implications. *Pharmacol Rev*, 69(4), 396–478
- Lipi, B., Jaldeep, L., & Prakash, P. (2018) Role of astrocytic MeCP2 in regulation of CNS myelination by affecting oligodendrocyte and neuronal physiology and axo – glial interactions. *Exp Brain Res*, 236(11), 3015–3027.
- Lorenzon, A., Calore, M., Poloni, G., De Windt, L.J., Braghetta, P. & Rampazzo, A. (2017) Wnt/ β – catenin pathway in arrhythmogenic cardiomyopathy. *Oncotarget*, 8(36), 60640–60655.
- Lupa, M.T. & Hall, Z.W. (2008) Progressive restriction of synaptic vesicle protein to the nerve terminal during development of the neuromuscular junction. *J. Neurosci.*, 9(11), 3937–3945.
- Majidinia, M., Aghazadeh, J., Jahanban – Esfahlani R. & Yousefi, B. (2018) The roles of Wnt/ β – catenin pathway in tissue development and regenerative medicine. *J Cell Physiol*, 233(8), 5598–5612.
- Maselli, R.A., Arredondo J. & Ferns M.J. (2012) Synaptic basal lamina – associated congenital myasthenic syndromes. *of Neurology*. 1275, 36–48.
- Molgó J., Colasante C. & Benoit E. (2009) A reminder of the structure and function of the skeletal neuromuscular junction. *Dermatol Venereol.*, 4, 55–60.
- Mu, L.M., Wang, W.F., Zheng, H., Guo, Z.K. & Zhang, G.M. (2015) Expression of N – cadherin in myocardial tissues during the development of a rat heart. *Genet Mol Res*, 14(3), 9882–9891.
- Nielsen MS. & Axelsen N. (2012) Gap junctions. *Compr Physiol*, 7, 3–14.
- Nitkin, R.M., Wallace, B.G., Spira, M.E., Godfrey, E.W, & McMahan, U.J. (1983) Molecular components of the synaptic basal lamina that direct differentiation of regenerating neuromuscular junctions. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 48(2), 653–665.
- Oas, R.G., Nanes, B.A., Esimai, C.C., Vincent, P.A., García, A.J. & Kowalczyk, A.P. (2013) p120 – catenin and β – catenin differentially regulate cadherin adhesive function. *Mol Biol Cell*, 24(6), 704–714.
- Pfenniger, A., Chanson, M. & Kwak, B.R. (2012) Connexins in atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta*, 3, 18–26.

Piven, O.O. & Winata, C.L. (2017) The canonical way to make a heart, β – catenin and plakoglobin in heart development and remodeling. *Exp Biol Med* (Maywood), 242(18), 1735–1745.

Raines, E.W. & Bornfeldt, K.E. (2010) Integrin $\alpha(7)\beta(1)$ COMPels smooth muscle cells to maintain their quiescence. *Circ Res.*, 15, 22–24.

Rogers, R.S. & Nishimune, H. (2017) The role of laminins in the organization and function of neuromuscular junctions. *Matrix Biol*, 57–58, 86–105.

Singhal, N. & Martin, P.T. (2011) Role of extracellular matrix proteins and their receptors in the development of the vertebrate neuromuscular junction. *Dev. Neurobiol.* 71(11), 982–1005.

Schmidt, V.J., Jobs, A. & Worsdorfer, P. (2012) Connexin 45 is expressed in vascular smooth muscle but its function remains elusive. *PLoS One*, 3, 7–13.

Sheikh, F., Ross, R.S. & Chen, J. (2009) Cell – cell connection to cardiac disease. *Trends Cardiovasc Med*, 19(6), 182–190.

Tress, O., Maglione, M., May D, Pivneva, T., Richter, N., Seyfarth, J., Binder, S., Zlomuzica, A., Seifert, G., Theis, M., Dere, E., Kettenmann, H. & Willecke, K. (2012) Panglial gap junctional communication is essential for maintenance of myelin in the CNS. *J Neurosci*, 32(22), 7499 – 7518.

Vermij, S.H., Abriel, H. & van Veen T.A. (2017). Refining the molecular organization of the cardiac intercalated disc. *Cardiovasc Res*, 113(3), 259–275.

Vite, A. & Radice, G.L. (2014) N – cadherin/catenin complex as a master regulator of intercalated disc function. *Cell Commun Adhes*, 21(3), 169–179.

Xiong, W.C. & Mei, L. (2017) Agrin to YAP in Cancer and Neuromuscular Junctions. *Trends Cancer*, 3(4), 247–248.

Yuan, A., Sasaki, T., Kumar, A., Peterhoff, C.M., Rao, M.V., Liem, R.K., Julien, J.P. & Nixon, R.A. (2012) Peripherin is a subunit of peripheral nerve neurofilaments, implications for differential vulnerability of CNS and peripheral nervous system axons. *J. Neurosci*, 32(25), 85–91.

Zainul, Z., Heikkinen, A., Koivisto, H., Rautalahti, I., Kallio, M., Lin, S., Härönen, H., Norman, O., Rüegg, M.A., Tanila, H. & Pihlajaniemi T. (2018) Collagen XIII Is Required for Neuromuscular Synapse Regeneration and Functional Recovery after Peripheral Nerve Injury. *J Neurosci*, 38(17), 4243–4258.

Zhao, N., Liu, H. & Lilly, B. (2012) Reciprocal regulation of syndecan–2 and Notch signaling in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.*, 6, 13–17.

Бобров, А.В. (2011) Физическая природа феномена Биологическая индукция. *Сознание и физическая реальность*, 16, 40–63.

Вайт, Т.Н. & Иванко, С.П. (2009) Гиалуронат – основной компонент в атеросклерозе и рестенозе и при определении фенотипа артериальных гладкомышечных клеток. *Журнал Кардиология*, 12, 3–7.

Мироненко, Т.В. & Кузьмина, Л.Н. (2009) К вопросу о патогенезе миастении (обзор литературы). *Практикующему неврологу*, 7 (29), 91–95.

Півень, О.О. (2010). Зміни адгезивних комплексів у тканині міокарда як один із механізмів порушень функції серця. *Український кардіологічний журнал*, 6, 110–117.

Петрова, Е.С., Павлова, Н.В. & Коржевский, Д.Э. (2012) Современные морфологические подходы к изучению регенерации периферических нервных проводников. *Медицинский академический журнал*, 3, 15–29.

Сидорова, И.С., Унанян, А.Л. & Агеев, М.Б. (2012) Современное состояние вопроса о патогенезе, клинике, диагностике и лечении миомы матки у женщин репродуктивного возраста. *Журнал Акушерство Гинекология Репродукция*, 6, 22–28.

Розділ 5. РОЛЬ ПОЗАКЛІТИННИХ ВЕЗИКУЛ У МІЖКЛІТИННІЙ КОМУНІКАЦІЇ

5.1 Нові альтернативні шляхи комунікації клітин. Позаклітинні везикули

Клітини можуть спілкуватися одна з одною, вивільняючи позаклітинні везикули (ПВ), які виконують роль міжклітинних сигналів, взаємодіють і модулюють поведінку клітин-мішеней. Позаклітинні везикули здатні впливати на клітини-мішені як на близькій, так і далекій відстані від генеруючих клітин. На підставі їх походження, позаклітинні везикули розділяють на підгрупи "маленьких" везикул, які утворюються в ендосомальних відділеннях і мають назву "екзосоми" та усі інші типи позаклітинних везикул, що зароджуються безпосередньо з плазматичної мембрани. Незалежно від їхнього походження, всі вони включають до свого складу безліч різних біомолекул, включаючи РНК, ліпіди, протеїни та, можливо, ДНК. Проте механізми, що лежать в основі біогенезу різних субтипів позаклітинні везикулита сортування цих молекул, вкрай важко визначити, оскільки позаклітинні везикули, як правило, аналізуються навалом і забруднені протеїнами, ліпідними та вірусоподібними частинками через надмірно складну процедуру відокремлення везикул від клітин та їх уламків (рис. 32).

Значний інтерес, в останній час, до вивчення екзосом як критичних медіаторів зв'язку між клітинами, обумовлений їх багатоспрямованими біологічними ефектами. Показано, що позаклітинні везикули підтримують прогресування раку шляхом посередництва перехресного обміну сигналами між пухлиною та стромальними клітинами в їх нативному середовищі. Однак, позаклітинні везикули, що вивільняються з пухлинних клітин, так само, як і з клітин здорових тканин, мають окремі системні властивості (Thomou, 2017).

Екзосоми починають генеруватися з основних центрів сортування на граничній мембрані ендосом, де вони знаходяться в центрі сигнальної мережі. Саме ці компартменти вміщують варіабельний склад регуляторних молекул в залежності від зовнішніх подразників у відповідний час. Цілком зрозуміло, що екзосоми стимульованих клітин відрізняються за вмістом від екзосом, що генеруються нестимульованими клітинами. Так само, і екзосоми пухлинних клітин вміщують молекулярні "ознаки" відповідного типу малігнізації клітин.

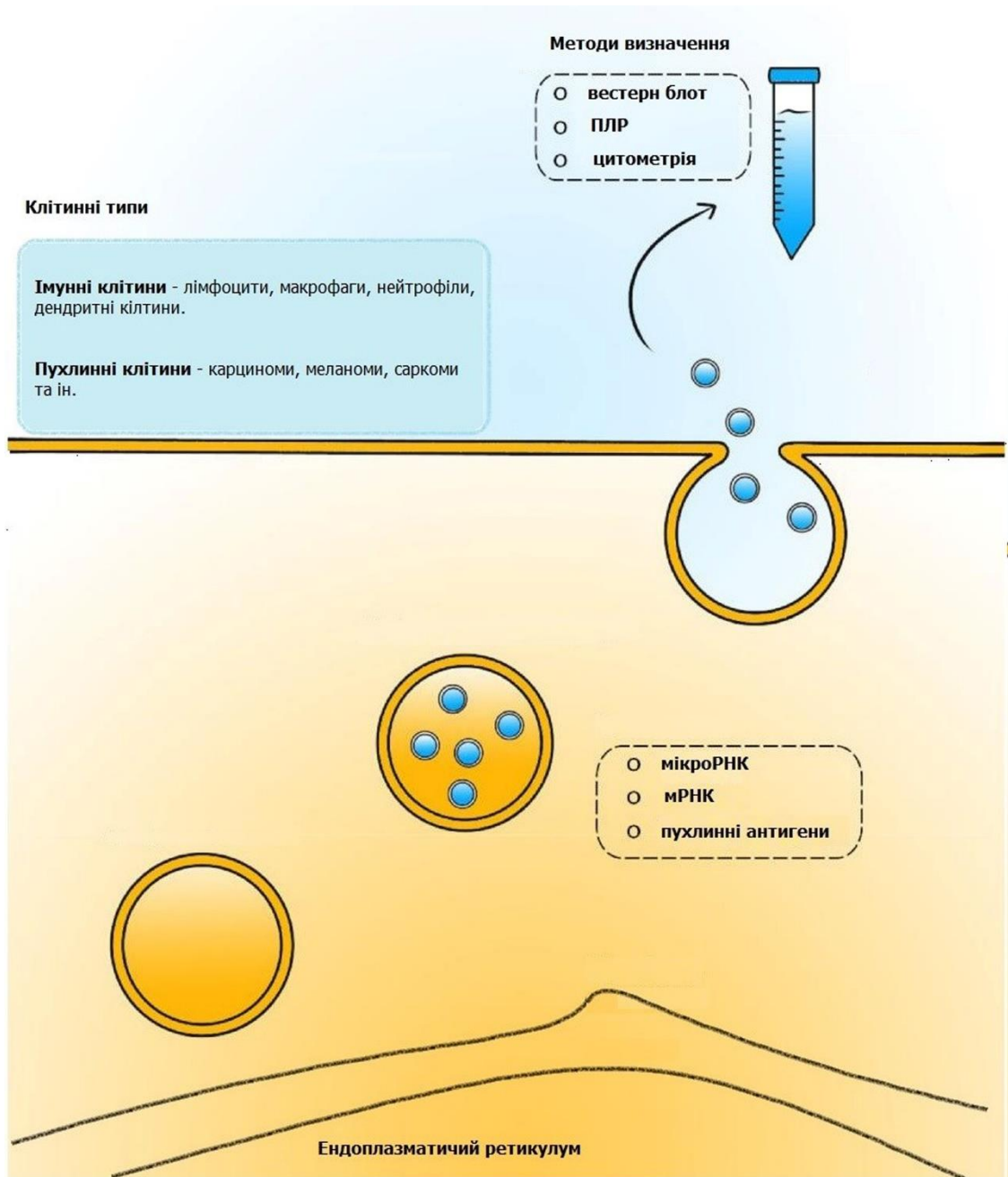


Рис. 32 Продукція екзосом та їх виявлення

Відповідно до цього, різниця в складі між самими екзосомами, а також, між екзосомами та іншими підтипами позаклітинних везикул обумовлена станом батьківської клітини і свідчить про наявність регульованих механізмів сортування, що визначають фенотипічні та функційні властивості цих везикул.

Основні механізми, що лежать в основі екзосомного біогенезу та сортування везикулярного вантажу залишаються не повністю розкритими. Однак, прогрес сучасних технологій у молекулярній і клітинній біології дозволив виявити окремі особливості складу і функціональні властивості

екзосом. Нажаль, залишаються деякі технічні складнощі у диференціації спрямованості та біологічних ефектів екзосом та інших типів везикул.

Формування екзосом супроводжується внутрішньоклітинним скупченням ділянок граничної мембрани та утворенням мультивезикулярних тіл (МВТ) з розмірами 30-100 нм. Початкова стадія генерації екзосом веде до утворення пухирців внутрішньоклітинних мембран. В ході дозрівання екзосом МВТ можуть з'єднуватись із плазматичною мембраною, що сприяє вивільненню їх вантажу у позаклітинний простір (рис. 33). В іншому випадку, МВТ можуть зливатися з лізосомами, що веде до деградації їх вантажів. Високий рівень секреції екзосом пухлинними клітинами свідчить на користь того, що баланс між двома альтернативними процесами спрямування долі МВТ є зміщеним у бік продукції екзосом.

Оскільки екзосоми генеровані окремими типами пухлинних клітин можуть суттєво сприяти розвитку та прогресуванню раку, розуміння шляхів, пов'язаних із їх біогенезом, може дати нові можливості терапевтичного втручання.

Описано кілька універсальних механізмів біогенезу МВТ. Критична роль ліпідних мікродоменів у формуванні МВТ була встановлена Трайковичем та його колегами у 2008 році (Trajkovic, 2008). Автори продемонстрували, що церамід, який утворюється шляхом гідролізу сфінгомієліна нейтральною сфінгомієліназою 2 (nSMase2), індукує негативну кривизну везикулярної мембрани через його конусоподібну структуру, що призводить до зародження екзосом всередині МВТ. Подальші дослідження генезиса екзосом, генерованих в ендосомах, показали, що крім ліпідного складу та фізичних характеристик мікродоменів мембран ендосоми, біогенез екзосом тісно пов'язаний зі сортуванням молекул вантажу.

Механізм функціонування комплексу ендосомального сортування, що необхідний для транспорту (ESCRT), є найбільш широко дослідженим шляхом біогенезу МВТ, що відповідає за сортування убіквітинованих протеїнів у внутрішньоклітинних везикулах.

Цей процес ініціюється ESCRT-0, який розпізнає і зберігає убіквітиновані протеїни в пізній ендосомальній мембрані. Після первинного згортання обмежувальної мембрани у провіт МВТ спричиненого комплексом ESCRT-I/II, наступний комплекс ESCRT-III утворює спіральну структуру, яка стискає везикулярну шийку, а АТФ-аза VPS4 забезпечує розрізання сформованого мембранного містка та відмежування ендосоми. Незважаючи на значне число досліджень, ролі ESCRT в біогенезі МВТ,

нажаль, не виявлено, чи можуть МВТ, генеровані убіквітин-залежними механізмами поглинатися лізосомами для деградації їх вантажу, або вони можуть зливатися з плазматичною мембраною і, таким чином, обумовлюють вивільнення клітиною екзосом (Schoneberg, 2017).

Сортування протеїнів у внутрішньоклітинних везикулах може також відбуватися незалежно від убіквітинації. У 2012 році Байетті та співавтори продемонстрували ключову роль сіндекана (гепарансульфат протеоглікана) у формуванні екзосом опосередкованого ESCRT III (Baietti, 2012). Автори показали, що взаємодія між сіндексаном та ESCRT опосередковується невеликим цитозольним адаптером протеїном сінтеніном, який з'єднує сіндексан з ESCRT-III-асоційованим протеїном ALIX. Подальші дослідження сіндексан-сінтенін-ALIX екзосомного шляху біогенезу виявили додаткові шляхи регуляції через руйнування гепарансульфатних ланцюгів гепараназою (рис. 33).

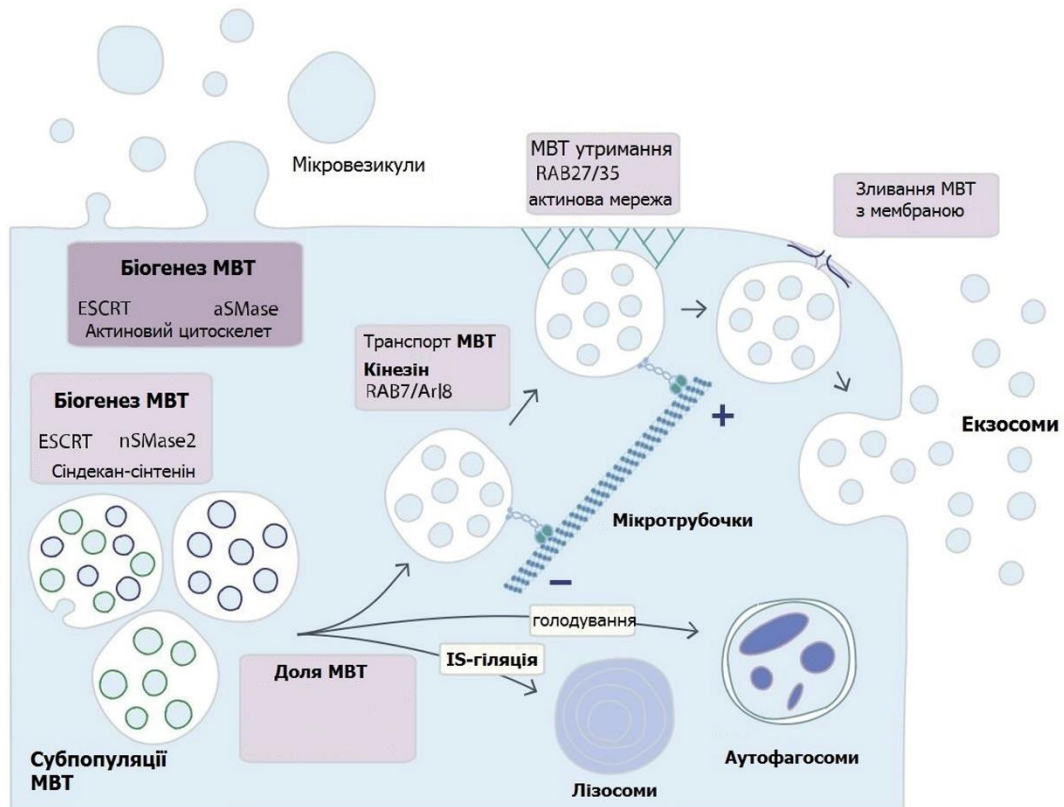


Рис. 33 Шляхи біогенезу мікроезидул та екзосом

Залишки ланцюгів гепарансульфата утворені гепаразою активують кластеризацію сіндикана, що, у свою чергу, стимулює сінтенін-ALIX-ESCRT-опосередковане сортування та виробництво екзосом. Гепараназя стимулює селективне сортування вантажу внутрішньоклітинних ендосом, обумовлене CD63, але не CD81, що забезпечує включення флотилліна та CD9 в екзосоми. Більш за те, сінтенін-опосередковане CD63 згортання

ендосом специфічно контролюється малим ГТФазним АДФ-рибозилуючим фактором 6 (ARF6) та його ефекторним протеїном фосфоліпазою D2 (PLD2) (Ghossoub, 2014).

Загалом, усі ці спостереження викликають одне з найважливіших питань в регуляції біогенезу екзосом. А саме, чи можуть різні механізми сортування визначати включення конкретних молекул в екзосоми або окремі субпопуляції везикул, які несуть різний вантаж. Розкриття такого питання є принципово важливим для розробки шляхів спрямованого впливу на пухлинні клітини і мікросередовище пухлин. Таким чином, перешкоджання специфічним механізмам сортування може впливати на склад або підтипи позаклітинні везикули, що виділяються раковими клітинами.

Після дозрівання, внутрішньоклітинні везикули можуть або зливатися з плазматичною мембраною, з наступним вивільненням екзосом, або деградувати їх вантаж шляхом об'єднання з лізосомами. Високий рівень екзосомної секреції з трансформованих клітин дозволяє припустити, що баланс між цими двома процесами в ракових клітинах зміщується у напрямку вивільнення екзосомного вантажу (Riches, 2014; Wei, 2017). Схожий тип зсуву може також відбуватися в нетрансформованих клітинах, наприклад, таких як клітини, що представляють антиген, які, як відомо, вивільняють великі кількості екзосом при стимуляції (Muntasell, 2007). Нажаль, відсутні безпосередні докази того, якими сигнальними молекулами відрізняється вантаж “секреторних” від “деструктивних” екзосом. Перша підказка на таке питання отримана з недавнього дослідження Віларрой-Белтрі та його колег, які елегантно продемонстрували, що зв'язування компоненту ESCCR-I Tsg101 з убіквітин-подібним протеїном ISG зменшує екзосомне вивільнення і сприяє злиттю MBT з лізосомами. Ці результати дозволяють припустити, що посттрансляційні модифікації завантажених протеїнів можуть вплинути на долю MBT (Villarroya-Beltri, 2016). Крім того, доля MBT може змінюватися у відповідь на зміни клітинних умов, таких як голодування, що викликає деградацію MBT шляхом злиття з автофагосомами, і таким чином, призводить до зменшення екзосомного вивільнення.

Окремі пізні ендосомальні транспортні механізми можуть бути предметом диференціальної регуляції або контролю переміщення окремих субтипів MBT (рис. 33). Як альтернатива, механізми, відповідальні за секреторний транспорт MBT, можуть бути специфічними для клітинних типів, що було показано для сімейства ГТФ-аз RAB, котре регулює приєднання MBT до плазматичної мембрани. Мала ГТФ-аза RAB35

опосередковує зв'язування MBT в олігодендрогліальних клітинах, тоді як RAB27 контролює цей процес у кількох ракових клітинних лініях *in vitro* та *in vivo*. Такий контроль реалізується шляхом стабілізації розгалужених актинових філаментів, що утворюють на мембрані сайти приєднання MBT (Sinha, 2016).

Після транспортування та приєднання до плазматичної мембрани, секреторні MBT поєднуються з SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive component attachment protein receptor), який опосередковує механізм мембранного злиття. Людина має декілька протеїнів SNARE, які локалізовані в різних внутрішньоклітинних мембранах та опосередковують злиття клітинних компартментів, через утворення відмінних комплексів SNARE. Важливим кроком у вивільненні екзосом є залучення екзоцитарних ділянок мембрани, які вміщують SNAREs з приєднаними MBT. В активації екзоцитозу, також, важливу роль відіграють малі ГТФ-ази, такі як RAL-1 (Huynh, 2015).

Протягом останнього десятиріччя декілька протеїнів SNARE, таких як YKT6, синтаксин-1 α та синтаксин-5, були визначені як універсальні критичні регулятори виділення екзосом з різних типів клітин і організмів (Huynh, 2015; Ruiz-Martinez, 2016) Крім того, продемонстрована роль протеїнів SNARE, SNAP23, синтаксину-4 та VAMP7 у вивільненні екзосом з пухлинних клітин (Wei, 2017). Ці протеїни утворюють екзоцитарний SNARE-комплекс, який сприяє інвазії пухлинних клітин, так само, як і процесам пов'язаним з вивільненням екзосом. Формування комплексів SNARE і злиття мембран щільно контролюється багатьма регуляторними механізмами. У контексті вивільнення екзосом пухлинами, Хошіно та його колеги продемонстрували роль кальцію, що зв'язує SNARE-синтетичний протеїн синаптотагмін-7 (Hoshino, 2013). Крім того, активність SNARE частково контролюється фосфорилуванням, що впливає на локалізацію комплексів або взаємодію з партнерами SNARE (Snyder, 2006). Нещодавні дослідження показали, що фосфорилування SNAP23 сприяє екзосомній секреції (Verweij, 2018; Wei, 2017). Фосфорилування SNAP23 залишку Ser95 сприяє вивільненню PKM2 з пухлинних клітин, тоді як, фосфорилування Ser110 викликає вивільнення екзосом у відповідь на стимуляцію гістаміном. Таким чином, значне число регуляторних механізмів контролюють активність SNARE комплексів шляхом фосфорилування різних залишків та підтримують роль мікросередовища в регулюванні вивільнення екзосоми.

Коли MBT зливаються з плазматичною мембраною, екзосоми виділяються в позаклітинний простір, де вони взаємодіють з позаклітинним

матриксом, впливають на клітини в мікросередовищі, але також можуть включатись в кровообіг через лімфу або кров. Показано, що в деяких типах клітин частка екзосом залишається прикріпленою до поверхні клітин, де вони можуть функціонувати в якості сигнальних платформ для безпосередньої адгезивної комунікації з оточуючими клітинами .

Загалом, результати дослідження механізмів вивільнення екзосом свідчать про те, що вони є жорстко контрольованим процесом, який регулюється на декількох рівнях між початком генерації внутрішньоклітинних везикул та злиттям МВТ. Відомі дані вказують на те, що вивільнення екзосом навряд чи є лише альтернативним способом утилізації “відходів”, в той же час, припускають, що екзосоми відіграють значну фізіологічну роль в міжклітинній сигналізації.

Відповідно, регулювання вивільнення екзосом *in vivo*, ймовірно, є динамічним процесом, коли клітини адаптують інтенсивність вивільнення для кожної субпопуляції екзосом у відповідь на суперпозицію наявних зовнішніх та внутрішніх подразників. Важливо відзначити, що сучасні методи вивчення механізмів біогенезу екзосом базуються на ізоляції позаклітинних везикул з культурального супернатанта, процедура отримання якого вимагає довготривалої клітинної культури (24-72 год) і значно ускладнює дослідження короткочасної динаміки вивільнення екзосом. Сучасні технології дозволяють розробити чутливі репортери, які допоможуть моніторити екзосомне вивільнення в реальному часі, візуалізуючи злиття МВТ з плазматичною мембраною (Verweij, 2018).

На додаток, до екзосом, генерованих з МВТ, екстрацелюлярні везикули можуть бути безпосередньо згорнуті і утворені з матеріалу плазматичної мембрани. Ці везикули часто взагалі називають мікровезикулами, хоча вони дуже різноманітні, починаючи від екзосомно-подібних позаклітинних везикул з розміром 50 нм та, закінчуючи позаклітинними везикулами, розміром до 10 мкм. Відповідно до їх неоднорідності, мікровезикули можуть бути сформовані через кілька різних механізмів, які частково перекриваються з тими, що беруть участь в екзосомному біогенезі. Наприклад, механізми ESCRT залучаються до продукції нанорозмірних везикул, які збагачені протеїнами поверхні клітин, що відображає їх походження з плазматичної мембрани (Nabhan, 2012; Wang, 2017). Крім того, подібно до участі nSMase2 у формуванні ендосом, кисла сфінгомеліназа забезпечує формування керамід-залежних мікровезикул, що вказує на загальну роль сфінгомеліназ у біогенезі позаклітинних везикул, генерованих з внутрішніх мембран МВТ та везикул сформованих з плазматичної мембрани (Bianco, 2009).

Інший механізм біогенезу мікровезикул пов'язаний з неапоптоичними везикулами плазматичної мембрани, які часто спостерігаються у сильно агресивних ракових клітинах. Ці бульбашки безперервно розширюються і відводяться на поверхню клітин, де сприяють рухливості клітин через не зовсім зрозумілий механізм. Крім того, такі бульбашки можуть бути виділені як мікровезикули за допомогою перебудов актинового цитоскелета у специфічних сайтах плазматичної мембрани для їх злиття. Під час міграції *in vivo* пухлинні клітини можуть брати так званий фенотип амебоїда, який пов'язаний з розповсюдженням згортання плазматичної мембрани та вивільненням мікровезикул. Таким чином, біогенез такого типу мікровезикул може бути пов'язаний з процесами канцерогенезу і метастазування (Clancy, 2015; Paul, 2017).

Вантаж позаклітинних везикул

Функціональні властивості позаклітинних везикул в мікросередовищі пухлини, в першу чергу, продиктовані їх вантажем та їх динамікою вивільнення та поглинання. Визначення компонентів, відповідальних за про-пухлинні ефекти ракових позаклітинних везикул і шляхи, що призводять до їх включення у везикули, наразі є однією з основних проблем у галузі біологічних ефектів екзосом.

Нещодавні дослідження показують, що протеїни які входять до складу екзосом, є ключовими компонентами регуляції механізмів їх біогенезу (Baletti, 2012; Guix, 2017). Екзосоми пухлинних клітин вміщують значне число посередників канцерогенезу, наприклад, онко-протеїни, фактори росту та імуномодулюючі молекули. Регуляція механізмів, які відповідають за завантаження окремих специфічних протеїнів у везикули, є ключовою для росту і метастазів пухлин, так само, як і для розробки стратегії пригнічення пухлинного росту. Нажаль, роль компонентів протеїнового вантажу екзосом вивчена недостатньо для того, щоб беззаперечно визначити участь певних протеїнів у біологічних функціях екзосом.

У 2006 році Ратаджак та співавт. вперше запропонували горизонтальну передачу РНК між клітинами донора та реципієнта (Ratajczak, 2006). Згодом, Валаді та Ског самостійно продемонстрували, що молекули мРНК, котрі транспортуються за допомогою екзосом, можуть бути фактично переведені в протеїн, чим підтвердили очевидність вірус-незалежної горизонтальної передачі генетичного матеріалу між клітинами (Skog, 2008; Valadi, 2007). Цей висновок відкрив шлях до активних зусиль, спрямованих на вирішення функціональних можливостей молекул РНК,

пов'язаних з позаклітинними везикулами, *in vivo*. Використання репортерних систем під контролем рекомбінази CRE показали, що екзосоми навантажені CRE, можуть бути передані *in vivo* на великі відстані (Zomer, 2015). Використовуючи цю методологію у поєднанні з внутрішньоклітинним зображенням, Зомер та співавт. показали, що позаклітинні везикули, що вивільняються агресивними пухлинними клітинами, можуть індукувати набуття менш агресивних злоякісних рис, що передбачає певну роль вантажу РНК у цьому процесі.

Окрім мРНК, екзосоми високо збагачені невеликими некодуючими РНК, що свідчить про те, що вони значною мірою функціонують через регуляцію генів. Перше підтвердження функціонального перенесення малих РНК через екзосоми було надано у 2010 році, за допомогою вірусної мікроРНК, ендогенно продукованою в інфікованих вірусом Епштейна-Барра В-клітинах. Пегтел та співавт. продемонстрували, що дрібні РНК секретуються через екзосоми і можуть регулювати експресію генів у дендритних клітинах реципієнта (Pegtel, 2010). Незважаючи на певні дані, які демонструють роль екзосом у канцерогенезі, остаточні докази того, що сигналізація через позаклітинні везикули відповідає за прогресування раку *in vivo*, все ще відсутня. Передача мікроРНК екзосомами продемонстрована Томау і колегами у мишей з тканино-специфічним нокаутом Dicer. Показано, що бурий жир є основним джерелом циркулюючих мікроРНК, пов'язаних з екзосомами. Трансплантація нормальної жирової тканини таким тваринам, як миші не тільки відновила циркулюючі рівні мікроРНК, але й регуляцію експресії генів у віддалених органах. Такий ефект, також, був відтворений введенням нормальної сироватки з екзосомами (Thomou, 2017).

Окремі РНК-зв'язуючі протеїни були визначені як посередники сортування РНК в екзосомах (Lu, 2017). Однак, певні механізми і роль таких протеїнів у біогенезі ендосомальні системи залишаються нез'ясованими. Показано, що окремі мікроРНК сортуються в екзосомах після роз'єднання з їх протеїновими партнерами. Отже, цілком можливе функціонування паралельних механізмів сортування.

Локалізація AGO2 та інших компонентів РНК-індукованого мовчазного комплексу в безпосередній близькості від МВТ свідчить про їх участь у екзосомальному сортуванні мікроРНК. Однак, це питання залишається суперечливим, оскільки не визначена, безпосередньо, присутність AGO2 у екзосомах. Зокрема, AGO є стабільним протеїном і виявляється поза екзосомами у плазмі людини (Arroyo, 2011).

Мело та співавт. показали, що екзосоми, які походять з клітин раку молочної залози, мають протеїновий механізм для перетворення пре-мікроРНК у зрілі мікроРНК. Більш за те, ці зрілі мікроРНК, що утворюються в межах таких екзосом, впливають на транскриптомі не-зляжисних клітин-мішеней і сприяють їх трансформації (Melo, 2014).

Незважаючи на те, що РНК є найбільш дослідженим компонентом екзосомного вантажу, регуляторні механізми завантаження і сортування РНК у везикулах залишаються відкритими питаннями. Сквдріто та співавт. запропонували модель, в якій відносна кількість цільових мРНК в цитоплазмі може впливати на сортування мікроРНК в екзосомах. При наявності високих рівнів експресії взаємодія мРНК-мікроРНК може гальмувати включення мікроРНК у позаклітинні везикули (Squadrito, 2014). Більш за те, посттрансляційні модифікації мікроРНК можуть бути сигналом, який сприяє їх завантаженню у везикули.

Окремі дослідження показали наявність фрагментованої геномної ДНК (гДНК), мітохондріальної ДНК (мтДНК) і навіть паразитної ДНК в позаклітинні везикули, отриманих з середовища клітинної культури та плазми. Незважаючи на те, що механізми, за допомогою яких ДНК може бути включена в екзосоми, залишаються не з'ясованими. Той факт, що фрагменти гДНК рівномірно розподілені по всьому геному, припускають цей процес як випадковий (Kahlert, 2014; Thakur, 2014).

Один з можливих варіантів полягає в тому, що ДНК присутня на поверхні екзосом у складі комплексів з нуклеосомами, які мають розмір приблизно 10 нм. Молекули ДНК, пов'язані з поверхнею екзосом, можуть бути частково захищені зв'язуванням з протеїнами. Незрозумілим залишається, також, фізіологічне значення переносу ДНК через позаклітинні везикули. Недавні дослідження показали, що при пошкодженні ДНК фрагменти геномної ДНК експортуються до цитоплазми, де вони можуть зв'язувати цитоплазматичні ДНК-сенсори, які вмикають процеси клітинного старіння та/або апоптоза. В той же час, секреція фрагментів ДНК за допомогою екзосом перешкоджає активації цитоплазматичних ДНК-сенсорів, тим самим сприяючи клітинному гомеостазу (Takahashi, 2017). Цей аспект є особливо актуальним для малігнізованих клітин, в яких підвищений рівень пошкодження ДНК може потребувати ефективного видалення цитоплазматичної ДНК за допомогою екзосом. Така гіпотеза, підтверджується тим, що, дійсно, ракові клітини демонструють більш інтенсивну продукцію екзосом у порівнянні з нормальними клітинами.

Велика кількість доказів свідчить про те, що ракові клітини випускають більшу кількість позаклітинних везикул у порівнянні з незлоякісними клітинами, що робить механізми везикулярного біогенезу або їх компоненти перспективними мішенями для протиракової терапії. Дійсно, надмірна експресія компонентів ESCCR, сінтеніна та гепаранази виявлена в різних пухлинах. Крім того, гіперактивація RalB у карциномі підшлункової залози та колоректальних пухлинах, зростання експресії YKT6 у недрібноклітинному раку легень та підвищена Rho-ROCK сигналізація, що спостерігається в різних типах пухлин, і таким чином, всі вони можуть посилити вироблення екзосом у пухлинних клітинах (Morgan-Fisher, 2013; Ruiz-Martinez, 2016).

Поширення екскреції позаклітинних везикул раковими клітинами може бути обумовлено як внутрішньоклітинними, так і зовнішніми сигналами. Активація онкогенних сигнальних шляхів, наприклад, за допомогою EGFRvIII та H-RASV12, активує генерацію екзосом у ракових клітинах. Крім того, протонокоген SRC специфічно стимулює процес біогенезу екзосом шляхом фосфорилування цитозольних доменів сіндекана та сінтеніна (Imjeti, 2017). Підвищена продукція позаклітинних везикул раковими клітинами може залежати від онкогенних порушень в регулюванні механізму синтезу мембранних компонентів. Наприклад, надмірна експресія PKM2, гліколітичного ферменту, задіяного в ефекті Варбурга, покращує секрецію екзосом шляхом фосфорилування tSNARE SNAP23 (Wei, 2017).

Окрім автономних клітинних механізмів, фактори клітинного мікрооточення, такі як гіпоксія, можуть сприяти регуляції вивільнення з ракових клітин як мікровезикул, так і екзосом (Li, 2016). Гіпоксія стимулює виробництво мікровезикул через активацію HIF1 α -залежної експресії RAB22, а вивільнення екзосом, переважно, шляхом фосфорилування Акт-субстрату PRAS40. Такі факти дозволяють диференціювати викликаний гіпоксією внесок різних субтипів везикул у прогресування раку.

Крім виявлення підвищеного вивільнення позаклітинних везикул, ракові клітини виділяють везикули, які відрізняються за вмістом протеїнів та РНК від позаклітинних везикул звичайних клітин. В першу чергу, така відмінність ракових і нормальних екзосом може бути результатом активації онкогенних сигналів у трансформованих клітинах або зміною мікрооточення. Слід зазначити, що кілька незалежних груп дослідників виявили збагаченні пухлинними супресорами мікроРНК у позаклітинні везикули з різних типів пухлинних клітин (Lawson, 2017; Ostefeld, 2014; Rashed, 2017).

Таким чином, вивільнення екзосом з трансформованих клітин може функціонувати як механізм видалення небажаних для пухлини мікроРНК супресорів. З іншого боку, ці результати мають важливе значення для розробки антиракових стратегій, оскільки, блокування вивільнення пухлинних екзосом призводить до накопичення супресорних мікровезикул та зменшення пухлиногенних властивостей.

Дерегуляція вивільнення позаклітинних везикул, так само як і їх завантаження критично впливають на перехресну сигналізацію між пухлиною, її безпосереднім мікрооточенням і навіть, віддаленими метастазними ділянками.

Чи може сортування "модифікованого" вантажу в ракових екзосомах відображати швидкий оборот компонентів, якими збагачені ракові клітини або регулювати процеси міжклітинних комунікацій, залишається відкритим питанням. Проте позаклітинні везикули з ракових клітин глибоко змінюють поведінку локальних або залучених стромальних клітин, що призводить до утворення сприятливого для пухлини мікрооточення, яке підтримує пухлинний ангиогенез, імуносупресію та набуття злоякісних ознак раковими клітинами (див. рис. 32).

Ендотеліальні клітини є критичними компонентами стромы, що сприйнятливі до маніпуляцій за допомогою ракових екзосом. Аль-Недаві і співавтори продемонстрували, що горизонтальна передача онкогенного конститутивно активного EGFRvIII через позаклітинні везикули не тільки може передавати онкогенну активність серед підгрупи ракових клітин (Al-Nedawi, 2008), але й активізує аутокринну сигналізацію VEGF в ендотеліальних клітинах, що стимулює пухлинний ангиогенез (Al-Nedawi, 2009). Крім перенесення онкопротейнів, ракові екзосоми можуть переключати специфічні клітинні реакції, імітуючи статус батьківських ракових клітин. Зокрема, ракові позаклітинні везикули, вироблені при гіпоксичних умовах, високо збагачені гіпоксія-регульованою РНК та протейнами, які індукують функції ендотеліальних клітин та судинну проникність (Al-Nedawi, 2009; Hsu, 2018).

Незважаючи на те, що ракові позаклітинні везикули є носіями пухлинних антигенів, які в принципі можуть опосередковувати протипухлинний імунітет, показано, що екзосомний вантаж, в основному, спрямований на придушення імунної відповіді. Окремі дослідження показали, що пухлинні позаклітинні везикули інгібують проліферацію та активацію ефektorних CD8-позитивних клітин, одночасно сприяючи росту популяції регуляторних Т-лімфоцитів. На додаток до їх впливу на адаптивну імунну систему, ракові позаклітинні везикули можуть "виховувати"

вроджені імунні компоненти у напрямку проканцерогенного фенотипу (Shinohara, 2017). Наприклад, Hsp72 на поверхні ракових екзосом активує міелоїдну супресорну клітину (MDSC) шляхом індукції сигнального шляху IL-6/Stat3 через TLR2-залежний механізм. Більше за те, пов'язані з екзосомами мікроРНК поляризують асоційовані з пухлинами макрофаги у проканцерогенний фенотип M2.

Хадерк та колеги, показали, що CLR позаклітинні везикули, які містять Y-РНК, індують експресію PD-L1 імунного протеїна, а також виробництво пропухлиногенних цитокінів в моноцитах шляхом запуску TLR7/8 (Haderk, 2017). Оскільки Y-РНК рясно представлені у багатьох видах ракових екзосом, а також, в екзосомах від здорових клітин, в сечі та плазмі, такі дані є компромісними. Проте, це дослідження доповнює існуюче свідчення того, що екзогенні некодуючі РНК можуть мати ефекти через механізми, незалежні від регуляції генів, зокрема, шляхом розпізнавання образів рецепторів (PRR), які викликають вроджену імунну відповідь (Baglio, 2016; Nabet, 2017).

Проканцерогенні ефекти ракових екзосом також можуть бути опосередковані клітинами мезенхімального походження. Веббер та його колеги продемонстрували, що позаклітинні везикули, які виділяються клітинами раку передміхурової залози, переключають диференціювання міофібробластів клітин, через індукцію ангиогенеза, що прискорює ріст пухлини *in vivo*. Ці ефекти були опосередковані мембранно-асоційованою формою TGF β на поверхні везикул і не могли бути відтворені шляхом введення розчинного аналогу TGF β у стромальні клітини (Webber, 2015).

Таким чином, зв'язаний з мембраною екзосом ростовий фактор може мати відмінну або більш високу біологічну активність у порівнянні з розчинними аналогами. Незалежно від яких властивостей TGF β або інтегральної взаємодії TGF β +екзосома, залежить виявлений ефект, безсумнівно, необхідні подальші дослідження екзосомних функцій у міжклітинній комунікації.

Окрім ефектів на локальні або залучені пухлино-асоційовані стромальні клітини, позаклітинні везикули сприяють прогресуванню раку, діючи на позаклітинний матрикс (ПКМ). Пухлинні екзосоми посилюють спрямовану інвазію в тканинах, секретуючи з везикулами екзосом-зв'язану форму фібронектина. Вивільнення збагачених фібронектином екзосом на передньому краї мігруючих клітин сприяє утворенню фокальних зшивок, які стабілізують виступи фронтального боку та збільшують швидкість міграції ракових клітин. Напрямок міграції цих клітин може бути спрямований хемотаксичним градієнтом (Sung, 2017). Важливо відзначити,

що пухлинні екзосоми активують інвазивну поведінку і стимулюють формування і функцію інвадоподіїв. Розгалужені актинові філаменти в інвадоподіях є важливими компонентами стикування та злиття для МВТ, а екзосомна секреція не тільки посилює утворення і стабільність форм інвадоподію, але також сприяє дегенерації ПКМ шляхом транспортування протеїнази МТ1-ММП до плазматичної мембрани. Таким чином, пухлинні екзосоми виступають в ролі регулятора міжклітинної взаємодії в ході міграції та інвазії пухлинних клітин.

Пухлино-підтримуюча активність екзосом не обмежується лише мікрооточенням пухлини. Швидше за все, ракові позаклітинні везикули потрапляють в кровообіг і за допомогою циркуляції крові можуть потрапити у будь-який віддалений орган. За наявності відповідних умов, вантаж екзосом створює сприятливі умови для пухлинного росту, якщо в таке середовище потрапляють метастазуючі пухлинні клітини. Цей процес, відомий як формування передметастазної ніші, вимагає серії заздалегідь визначених етапів, що включають індукцію виснаження судин, зміну компонентів стромы та гальмування імунної системи (Reinado, 2017).

Перші докази залучення екзосом у формуванні передметастазної ніші були надані Пеінадо та його колегами (Reinado, 2012). Автори виявили, що позаклітинні везикули із високо метастазних клітин меланоми посилюють формування метастазів шляхом трансформації клітин-попередників кісткового мозку у прометастазний фенотип через горизонтальну передачу метіоніна. Схожий механізм показаний для екзосом з раку підшлункової залози, які ініціюють міжклітинний каскад сигналізації для утворення преметастазної ніші в печінці (Costa-Silva, 2015). Автори показали, що високий рівень інгібіторного фактору макрофагів (MIF) в пухлинних екзосомах стимулює продукцію TGF- β клітинами Купфера, що у свою чергу, активує стовбурові клітини печінки до виробництва фібронектина. Отримане фібротичне середовище в печінці привертає макрофаги з кісткового мозку і сприяє формуванню метастазів.

Незабаром, ця ж група дослідників продемонструвала, що позаклітинні везикули, виділені з метастазних клітин, не тільки переважно орієнтовані і перепрограмують стромальні клітини в їх передбачуваних місцях, але також можуть індукувати органо-специфічні метастази. Згідно отриманих результатів, позаклітинні везикули з метастазних легенево-спрямованих клітин раку молочної залози можуть перенаправити формування метастазів кістково-спрямованих клітин пухлини в легені. Цей ефект був залежним від інтегрінового профілю везикул, що обумовлює органотропізм позаклітинних везикул і сприяє запальній реакції в клітинах-

реципієнтах. Незважаючи на окремі вражаючі результати, специфічний тропізм ракових екзосом обумовлений інтегриновими рецепторами залишається відкритим питанням. З'ясування відносного внеску екзосомно-опосередкованої сигналізації в органотропній поведінці злоякісних клітин потребує подальшого вивчення.

Чисельні дослідження біологічних ефектів мікроРНК показали, що вони також можуть сприяти утворенню передметастазної ніші через різні механізми. МікроРНК-105, що виділяється клітинами раку молочної залози, індукує виснаження судин у віддалених органах, через вплив на з'єднувальний протеїн ZO-1 (Zhou, 2014). Однак, інша мікроРНК-122 інгібує поглинання глюкози стромальними клітинами в передметастазній ніші, тим самим збільшуючи доступність глюкози пухлинним клітинам та ріст метастаз (Fong, 2015). Крім того, некодовані невеликі ядерні РНК, перенесені раковими екзосомами, можуть переключати сигналізацію TLR3 в клітинах легеневого епітелію, що призводить до залучення нейтрофілів і утворення метастазної ніші в легенях (Liu, 2016).

Незважаючи на те, що ці дослідження свідчать про критичну роль ракових екзосом у передракових подіях клітин у майбутніх метастазних ділянках, фізіологічна відповідність цих даних очікує підтвердження. Треба зазначити, що у фізіологічних умовах кількість ракових позаклітинних везикул, що надходять у кровообіг, обмежена інтерналізацією фагоцитами. Відповідно до цього поняття, Пуччі та його колеги продемонстрували, що меланомні екзосоми затримуються бар'єром субкапсулярних пазух синусів у пухлинних дренажних лімфатичних вузлах, що перешкоджає їх поширенню (Руссі, 2016). Автори показали, що прогресування раку, а також певні протипухлинні процедури можуть порушити їх кровообіговий бар'єр, тим самим дозволяючи раковим позаклітинним везикулам входити в строму лімфатичних вузлів і викликати гуморальний імунітет, що пригнічує пухлиногенез. Таким чином, багато контекстно-незалежних факторів можуть впливати на системну функцію пухлинних екзосом і суттєво ускладнюють динаміку вивільнення, тропізму та ефектів на клітини-мішені.

Ранні дослідження екзосом-опосередкованої взаємодії в ході канцерогенезу виявили пухлинно-стромну сигналізацію лише як односпрямований процес, при якому пухлинні екзосоми змінюють поведінку стромальних клітин. Ця концепція була переглянута в 2012 році, коли дослідження Луга та його колег показало, що позаклітинні везикули з фібробластів можуть бути модифіковані і рециркульовані пухлинними клітинами. Наступне вивільнення таких перероблених аутокринних екзосом

індукує Wnt-планарну полярність клітин, що посилює міграцію та метастазування пухлинних клітин (Luga, 2012).

Наступні результати показали, що стромальні позаклітинні везикули контролюють різні аспекти прогресування раку, включаючи набуття більш агресивного фенотипу, резистентність до терапії і проліферацію розсіяних ракових клітин (рис. 33). Пропухлинні функції стромальних екзосом обумовлюються впливом сигналів, які вивільняються пухлиною і змінюють поведінку стромальних клітин. Наприклад, поляризація асоційованих з пухлиною макрофагів у бік фенотипу M2 індукує секрецію екзосом-асоційованих онкогенних мікроРНК, які регулюють інвазивність клітин раку молочної залози. З іншого боку, позаклітинні везикули, які вивільняються мезенхімальними стовбуровими клітинами мають протилежний вплив на прогресування множинної мієломи. Хоча, позаклітинні везикули, які вивільняє мієлома, сприяють росту пухлини, позаклітинні везикули з нормальних клітин кісткового мозку інгібують проліферацію ракових клітин. Ці результати вказують на те, що мікросередовище пухлини може повністю руйнувати функцію стромальних екзосом.

Непухлинна природа екзосом з нативних стовбурових клітин робить їх привабливим варіантом для лікування раку. Дійсно, екзосоми є природною, неімуногенною системою доставки, яка може бути використана для спрямованої передачі терапевтичних сполук пухлинам. Такі екзосоми вже були використані в клініці для лікування захворювання трансплантат проти господаря. Оскільки ці везикули зберігають профіль поверхні мезенхімальних клітин, вони виявляють подібний тропомізм до мембрани пухлин мезенхімального походження.

Функція позаклітинних везикул, що сприяє розповсюдженню пухлини, часто опосередкована молекулами екзосом-асоційованих РНК, які можуть діяти схоже з небезпеко-асоційованими молекулярними патернами (DAMP), що сприяють розвитку запальної реакції (Baglio, 2016). Наприклад, активація інтерферон-стимульованих генів стромальними РНК з екзосом може індукувати резистентність до хіміо- та променевої терапії у трьох негативних клітинах раку молочної залози (Voelens, 2014). Зазвичай, РНК в цитоплазмі захищена від дії рестриктаз рибосомальними протеїнами (РБП). Зміни стехіометрії РНК/РБП ведуть до оголення РНК і включення її в екзосоми. Набет та його колеги показали, що цей механізм значно впливає на зв'язок пухлинно-строми, сприяючи прогресуванню раку (Nabet, 2017). Зокрема, автори продемонстрували, що активація строми пухлинними клітинами збільшує транскрипцію некодованої РНК RN7SL1, яка потім

сортуються у вільній від РБП формі в стромальних екзосомах. Антивірусна імунна відповідь, викликана незахищеними RN7SL1 при доставці у ракові клітини, покращує ріст пухлини, утворення метастазів та стійкість до терапії, тим самим змушуючи активацію строми до екзосом-опосередкованого запалення та прогресування раку.

Значну роль екзосом-асоційованої РНК у комунікації строма-пухлина виявили в дослідженні мікроРНК з астроцитів, яка стимулювала ріст метастазів клітин раку молочної залози у мозку (Zhang, 2015). Клітини раку молочної залози як миші, так і людини втрачають експресію гена супресорів пухлин PTEN при поширенні в мозок, але не в інших метастатичних ділянках. Астроцит-специфічне зменшення мікроРНК та аденовірус-опосередковане гальмування вивільнення позаклітинних везикул показали, що перенесення мікроРНК-19a, одержаної з астроцитів, відповідає за реверсивне зниження регуляції PTEN і призводить до посилення метастаз. Це дослідження доводить роль стромальних позаклітинних везикул у коадаптації клітин пухлини і тканин, яка веде до розвитку органоспецифічних метастазів. Незважаючи на значний дослідницький інтерес до астроцитарних екзосом, залишається незрозумілим, чи можуть вони впливати на ріст метастазів мозку.

Наступна, нова форма екзосомної сигналізації, заснована на передачі мітохондріальної ДНК, нещодавно була показана у моделі розвитку резистентності до ліків (Sansone, 2017). Однак, отримані на теперішній час експериментальні результати не дозволяють розробити концепції участі мітохондріальної ДНК в екзосомній сигналізації між окремими типами клітин.

Комунікація за допомогою екзосомного вантажу між пухлинними та стромальними клітинами доповнюється передачею сигналів безпосередньо між пухлинними клітинами, які можуть мати різний ступінь малігнізації та обумовлювати значну гетерогенність пухлинного фенотипу (рис. 34).

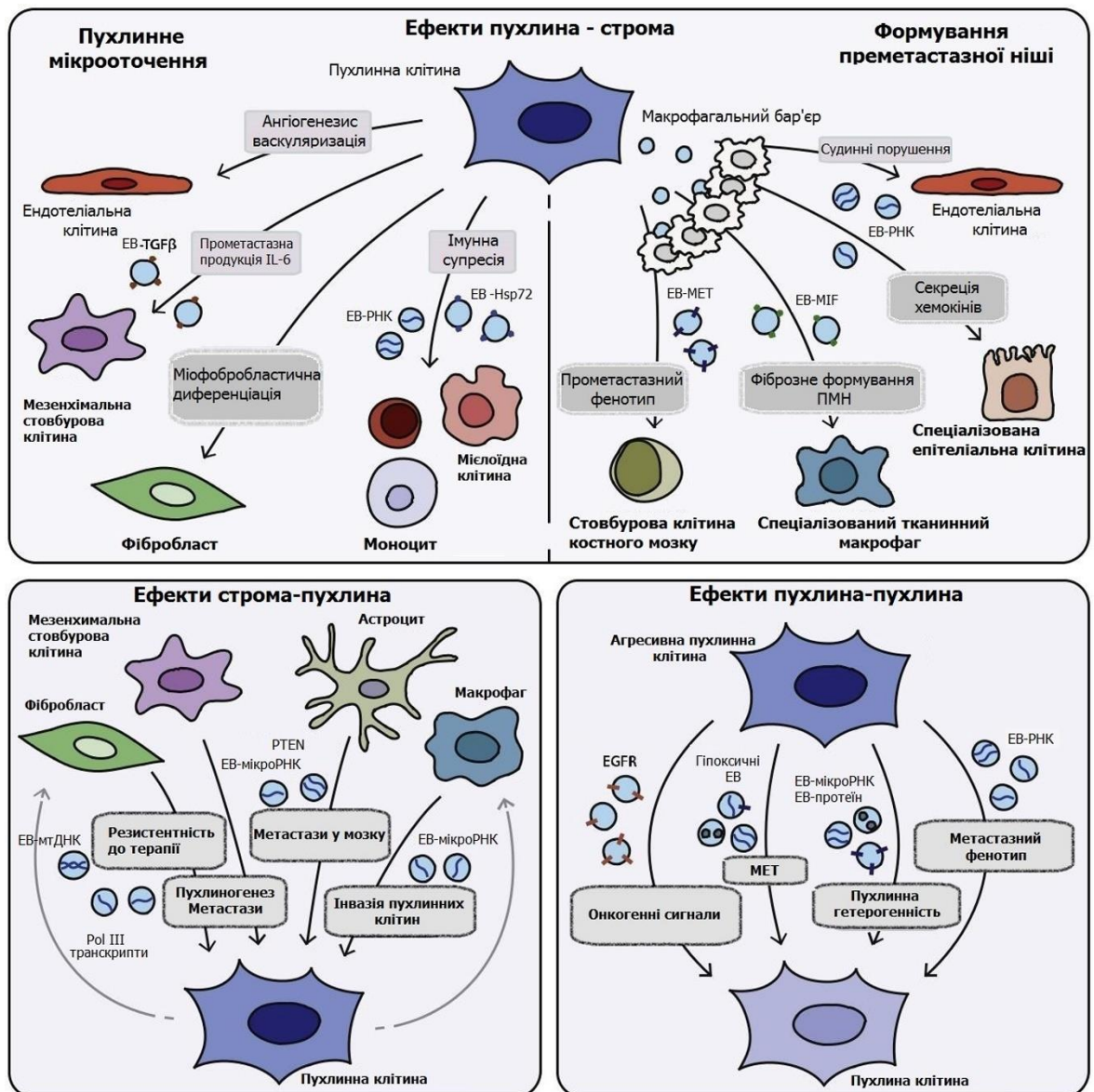


Рис. 34 Функції екзосом у міжклітинній комунікації у випадках пухлина-строма, строма-пухлина та пухлина-пухлина

Внутрішньопухлинна неоднорідність, що характеризує більшість неопластичних уражень, є головною проблемою малігнізації, оскільки збільшує шанси на існування окремих пухлинних клітин або клонів з високо злоякісними або терапевтично стійкими фенотипами. У цьому контексті, екзосом-опосередкована передача сигналів між різними субпопуляціями пухлинних клітин, може мати важливі функціональні наслідки. Ця концепція була продемонстрована на прикладі передачі онкогенного рецептора EGFRvIII через гліобластомні екзосоми, які індукували активацію онкогенних сигналів у клітинах пухлини реципієнта (Al-Nedawi, 2008).

Інші результати показали, що позаклітинні везикули від агресивних клітин раку молочної залози збільшують метастазний потенціал менш злоякісних пухлинних клітин шляхом функціональної передачі РНК (Zomer, 2015). Крім того, модальність зв'язку пухлини з пухлиною особливо актуальна при наявності специфічного мікрооточення, такого як гіпоксія. Дійсно, позаклітинні везикули з гіпоксичних пухлинних клітин можуть викликати переключення на епітеліально-мезенхімальне перетворення (ЕМП) та сприяти інвазії та метастазуванню пухлинних клітин реципієнтів з нормальним вмістом кисню.

Нещодавні дослідження Ріклефа та Годлевські показали, що екзосом-опосередкована комунікація між різними популяціями стовбурових клітин гліобластоми стимулює появу клітин із проміжними фенотипами. Цей результат свідчить про те, що ракові екзосоми не тільки передають злоякісні ознаки між субпопуляціями ракових клітин, але також, можуть поширювати неоднорідність пухлини (Godlewski, 2017; Ricklefs, 2016).

В даний час повністю встановлено, що різні позаклітинні везикули, та, зокрема, екзосоми мають широке коло функціональних властивостей *in vivo*, які можуть застосовуватися в клінічних умовах. Роль екзосом, яка, переважно, визначається їх внутрішньоклітинним ендосомальним походженням, залишається незрозумілою. Природа і динаміка екзосомних субпопуляцій, так само, далекі від розуміння, оскільки існує безліч механізмів, які діють паралельно і обумовлюють мультифакторні ефекти екзосомної сигналізації. В першу чергу, недостатній прогрес у вивченні екзосом полягає у відсутності ефективних інструментів для вилучення екзосом *in vivo*, так само, як для дослідження їх біогенезу. Можливості у визначенні ролі екзосом у міжклітинній сигналізації відкривають методи сумісного культивування клітин-донорів і клітин-мішеней для екзосом. Використання селективних інгібіторів біогенезу, завантаження та функцій екзосом, також, є перспективним напрямком подальших досліджень. Однак, відомі на теперішній час дані, безперечно, вказують на те, що специфічне гальмування екзосомного біогенезу в ракових клітинах дасть визначні відповіді на фактичну роль виділених раком екзосом в онкогенезі та прогресії пухлин.

5.2. Механізми сортування вантажу позаклітинних везикул

Дослідження екзосом разом з їх індивідуальним вантажем потребує окремих методів ізоляції та очистки для визначення клітинного походження та індивідуальних функціональних характеристик. На даний час, найбільш

поширеним шляхом ізоляції екзосом залишається диференціальне ультрацентрифугування (Gardiner, 2016). Такий методичний підхід передбачає видалення забруднювального матеріалу через серію низькошвидкісних центрифугувань з наступною седиментацією екзосом на вищих швидкостях. Ультрацентрифугування є невитратним методом з високою пропускною спроможністю, що робить його потужним і ефективним засобом виділення екзосом в багатьох лабораторіях. Однак, в такий спосіб, разом з екзосомами отримують певне забруднення через седиментацію окремих неекзосомних протеїнів та інших забруднюючих речовин. Комбінація ультрацентрифугування з іншими методами очищення, такими як ультрафільтрація або центрифугування в градієнті щільності, може значно покращити рівень очистки зібраних везикул за рахунок відокремлення цих часток від макромолекул. На жаль, використання лише центрифугування в градієнті щільності є трудомістким і не в змозі відокремити екзосоми від усіх забруднюючих речовин схожої щільності.

Використання альтернативних методів, таких як гель-проникна хроматографія, імуноафінне зв'язування, мікропроточні методи та методи осадження є перспективними і все ширше використовуються в останній час. В будь якому разі, кожен з цих методів має власні переваги і недоліки, які ретельно досліджуються для розробки ізоляції екзосом, що генеруються різними типами клітин.

Гель-проникна хроматографія дозволяє отримати зразки екзосом відмінної чистоти, але розбавляє такі фракції і тому вимагає додаткових процедур для підвищення концентрації везикул. Навпаки, методи преципітації, як правило, призводять до відокремлення більшості везикул, але з відносно низькою чистотою.

На окрему увагу заслуговують імуноафінні методи, в яких використовують специфічні властивості вмісту поверхневих маркерів екзосом. Окремі типи екзосом можуть бути відокремлені за рахунок експресії на їх поверхні характерних протеїнів або їх комплексів. Наприклад, всі екзосоми, які експресують CD63 на їх поверхні можуть бути очищені за один крок імуноафінної сорбції. Однак, маркери, які здатні розрізняти екзосоми, екзосоми, апоптотичні тіла та інші позаклітинні везикули ще не ідентифіковано, а запропоновані маркери, такі як CD63, можна знайти на різних підтипах екзосом (Ramirez, 2018). В той же час, використання різних методів, які засновані на різних характеристиках екзосом, таких як розміри, щільність, поверхневі маркери, мають бути адаптовані до індивідуальних характеристик кожного окремого типу екзосом.

Ізоляція і очищення окремих типів екзосом потребує розробки унікальної стратегії з урахуванням усіх основних характеристик цих везикул, що може потенційно збагатити рівень очищення і вміст певної субпопуляції везикул. З іншого боку, використання комплексу методів очищення можуть створювати непередбачувані оманливі результати.

Після того як позаклітинні везикули були ізольовані та очищені, окремими питаннями є їх відокремлення від інших наночасток і характеристика вантажу екзосом. Дослідження вантажу, зокрема, молекул протеїна, РНК, ДНК та інших, потребує їх екстракції з везикул та розподілу на відповідні до цілей дослідження фракції. В залежності від методів екстракції, вихід та вміст індивідуальних типів макромолекул може широко варіювати і вносити суттєву розбіжність в очікувані результати (Eldh, 2012). У деяких випадках для видалення протеїнів та/або нуклеїнових кислот використовують додаткову обробку зовнішньої поверхні везикул відповідними ензимами. Наприклад, в окремих протоколах рекомендована кількісне оцінювання везикулярної РНК до і після того, як екзосоми обробляють протеїназами та/або РНКазами. Такий підхід дозволяє визначити внесок поверхневих РНК в загальний вміст РНК (Mateescu, 2017).

В будь якому разі, не існує уніфікованого методу ізоляції та очищення екзосом. В кожному випадку тип клітинного походження екзосом та їх індивідуальні властивості повинні бути ураховані в розробці комплексу методів отримання очищених зразків та стратегії дослідження вмісту екзосомальних вантажів. Всі отримані на теперішній час результати свідчать про принципову важливість послідовного та детального аналізу експериментальних методів для точної і адекватної інтерпретації проведених досліджень екзосом.

Сучасні молекулярні методи дослідження дозволили виявити наявність різних класів РНК у вантажі екзосом. Зокрема, в екзосомах з нормальних і ракових клітин ідентифіковані інформаційні РНК, транспортні РНК, рибосомальні РНК, мікроРНК та інші (Cha, 2015; Shurtleff, 2017). Серед усіх типів РНК найбільш інтригуючими є екзосомальні мікроРНК. Некодуючі молекули мікроРНК можуть регулювати трансляцію та деградацію численних мішеней мікроРНК, що робить цей тип РНК потужним регулятором проявів клітинного фенотипу. В ранніх роботах було показано, що екзосомна мікроРНК щільно пов'язана з прогресуванням раку. Однак, механізми, що лежать в основі сортування мікроРНК в позаклітинні везикули, залишаються погано вивченими. Цілком зрозуміло, що широке варіювання вмісту та типів мікроРНК у екзосомах та відмінність загального складу і функціональних властивостей везикул, які генеруються

різними типами пухлин, значно ускладнює отримання прямих доказів ролі мікроРНК у канцерогенезі.

Вміст мікроРНК виявлений в екзосомах з клітин ліній колоректального і раку молочної залози становив від 5 до 30% відносно загального вмісту РНК (Cha, 2015). В екзосомах з непухлинних клітин вміст мікроРНК показаний як 50% у гепатоцитах миші та <1% в клітинній лінії нирок HEK293T. Варіювання вмісту мікроРНК в екзосомах в залежності від типу батьківської клітини вказує на те, що для певних мікроРНК існують селективні механізми сортування та/або виключення з везикул. Незважаючи на те, що механізми, за якими здійснюється сортування, залишаються незрозумілими, окремі результати показали, що певні послідовності мікроРНК мають спорідненість до РНК-зв'язуючих протеїнів, які можуть виступати посередниками сортування в ході формування екзосом. Зокрема, було встановлено, що рибонуклеопротеїн (РНП) hnRNPA2B1 забезпечує селективне сортування мікроРНК, які містять GGAG-мотив у 3' половині їхньої послідовності (Villarroya-Beltri, 2013).

В іншому дослідженні встановлено, що РНП синаптотагмін, протеїн, що зв'язує цитоплазматичну РНК (SYNCRIP), може селективно сортувати мікроРНК, які мають у своєму складі GGCU-послідовності. Крім того, показано, що фактор hnRNPA2B1 має бути приєднаний до невеликих убіквітин-подібних модифікаторів для ініціації та виконання процесу сортування, таким чином, формуючи додатковий шар в механізмі регулювання завантаження екзосом. У який спосіб комплекс РНП-мікроРНК обирається для сортування залишається відкритим питанням. У деяких випадках, як, наприклад, для hnRNPA2B1, протеїн може бути виявлений у складі вантажу екзосом, що доводить наявність селективного сортування даного комплексу.

Проте, подібний механізм не обов'язково має бути саме таким для всіх РНП. Убіквітинація РНП HuR змушує протеїн вивільняти зв'язану мікроРНК. Встановлено, що убіквітинований HuR поєднується в першу чергу з МВТ, де відбувається сортування вантажу екзосом. Убіквітин-модифіковані протеїни мають значно низьку афінність до відповідних РНК-мішеней у порівнянні з неубіквітинованим РНП HuR (Mukherjee, 2016). Важливим фактом для розуміння механізму сортування екзосомного вантажу є результати, які показали, що бокування активності РНП hnRNPH1 збільшує вміст загальної РНК в EV. Таким чином, РНП також можуть виключати певні мікроРНК з вантажу екзосом. У багатьох випадках виявлено, що РНП-опосередковані зміни в сортуванні мікроРНК були пов'язані з пухлиногенезом. Наприклад, основний звідний протеїн (MVP)

регулює сортування супресивної мікроРНК-193а пухлин в екзосомах, ефективно видаляє її з клітин і, таким чином, веде до проявів більш агресивного пухлинного фенотипу.

Протилежний ефект для супресору пухлин VPS4A був виявлений в клітинах гепатоми. Підвищення експресії VPS4A викликало накопичення пухлино-супресивних мікроРНК в клітинах та завантаження онкогенних мікроРНК в їх екзосоми, тим самим зменшуючи ріст, міграцію та інвазію ракових клітин. Додаткові приклади РНП з відомими онкогенними або пухлино-супресивними функціями, які були пов'язані з сортуванням вантажу екзосом, були продемонстровані з анексіном А2 (ANXA2, саркоми щурів Кірстена (KRAS), Y-box зв'язуючим протеїном 1 (YB-1), MEX3C та Argonaute 2 (AGO2).

Показано, що AGO2 не є єдиним компонентом специфічного сортування мікроРНК, які завантажуються в екзосоми. Окремі компоненти складного механізму були виявлені в позаклітинних везикулах клітин раку молочної залози, зокрема, що включає РНК-індукований занурення (RISC), включаючи AGO2, Dicer, і тРНК-зв'язуючий протеїн (TRBP). В той же час, механізм сортування мікроРНК за участю Dicer визнано CD43-залежним (Melo, 2014). На противагу, екзосоми, які генеруються культивованими моноцитами, містять одноланцюгові, зрілі мікроРНК поряд з низьким рівнем AGO2, що свідчить про те, що сортування мікроРНК відбувається незалежно від RISC. Таким чином, може існувати два незалежних шляхи, один з яких включає сортування попередників мікроРНК разом з механізмом RISC, і той, який включає сортування зрілих мікроРНК (Fatima, 2017).

Крім РНП, кінцеві 30-ти нуклеотидні доповнення (НТД) також регулюють сортування мікроРНК. МікроРНК з 30-кінцевим аденілюванням у вантажі незрілих клітинних везикул, як правило, надмірно представлені в самих клітинах, тоді як ті, що мають 30-ти кінцевий урідильний додаток, більш надмірно представлені в позаклітинних везикулах, особливо в екзосомах. Незважаючи на значний прогрес у дослідженні екзосомного вмісту мікроРНК, основні механізми залишаються незрозумілими. Невідомо, чи можуть урідильовані мікроРНК дійсно сортуватися в позаклітинних везикулах, і якщо так, то яким чином відбувається сортування. НТД змінюють стабільність і активність мікроРНК, що, у свою чергу, може вплинути на їх доступність для сортування. Аденіляція стабілізує мікроРНК, дозволяючи їм взаємодіяти з їхніми мішенями мРНК у клітині, тоді як урідилування має протилежний ефект. Блокована урідиновим доповненням активність мікроРНК може опосередковувати

попередження знизити взаємодії мікроРНК-мРНК, що сприяє сортуванню вільної мікроРНК. Дійсно, зміна рівня експресії мікроРНК або його відповідної комплементарної мРНК може змінювати кількість цієї мікроРНК в позаклітинних везикулах.

На додаток, біогенез позаклітинних везикул та сортування вмісту мікроРНК регулюються ліпідними компонентами мембран, зокрема, церамідами. У випадку екзосом, цераміди продукуються через розпад сфінгомієліна нейтральними сфінгомієліназами (nSMnase) у мембрані МВТ. Запобігання утворенню церамідів шляхом інгібування nSMази за допомогою GW4869 значно знижує вміст малих РНК в позаклітинних везикулах і зменшує кількість екзосом, що вивільняються клітинами *in vitro* (Trajkovic, 2008). Крім того, лікування клітин раку молочної залози за допомогою GW4869 пригнічувало сортування проангіогенного мікроРНК-210 в позаклітинних везикулах, тим самим інгібуючи пухлинонестимульований ангіогенез. Вважається, що церамід відіграє важливу роль у сортуванні через формування багатих церамідами ліпідних мікродоменів.

Сортування може відбуватися безпосередньо через взаємодію мікроРНК з багатими на церамід мікродоменами в мембрані МВТ або опосередковано через мікродомен-залежний набір протеїнів в ділянках сортування. Специфічні мікроРНК-последовності демонструють більшу афінність до цераміда, ніж інші, таким чином забезпечуючи потенційний механізм для сортування мікроРНК шляхом сигналів на основі последовності нуклеотидів. Можлива також, участь цераміда в ході сортування мікроРНК деякими РБП. Показано, що церамід асоційований з hnRNPA2B1 в цитоплазмі, і GW4869 інгібує HuR-опосередковане сортування мікроРНК-122 та MEX3C-опосередковане сортування мікроРНК-451a в екзосомах. В той же час, сортування мікроРНК-451a не залежить від ендосомальних комплексів сортування ESCRT, необхідних для транспортування.

Вантаж мікровезикул, зокрема, може бути змінений зовнішніми факторами, включаючи гіпоксію, канцерогени, такі як азбест або толуол, а також інфекцію онкогенними вірусами. Як і у випадку РБП, ці фактори можуть змінювати вміст мікровезикул з різною функціональною спрямованістю, і таким чином, може сприяти або, навпаки, пригнічувати ріст пухлини.

Особливості механізмів вірусної інфекції забезпечують надзвичайно потужний вплив на процес сортування мікроРНК в екзосомах. Реплікація вірусів критично модулює регуляторні шляхи метаболізму інфікованих

клітин, і в такий спосіб, змінює мікросередовище пухлини та сприяє пухлиногенезу. Показано, що герпесвірус може сприяти пухлиногенезу саркоми Капоші. Геном герпесвіруса кодує набір з 12 пов'язаних з латентністю мікроРНК, які були знайдені в екзосомах інфікованих клітин хазяїна (Yogev, 2017). Перенесення вірусних мікроРНК в неінфіковані клітини за допомогою позаклітинних везикул призводить до зміни аеробного гліколізу, який підтримує ріст клітин саркоми, забезпечуючи їх метаболітами, багатими енергією. Таким чином, вірусно-кодовані екзосомні мікроРНК використовуються для перепрограмування мікросередовища пухлини, так само, як і для посилення росту ракових клітин, інфікованих герпесвірусом.

Чутливість вмісту екзосом до генетичних та зовнішніх стимулів свідчить про перспективні можливості їх використання в якості біомаркерів патогенезу. Використання екзосом в якості біомаркерів має значні переваги, оскільки мікроРНК у складі позаклітинних везикул була виявлена в численних рідинах організму, включаючи кров, сечу, плевральний випіт, слину і таким чином, можуть відбиратись неінвазивно. Більш за те, присутні у екзосомах окремі мікроРНК є специфічним біомаркером, який є винятково чутливим до критичних станів, що потребують дискримінацію тісно пов'язаних захворювань, таких як метастатичні та неметастатичні пухлини, рецидивуючі та не рецидивні пухлини. Крім того, численні дослідження показали, що мікроРНК, як біомаркери позаклітинних везикул повертаються до нормального рівня після хірургічної резекції пухлини. Такий результат, беззаперечно, свідчить про ефективність їх використання для контролю прогресування захворювання. Незважаючи на такі обнадійливі результати, широкомасштабні наступні дослідження валідації необхідні для визначення певних молекулярних механізмів, за допомогою яких, мікроРНК виконують роль міжклітинних сигналів як активації, так і пригнічення пухлиногенезу.

Слід зазначити, що деякі мікроРНК неодноразово виявлялися в окремих дослідженнях як особливо перспективні біомаркери пухлин. Останнім часом, онкогенну мікроРНК-21 запропоновано як біомаркер для різних типів пухлин, включаючи рак молочної залози, простати, сечового міхура, головного мозку, гортані, печінки. На додаток, показано, що вміст мікроРНК-375 і мікроРНК-200 в значній мірі асоційовані з пухлиногенезом.

Сортування мРНК та інших типів РНК у позаклітинних везикулах

Вміст вантажу мРНК в екзосомах становить незначну частину загальної РНК. В позаклітинних везикулах, отриманих з стовбурових клітин гліоми, мРНК становила <10% від загальної РНК. Однак, дуже важко оцінити, яку частку мРНК можна віднести до повнорозмірних мРНК, оскільки метод визначення одночасно реєструє і фрагменти мРНК. Окремі субтипи позаклітинних везикул, наприклад, екзосоми більш збагачені мРНК у порівнянні з екзосомами. Незважаючи на невизначеність щодо вмісту мРНК у позаклітинних везикулах, численні дослідження показали, що функціональні мРНК можуть бути перенесені за допомогою екзосом в клітини-мішені, де вони транскрибуються, і можуть змінювати фенотип клітини реципієнти. Показано, що мРНК протеїна hTERT, яка кодує каталітичну субодиницю ферменту теломерази, переноситься через позаклітинні везикули в сусідні фібробласти, збільшуючи тим самим їх проліферацію, подовжуючи їх термін функціональної активності, відкладаючи старіння та захищаючи від пошкоджень ДНК.

Крім того, мРНК hTERT виявлена у 67,5% зразків позаклітинних везикул, що були відібрані з сироватки 133 пацієнтів з різними пухлинами. В той же час, жодний контрольний зразок від 45 здорових особин не містив мРНК hTERT. Ці результати вказують на необхідність подальших досліджень екзосомного вмісту мРНК hTERT для використання в якості біомаркера окремих видів раку.

Недавні дослідження показують, що присутність конкретних ділянок послідовності нуклеотидів відіграє ключову роль у сортуванні мРНК в позаклітинних везикулах. Виявлено, що протеїн YB-1, який також пов'язаний з сортуванням мікроРНК, виявив взаємодію саме з мРНК, у яких 3' нетрансльованій ділянці (UTR) що містила будь-яку з трьох специфічних послідовностей. Однак, показано, що метилтрансфераза NSUN взаємодіє лише з однією з таких послідовностей. Надмірна експресія протеїна YB-1 у численних типах пухлин ініціює активну проліферацію клітин, і таким чином, може забезпечувати зв'язок між прогресуванням раку та сортуванням і пакуванням позаклітинних везикул.

Переважає пакування некодуючих послідовностей мРНК було продемонстроване для вантажа екзосом генерованих клітинами гліобластоми. Збагачений 25-нуклеотидною UTR 3' ділянки мРНК виявлені в екзосомах з гліобластоми. Однак, повнорозмірні мРНК, що містять кодуєчу послідовність, були виключені з позаклітинних везикул в ході

сортування і формування зрілих екзосом. На додаток, в позаклітинних везикулах виявлені, також, інші класи РНК, зокрема, рибосомальна, транспортна, мітохондріальна, довгі некодируючі РНК, короткі некодируючі РНК, дрібні ядерні РНК та циклічні РНК. Лише для деяких з усіх виявлених у екзосомах РНК показаний можливий зв'язок з ефектами у клітинах-мішенях. Наприклад, завантажені довгими некодуючими РНК екзосоми здатні індукувати хемосенсибілізацію та прогресування раку. Однак, роль і значення більшості виявлених в екзосомах РНК залишаються незрозумілими і дискусійними.

Майже усі типи позаклітинних везикул несуть ДНК, які можуть бути геномними (гДНК) або мітохондріальними (мтДНК). Більш за те, залежно від клітинної лінії, функціонального стану та мікрооточення, ДНК можуть бути як одно- так і дволанцюговими, і за розташуванням, можуть бути виявлені як у просвіті, так і на поверхні позаклітинних везикул. Поверхнево включена в екзосоми ДНК може змінювати здатність позаклітинних везикул розпізнавати і зв'язувати фібронектин. Ця особливість дозволяє визначити, як екзосоми взаємодіють з молекулами позаклітинного матрикса, в першу чергу, такими як ті, що знаходяться в мікросередовищі пухлини або в ділянках передметастатичної ніші.

Важливим досягненням останніх років були результати, які показали можливість перенесення ДНК з вантажем позаклітинних везикул від клітин, які генерують екзосоми, до клітин-реципієнтів, в яких ця ДНК може приводити до збільшення виробництва мРНК та онкогенних протеїнів. Таким чином, прогрес пухлиногенезу може бути контрольований екзомно-опосередкованим поширенням онкогенів. Докази ролі екзосомної ДНК у розвитку окремих типів пухлин були отримані з використанням екзосом, отриманих з клітин хронічного мієлоїдного лейкозу. Такі екзосоми несуть вантаж ДНК, що кодує вірусний онкогенний гомолог (BCR/ABL) лейкемії мишей, і здатні доставляти цю ДНК до нейтрофілів та індукувати посилення експресії мРНК BCR/ABL у клітинах-реципієнтах (Cai, 2014).

Мітохондріальна ДНК в екзосомах зберігає функційну активність і, як було встановлено для фібробластів, пов'язаних з раком, відіграє певну роль у стійкості клітин раку молочної залози до гормональної терапії (Sansone, 2017).

Нажаль, залишаються мало відомими процеси сортування і завантаження ДНК у позаклітинні везикули. Однак численні дослідження повідомляють, що екзосоми з ракових клітин містять геномну ДНК майже з усіх хромосом. Більш за те, принаймні одне дослідження дало докази упаковки всього мітохондріального геному в межах позаклітинних везикул.

Ці результати дозволяють припустити, що для вибіркового сортування специфічних послідовностей ДНК в клітинах можуть бути відсутні механізми.

Однією з функцій екзосом є видалення зайвого молекулярного сміття. Окремі дослідження свідчать на користь цього. Наприклад, блокування вивільнення позаклітинних везикул у фібробластах людини та різних ракових клітинних лініях призводить до накопичення пошкодженої ДНК в цитоплазмі. Однак, ця функція екзосом може бути не головною, а лише одним з багатьох функційних призначень позаклітинних везикул. Цитоплазматична ДНК може розпізнаватися ДНК-чутливими протеїнами, активація яких призводить до пошкодження геномної ДНК, старіння або апоптозу. З огляду на ці докази, цілком можливо, що позаклітинні везикули відіграють певну роль у підтримці клітинного гомеостазу шляхом неселективного видалення цитоплазматичної ДНК.

На відміну від ідеї неспецифічної упаковки гДНК, було виявлено, що апоптозні тіла, екзосоми та екзосоми містять спільні та унікальні послідовності ДНК (Lázaro-Ibáñez, 2014), що дозволяє припустити існування незалежних механізмів пакування ДНК для кожного з везикулярних субтипів.

На окрему увагу заслуговує факт, що клітини з специфічними мутаціями у власній гДНК вивільняють позаклітинні везикули, що містять ДНК з тими самими мутаціями. Дійсно, ДНК, що містить мутації, ідентичні гДНК, була знайдена в супернатантах окремих клітинних культур, плазмі крові пухлиноносіїв та в крові пацієнтів хворих на різні типи раку.

Таким чином, екзосомна ДНК, отримана з крові, може бути зручним джерелом клінічно важливої інформації. На користь цього свідчать результати виявлення щонайменше 10 потенційно клінічно ускладнених мутацій у ДНК пацієнтів з раком підшлункової залози і визначення специфічних мутацій трьох відомих онкогенів у пацієнтів з різними типами раку з загальною чутливістю не нижче 95 %. Основною перевагою мутаційного аналізу ДНК в порівнянні з іншими методами, такими як стандартні біопсії, є здатність збирати зразки протягом курсу лікування, що зменшує потребу в інвазивних біопсіях. Така гнучкість та оперативність аналізу дозволить лікарям контролювати геномні зміни в пухлині з плином часу.

Сортування протеїнів пухлинних екзосом

Протеїни визнані центральним типом екзосомного вантажу, який забезпечує специфічне спрямування везикул до певних клітинних типів. Нажаль, молекулярні механізми сортування протеїнів у везикулах залишаються не повністю зрозумілими. Ключовим шляхом сортування протеїнів позаклітинних везикул визнані комплекси ендосомального сортування необхідні для транспортування (ESCRT) та окремі допоміжні протеїни. Комплекси ESCRT розпізнають і зв'язують убіквітиновані протеїни, і в такий спосіб сприяють їх сортуванню в позаклітинних. Інші механізми сортування протеїнів у позаклітинних везикулах включають димеризацію, а також опосередковане залучення через інші протеїни, такі як тетраспаніни (Itoh, 2018; Perez-Hernandez, 2013). Але, нажаль, всі відомі процеси не пояснюють спрямованого завантаження окремих протеїнів у везикули.

Ключовими протеїнами екзосом, які спроможні спрямовувати везикули на певні клітини-мішені можуть бути специфічні адгезивні молекули. Особливо важливими в цьому виявлені молекули сімейства інтегринів (ITGs), інтегральних мембранних протеїнів, які, як відомо, сприяють взаємодії клітина-позаклітинний матрикс. Визначено, що вміст окремих типів інтегринів переважає в екзосомах які спрямовані на певний тип клітин. Зокрема, екзосоми, які містять інтегрин 1 та інтегрин 4 головним чином спрямовані на клітини S100 α 4-позитивних фіброblastів у легенях. В той же час, екзосоми, які навантажені інтегрином 5 та інтегрином VI переважно спрямовані на клітини Купфера у печінці. В достатньо значній кількості виявлений інтегрин 3 у екзосомах, які спрямовані на мозок, де вони в першу чергу поглинаються ендотеліальними клітинами.

Представлені, також, докази того, що захоплення позаклітинних везикул в певних тканинах може відігравати ключову роль у визначенні ділянок розташування метастазів. Про такий механізм свідчать результати збільшення метастазної здатності клітин раку молочної залози у легенях, яке індуковане введенням легенево-трофічних екзосом. Слід зазначити, що зазвичай клітини раку молочної залози метастазуються у клітинах кісткового мозку (Hoshino, 2015).

Більше того, позаклітинні везикули можуть змінювати експресію генів у клітинах-мішенях передметастатичної ніші, яка може включає поряд з пухлинними також стромальні клітини. Наприклад, мікроРНК з астроцитарних екзосом пригнічують експресію супресора пухлин PTEN у клітинах, які метастазуються в мозок, тим самим сприяючи розвитку

метастаз у нервовій тканині (Zhang, 2015). Крім того, показано, що мікроРНК-122-вміщуючі екзосоми з клітин раку молочної залози сприяють наповненню предметастатичної ніші через пригнічення піруваткінази в стромальних клітинах і таким чином надають перевагу пухлинним клітинам використовувати глюкозу для метаболічних витрат в ході метастазування ракових клітин (Fong, 2015).

На відміну від інтегринів, які спрямовують екзосоми на певні клітинні мішені, виявлено протеїни, які можуть змінювати або блокувати захоплення позаклітинних везикул. Наприклад, REG3 перешкоджає поглинанню екзосом клітинами-мішенями шляхом зв'язування з глікопротеїнами на поверхні везикул. Аналогічним чином встановлено, що CD47, антифагоцитарний сигнал, блокує поглинання екзосомних об'єктів імунними клітинами, тим самим збільшуючи їх час циркуляції у крові. Ці результати дозволяють припустити, що маніпуляція поверхневими протеїнами позаклітинних везикул може бути використана для зміни їх клітинної спрямованості та блокування їх пропухлинних ефектів.

Окремі екзосомні протеїни розглядаються в ролі маркерів, які можуть надавати інформацію про клітинне походження позаклітинних везикул. Тетраспаніни, сімейство протеїнів, які охоплюють мембрану й включають CD63, CD9 та CD81, є одними з найбільш часто згадуваних “екзосомних маркерів”. На жаль, припущення про те, що такі маркери зустрічаються на всіх екзосомах, є надмірним спрощенням. По-справжньому специфічних маркерів, які виявляються на всіх екзосомах, не визначено, і цілком можливо, не існує. CD63 та CD9 також виявлені у різних підтипах позаклітинних везикул, включаючи екзосоми та апоптозні тіла (Kowal, 2016).

Різниця між екзосомними підтипами може бути опосередкована значною кількістю варіантів комплексу тетраспанінів, а також, особливостями біогенезу, сортування вантажів та тропізму екзосом. Таким чином, субпопуляції екзосом, які відрізняються за вмістом тетраспаніна, також можуть відрізнятися за їх біологічною функцією. Подальше детальне вивчення того, як краще отримати та очистити позаклітинні везикули на основі маркерів протеїна та чи є ці відмінності дійсно біологічно значимими, є ваговою підставою для досліджень.

Роль позаклітинних везикул у канцерогенезі

Вивільнення позаклітинних везикул з пухлинних клітин відіграє важливу роль у міжклітинній комунікації, забезпечує передачу сигналів до

безпосередньо оточуючих пухлину клітин та віддалених клітин через кров або інші біологічні рідини.

Фібробласти є основним компонентом пухлинної строми. За умов росту пухлини фібробласти можуть зазнавати морфологічних змін, які сприяють трансформації їх у фенотип, подібний до активованих міофібробластів. Показано, що пухлинні екзосоми здатні індукувати трансформацію нормальних стромальних фібробластів у активовані пухлино-асоційовані фібробласти (CAFs) (Baroni, 2016). Наприклад, екзосоми з клітин раку простати спроможні індукувати трансформацію фібробластів у пухлино-асоційований фенотип (Webber, 2015).

Встановлено, що здатність екзосом стимулювати активацію пухлино-асоційованих фібробластів корелює з агресивністю пухлинних клітин. Екзосоми з більш агресивної клітинної лінії спонукають трансформацію у екстремально виражений пухлино-асоційований фенотип, надзвичайно швидко проліферацію та інтенсивне вивільнення ферментів фібробластами, у порівнянні з екзосомами, з менш агресивної клітинної лінії (Giusti, 2018).

Після активації трансформовані фібробласти вивільняють позаклітинні везикули, які сприяють пухлиногенезу шляхом збільшення проліферації, міграції, епітеліально-мезенхімальному переходу, метаболічним змінам в пухлині, ангиогенезу та трансформації наступних фібробластів.

Вплив екзосом на васкуляризацію за умов гіпоксії

Однією з ключових ознак раку є здатність пухлинних клітин індукувати ангиогенез у власному мікрооточенні. Дослідження ефектів пухлинних екзосом показали, що їх вантаж містить окремі проангіогенні молекули і може потрапляти до ендотеліальних клітин. Непоодинокі результати свідчать, що такі екзосоми модулюють міжклітинну адгезію, сприяють васкуляризації, міграції, проліферації ендотеліальних клітин у різних типах раку (Lawson, 2017; Schillaci, 2017).

Наприклад, рецептор фактору росту ендотелія EGFR, виявлений в позаклітинних везикулах, спроможний індукувати сигналізацію як EGFR, так і VEGFR в ендотеліальних клітинах-мішенях. В той же час блокування екзосом-опосередкованої передачі EGFR викликало зниження росту пухлини та ангиогенезу. Фактори, що продукуються у відповідь на гіпоксію здатні активувати ангиогенез. Зокрема, показано, що екзосоми, вироблені гіпоксичними пухлинними клітинами, мають більш виражений ефект на стимуляцію ендотеліальних клітин в просуванні ангиогенезу, ніж ті, що

походять від нормоксичних клітин. Гіпоксія збільшує продукцію екзосом пухлинними та стромальними клітинами і змінює склад їх вантажу.

Наявність специфічного сортування доводять недавні результати, які показали, що мікроРНК-23а виявляється переважно в екзосомах з гіпоксичних, але не нормоксичних, ракових клітин легень. МікроРНК-23а сприяє ангіогенезу через гальмування пролілгідроксилази в ендотеліальних клітинах-мішенях. Інші молекули, які виявлені у складі вантажу екзосом, також, відіграють важливу роль у сприянні ангіогенезу, в першу чергу, окремі мікроРНК та фактор гіпоксії 1.

Дослідження клітинних маркерів, які свідчать про походження пухлини, показало суттєву асоціацію між вмістом цих маркерів у вантажі екзосом та їх ангіогенним ефектом. У клітинних лініях клітин карциноми нирок було виявлено, що CD105-позитивні клітини вивільняють позаклітинні везикули, які збільшують проліферацію, утворення судин та інвазію в ендотеліальні клітини HUVEC, тоді як везикули з CD105-негативних клітин не виявили ангіогенної дії.

Представлені на теперішній час результати свідчать про неоднорідність як вантажу пухлинних екзосом, так і їх ангіогенної активності. Однак, безумовно, окремі типи пухлинних клітин секретують позаклітинні везикули, що несуть унікальний набір вантажів, і доставка таких позаклітинних везикул до клітин-мішеней здатна змінювати фенотипи стромальних клітин у певних випадках.

Окремі підтипи позаклітинних везикул виконують широке коло комунікаційних функцій всередині пухлинної ніші. Мінчіачі та його колеги виявили, що великі онкосоми здатні перепрограмувати фібробласти передміхурової залози через зміни в шляхах MYC/AKT1, а не через TGF, як це було виявлено для окремих типів екзосом.

Таким чином, різні підтипи позаклітинних везикул перепрограмують фібробласти, використовуючи різні механізми. Отримані в останній час результати різними дослідницькими групами підтверджують висновок про те, що різні підтипи позаклітинних везикул виконують унікальні функції всередині пухлинної ніші.

5.3 Стратегії використання позаклітинних везикул

Екзосоми демонструють властивості, які презентують їх ідеальними інструментами для спрямованої доставки ліків. Вони нетоксичні, добре переносяться в організмі, легко засвоюються клітинами і можуть бути призначені для засвоєння специфічними тканинами (Ohno, 2013).

Загальна стратегія включає інженерні екзосоми, що містять конкретний вантаж, такий як проапоптотичні протеїни, мікроРНК або мРНК, хіміотерапевтичні лікарські засоби або молекули, орієнтовані на конкретні онкогени. Дійсно, в декількох роботах описано методику ефективного включення siRNAs в екзосоми (Kamerkar, 2017; Greco, 2016). Наприклад, Альварес-Ервіті та його колеги вдало використовували цілеспрямовані екзосоми з дендритних клітин, завантажені siRNA, для націлювання на мозок мишей, виходячи з того, що такий підхід справді сприяє знищенню клітин-мішеней. Додатковий підхід передбачає протидію пропухлиним ефектам екзосом. Один з таких підходів полягає в тому, щоб безпосередньо видалити певний тип позаклітинних везикул з обігу. Наприклад, Марлео та його колеги описують екстракорпоральну систему гемофільтрації, яка фільтрує кров для компонентів нижче 200 нм і видаляє їх за допомогою афінних агентів для молекул-мішеней. Однак незважаючи на обнадійливі результати, додаткові дослідження необхідні для перевірки клінічної корисності цього пристрою.

Наступний приклад продемонстрований Нішіда-Аокі та колегами показав стратегію використання антитіл для зниження вмісту позаклітинних везикул у крові мишей. Автори виявили, що навантаження екзосом анти-CD9 або анти-CD63-антитілами стимулюють видалення позаклітинних везикул макрофагами, і в такий спосіб, значно зменшує концентрацію усіх типів позаклітинних везикул у крові. Хоча це лікування не впливало на первинну пухлину, автори спостерігали значне зниження метастазів (Nishida-Aoki, 2017).

Інша стратегія показана на прикладі блокування біогенезу позаклітинних везикул в клітинах пухлини за допомогою виключення генів, що кодують фактори завантаження або окремих етапів біогенезу екзосом пухлинних клітин, є ще одним потенційним шляхом для інгібування пухлинного генезу. Наприклад, нокдаун SMPD3 та RAB27A призвів до зниження секреції екзосом та зменшення пухлин у тваринних моделях. Однак такі стратегії можуть перешкоджати нормальному процесу екзосом-опосередкованого зв'язку. В будь-якому разі, потрібна розробка таких стратегій, які будуть ефективними по відношенню до екзосомних функцій, але з мінімізацією нецільових ефектів.

Використання позаклітинних везикул в імунотерапії пухлин

Процеси метастазування раку потребують постійного зв'язку та обміну сигналами між раковими клітинами та віддаленим середовищем

метастазної ніші. Саме екзосоми можуть сприяти цьому перехресному процесу, через залучення і перепрограмування стромальних клітин-мішеней (Kahlert, 2013). Клітини різних гліом експресують рецептор онкогенного епідермального фактору росту, відомий як EGFRvIII, який включається пухлинними клітинами до вантажу екзосом. В залежності від виникнення пухлинної клітини зміст ТДС змінюється. Екзосоми з пухлинних епітеліальних клітин містять молекулу адгезії епітеліальних клітин (ЕСАМ) та CD24, які використовуються в якості маркерів поганого прогнозу карциноми. Клітини меланому генерують екзосоми, що завантажені антигеном меланому. Цей специфічний маркер розпізнається Т-клітинами 1 (Mart-1) та молекулою адгезії клітин меланому (Mel-CAM) (Mears, 2004). Останнім часом стрімко зростає кількість доказів того, що екзосоми можуть впливати на метастазування раку шляхом стимуляції ангиогенезу та модуляції імунної системи з метою підтримки пухлинного процесу.

На ранніх стадіях розвитку раку процес імунного контролю виключає передракові та злоякісні клітини через імунно-опосередковані реакції ефektorних клітин, зокрема Т-лімфоцитів та натуральних кілерів. Проте, коли цей процес порушується, імунна система втрачає спроможність знищувати передракові клітини, що сприяє розвитку ліній пухлинних клітин. У мікросередовищі пухлини екзосоми, які генеруються малігнізованими клітинами, є важливими і ефективними посередниками міжклітинної комунікації, і як такі, відіграють особливу роль в дерегуляції імунного нагляду (Greening, 2015). Враховуючи надзвичайно різноманітний склад пухлинних екзосом, зокрема, РНК, ДНК та цитокіни, які представляють характерні риси даного типу пухлини у складі специфічного везикулярного вантажу, оточуючі клітини отримують з такими екзосомами сигнали для модуляції їх транскрипційних та трансляційних механізмів. Вплив вантажу екзосом на імунні клітини може бути як безпосереднє пригнічення функціональної активності CD8-позитивних Т-клітин та/або і натуральних кілерів (NK), так і опосередковані ефекти на експресію регуляторних факторів. З іншого боку, окремі компоненти вантажу пухлинних екзосом можуть брати участь у непрямому представленні антигенів, щоб активувати відповідь. В будь-якому разі, презентація пухлинних антигенів відбувається за участю МНС-пептидних комплексів першого і другого класів в ході активації антиген-специфічних Т-клітин.

Непряма презентація передбачає розпізнавання антигенів пухлинних екзосом клітинами, що здатні презентувати антиген, зокрема, макрофагами та дендритними клітинами. Антиген-презентуючі клітини поглинають, перетравлюють або/та обробляють антиген, який у вигляді окремих

антигенних детермінант представляють імунокомпетентним CD8-позитивним Т-клітинам. Незважаючи на значний прогрес молекулярної та клітинної біології в дослідженнях регулювання імунної відповіді, механізм активації CD4-позитивних Т-клітин менш зрозумілий у порівнянні з активацією CD8-позитивних Т-кілерів. Однак, показано, що пухлинні екзосоми можуть безпосередньо транспортувати первинний продукт трансляції, але відмінний від нативного, який спроможний активувати CD4-позитивні Т-клітини. До того ж, показано, що пухлинні екзосоми можуть бути завантажені не тільки нативними пухлинними антигенами, а також, містять МНС-пептидний комплекс, який є ключовою складовою у презентації антигенів в процесах імунологічного нагляду.

Внаслідок багато спрямованості вантажу екзосом та здатності до перенесення чисельних міжклітинних сигналів, здібності презентувати антиген імунокомпетентним клітинам, екзосоми спроможні як викликати протипухлинну імунну реакцію, так і сприяти росту пухлини через гальмування протипухлинного імунітету (Greening, 2015). Таким чином, ефекти пухлинних екзосом можуть бути різноспрямованими (рис. 35).

Розвиток імунної відповіді спирається на прозапальні медіатори, які можуть завантажуватись в екзосоми з макрофагів, Т-клітин та дендритних клітин. Результати останніх досліджень показали, що екзосоми, одержані з пухлинних клітин виявляють імунокомпетентні властивості та можуть стимулювати імунну відповідь переважно через TNF- α шлях. Активація TNF- α шляху стимулює продукцію та вивільнення епітеліальними клітинами прозапальних цитокінів, таких як IL-8, RANTES та додаткового TNF- α . Екзосоми, що виділяються з дендритних клітин, також можуть індукувати реактивацію та залучення до імунної відповіді інші імунні клітини, зокрема, такі як НК-клітини.

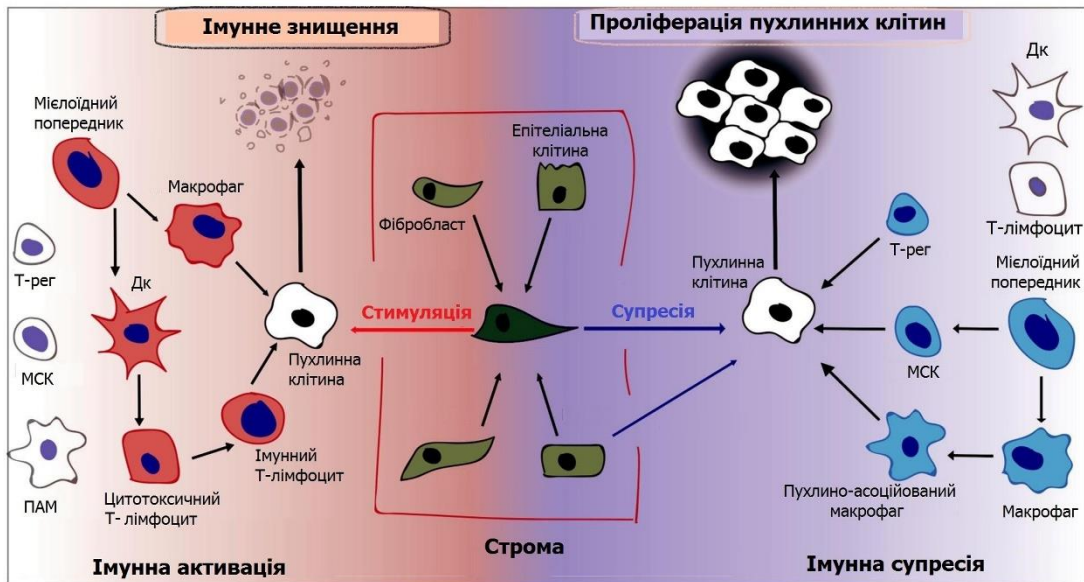


Рис. 35 Функції екзосом у міжклітинній комунікації у випадках пухлина-stroma, stroma-пухлина та пухлина-пухлина.

В той же час, існують експериментальні докази того, що вміст вантажу екзосом може індукувати події в ході регуляції імунної відповіді, які спрямовані на уникнення пухлинних клітин від імунного контролю і специфічного розпізнання пухлинних антигенів. Окремі компоненти екзосомного вантажу здатні викликати порушення функції та регуляції імунних клітин, що сприяє розвитку пухлиногенного середовища.

По-перше, ухилення від імунної відповіді потребує участі компонентів вантажу пухлинних екзосом, щоб запобігти розпізнаванню пухлинного антигена імунними клітинами. Один із способів, який може опосередковувати маскування пухлинних антигенів, є вивільнення МНС класу I вміщуючих ланцюги (MIC) лігандів A і B, які специфічно зв'язуються з NKG2D рецепторами на НК-клітинах. Таке зв'язування блокує рецептори та запобігає розпізнаванню пухлини, одночасно значно пригнічує експресію NKG2D рецепторів на ефektorних НК-клітинах і Т-лімфоцитах. Інший процес передбачає мінімізацію набору адаптивних імунних клітин, що може виникнути, коли завантажена у екзосоми молекула міжклітинної адгезії-1 (ICAM-1) перешкоджає лейкоцитарному зв'язуванню з ендотеліальними клітинами судин (Kalinski, 2010; Lee, 2010). Як правило, ICAM-1 опосередковує зв'язування лейкоцитів з ендотелієм, що дозволяє лейкоцитам трансмігрувати з крові в тканину. Однак, екзосомні форми ICAM-1 демонструють потужні антизв'язуючі властивості, і в такий спосіб, перешкоджають розпізнаванню пухлинних антигенів імунокомпетентними клітинами (Lee, 2010). На додаток, пухлинні екзосоми можуть, також,

викликати зниження експресії критичного CD3 T-клітинного корецептора, що є ключовим компонентом активації T-клітин (Lee, 2009). Таким чином, різноманітні компоненти пухлинних екзосом можуть опосередковувати міжклітинну сигналізацію між пухлинними клітинами і функціонально критичними клітинами імунної відповіді (рис. 36).

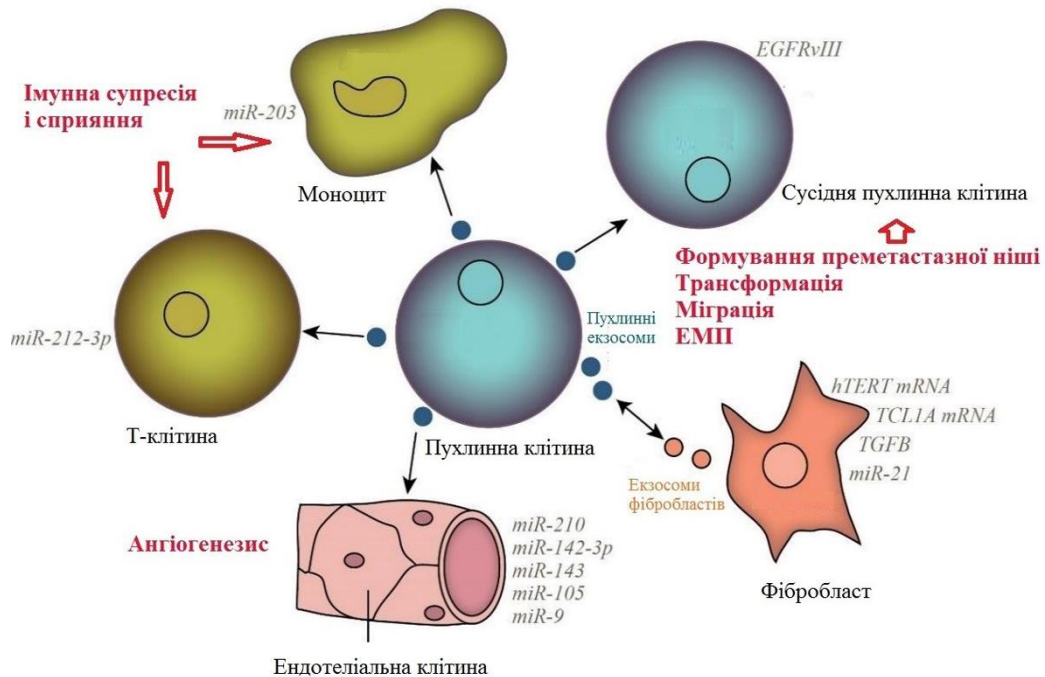


Рис. 36 Альтернативний розвиток подій у пухлинному мікрооточенні

Другий важливий механізм, за допомогою якого екзосоми можуть пригнічувати імунну відповідь, полягає в дерегуляції та дисфункції імунних клітин. Показано, що екзосоми з пухлинних клітин перешкоджають диференціації моноцитів у дендритні клітини і безпосередньо пригнічують біологічну активність дендритних клітин. Мієлоїдні супресори клітин (MDSCs) продукуються в мієлоїдних клітин-попередниках, які стимульовані до диференціювання TGF- β та PGE2 у складі вантажу пухлинних екзосом. MDSCs мають пригнічуючий ефект на імунну відповідь через стимуляцію продукування імуносупресивних факторів. Зокрема, MDSCs активують виробництво таких потужних регуляторів як, оксид азоту та реакційні сполуки кисню. До того ж, MDSCs разом з цими факторами індукує вторинний дефіцит проліферації дендритних клітин, які необхідні для презентації антигена в тканинах (Filipazzi, 2012).

Іншою важливою ланкою імунної відповіді є НК-клітини, які також, можуть пригнічуватись окремими компонентами вантажу пухлинних екзосом. Показано, що пухлинні екзосоми індукують зменшення кількості

NK-клітин, так само, як і їх цитотоксичної активності (Whiteside, 2013). Як згадувалося раніше, це частково пояснюється зв'язуванням та регуляцією рецептора NKG2D. У Т-лімфоцитах вантаж пухлинних екзосом спричиняє дерегуляцію метаболічних шляхів, погіршує активацію CD8-позитивних Т-клітин і викликає апоптоз активованих Т-клітин.

Втручання вантажу екзосом в сигналізацію TCR і IL-2R значно погіршує активацію Т-клітин. Показано, що окремі компоненти вантажу, зокрема, екзосомні FasL та TRAIL можуть вибірково викликати апоптоз у Т-клітинах. Більш за те, вантаж пухлинних екзосом може модулювати експресію важливих рецепторів та перепрограмувати фенотип лімфоцитів. Наприклад, галектин-1 з пухлинних екзосом індукує трансформацію CD8-позитивних клітин у супресорний фенотип. Таке перепрограмування Т-лімфоцитів характеризується втратою експресії CD27/CD28 внаслідок дії вантажу пухлинних екзосом (Maybruck, 2017). Інші результати доводять, що перетворення CD4-позитивних Т-клітин в клітини Т-регуляторів було опосередковано пухлинними екзосомами через індукцію TGF- β 1-залежного шляху (рис. 36).

Комунікація пухлинних екзосом з епітеліальними та субепітеліальними клітинами

Пухлинні екзосоми вивільняють вміст і в такий спосіб спілкуються з іншими клітинами, зокрема, такими як фібробласти, які виконують життєво значущі функції в субепітелії та ендотеліальних клітинах. Фібробласти спроможні мігрувати всередину кровоносних судин і різні тканини. Ангіогенез, який необхідний для інвазивного росту і метастазування пухлини, в першу чергу, залежить від проростання ендотеліальних клітин. Фактор росту ендотелію судин (VEGF) та його рецептори VEGFR є ключовими факторами, що стимулюють васкуляризацію. Розповсюджений майже в усіх типах тканин рецептор VEGFR2 є основним регулятором ангіогенного ефекту VEGF (Yang, 2017). Показано, що екзосоми, які містять мікроРНК-16/322/497/17, спричиняють зменшення експресії VEGFR2 та подальше інгібування ангіогенезу в культурі ендотеліальних клітин. І навпаки, коли мікроРНК-214, яка знаходиться в екзосомах пухлини, секретується з ендотеліальних клітин у складі вантажу екзосом, вона пригнічує старіння та індукує ангіогенез в ендотеліальних клітинах.

Очевидно, екзосоми можуть відігравати подвійну роль, оскільки вони можуть брати участь у супресії пухлин так само, як і підтримувати проліферацію і метастазування пухлини. Однак недавні результати свідчать

про те, що пухлинні екзосоми, в більшості випадків, сприяють ангиогенезу в пухлинах. Екзосоми, що продукуються клітинами епітеліального раку яєчників можуть відновлювати міграцію ендотеліальних клітин шляхом перенесення довгих некодуючих РНК (lncRNAs). Такі РНК являють собою транскрипти, довжина яких перевищує 200 нуклеотидів. Незважаючи на те, що довгі РНК є некодуючими, існують докази того, що вони можуть бути пов'язані з певним колом біологічних процесів, зокрема, з регуляцією генної експресії (Wu, 2017). Клітини аденокарциноми генерують екзосоми, що містять тетраспанін-8, який індукує ангиогенез через стимуляцію VEGF-незалежного регулятора генів пов'язаних з ангиогенезом, зокрема, таких як хемокіни CXCL5 і фактор фон Віллебранд після інтерналізації цих пухлинних екзосом ендотеліальними клітинами. Екзосоми з клітин колоректального раку сприяють міграції ендотеліальних клітин за рахунок активації фактору реакції раннього росту-1 (Egr-1) через сигнальні шляхи ERK1/2 та JNK.

Важливу роль в ангиогенезі, також, відіграють фібробласти, які продукують фактори росту, молекули позаклітинного матриксу та хемокіни. Разом, усі ці фактори активують і сприяють проліферації ендотеліальних клітин. Фібробласти, які виявлені в стромі пухлини, отримали назву асоційованих з раком фібробластів (CAFs). Але, насправді, їхня роль у прогресії розвитку пухлин до цих пір незрозуміла. З іншого боку, існують дані про певний зворотній зв'язок в міжклітинній комунікації між пухлиною і CAFs. Екзосоми CAFs, які локалізовані пухлині молочної залози, містять мікроРНК-21, мікроРНК-37e та мікроРНК-143. Вивільнення екзосом з CAFs і поглинання їх пухлинними клітинами сприяє трансформації раку молочної залози у більш агресивний фенотип. Прогрес пухлиногенезу в такому разі досягається шляхом стимуляції стовбурових клітин та епітеліально-мезенхімального перетворення, що супроводжується втратою полярності та адгезії епітеліальних клітин до мезенхімальних стовбурових клітин.

У порівнянні з нормальними клітинами, у клітинах раку молочної залози експресія p85 α , який є пухлино-супресором, значно знижується. Втрата p85 α у фібробластах призводить до трансформації цих клітин у CAF, які генерують і вивільняють екзосоми, що містять Wnt10b. У свою чергу, Wnt10b сприяє епітеліально-мезенхімальному перетворенню через індукований канонічний Wnt-залежний шлях (Donnarumma, 2017; Chen, 2017). На додаток до вивільнення завантажених екзосом, нестача вантажу у самих фібробластах сприяє переключенню метаболічних шляхів спрямованих на малігнізацію і утворення пухлин. Екзосоми, одержані з CAF оточуючих клітини карциноми печінки, мають знижений вміст мікроРНК-

320a, що може функціонувати як протипухлинна мікроРНК. Таким чином супресія мікроРНК-320a у САФ та недостатність у вантажі екзосом можуть сприяти пухлиногенезу. Це передбачення підтверджується, також, тим фактом, що індукція надмірної експресії мікроРНК-320a в САФ призводить до інгібування проліферації пухлинних клітин та зменшення метастазів.

Екзосома-опосередкована протипухлинна імунотерапія та супресія канцерогенезу

Особливості вмісту вантажів екзосом обумовлюють надзвичайно привабливі можливості використання цих везикул в якості імунних модуляторів з метою спрямування специфічних імунокомпетентних клітин на елімінацію пухлинних клітин. Екзосоми, що генеруються окремими типами клітин імунної відповіді можуть вивільняти захисні фактори у складі вантажу везикул. Показано, що отримані з В-клітин та дендритних клітин екзосоми, виявляють здатність індукувати антиген-специфічні Т- та В-клітинні реакції. Дослідження *in vivo* екзосом з дендритних клітин, показали поліпшення мікросередовища пухлини за рахунок значного збільшення CD8-позитивних Т-лімфоцитів. Більш за те, у тварин, яким вводили екзосоми дендритних клітин, було виявлено підвищені рівні інтерферону- γ та інтерлейкіну-2, зменшення вмісту CD25-позитивних та Foxp3-позитивних Т-лімфоцитів (Трег), так само, як і прозапальних цитокінів інтерлейкіну-10 та TGF- β у ділянках пухлини. У клінічних випробуваннях екзосом, одержаних з дендритних клітин, показано активацію протипухлинного імунітету у пацієнтів з розвиненим недрібноклітинним раком легень через підвищення NKp30-залежних функцій NK-клітин.

Екзосоми, отримані з самих NK-клітин, також мали критично важливий терапевтичний ефект. Результати досліджень, як *in vivo*, так і *in vitro* показали, що отримані з NK-клітин екзосоми, мають цитотоксичні ефекти на клітини меланоми шляхом доставки та інтерналізації в пухлинні клітини перфोरину та FasL, обидва з яких активують клітинну загибель шляхом апоптозу (Zhu, 2017). Проте екзосоми, одержані з лімфоцитів, не є єдиним імунним модулятором в пухлинному мікрооточенні, оскільки екзосоми з самих пухлинних клітин можуть бути зручним джерелом аутотипових або алотипових вакцин для онкологічної імунотерапії. Окремі типи пухлинних екзосом можуть сприяти імунній функції та інгібувати ріст пухлини (Huang, 2017).

Зокрема, екзосоми з клітин лімфоцитарної лейкемії суттєво знижують експресію TGF- β 1 у дендритних клітинах. Крім того, дендритні клітини, стимульовані пухлинними екзосомами, можуть більш ефективно активувати проліферацію CD4-позитивних клітин, секрецію Th1 цитокіну та індукувати відповідь специфічно спрямованих на пухлину цитотоксичних T-лімфоцитів. З іншого боку, пухлинні екзосоми можуть, також, відігравати певну роль у сприянні росту пухлин при імунодепресії. Наприклад, екзосоми, що генеруються клітинами раку підшлункової залози, індукують зниження експресії HLA-DR на CD14-позитивних моноцитах шляхом розвитку окисного стресу, і у такий спосіб, пригнічують функціональну активність цих антиген-презентуючих клітин.

Недавні дослідження показали окремі шляхи міжклітинної сигналізації, в яких екзосоми є важливими посередниками зв'язків між пухлинними і стромальними клітинами для забезпечення проліферації, міграції та метастазів раку. Ракові клітини можуть утворювати екзосоми, які навантажені складним комплексом молекул сигналізації, що сприяють прогресу пухлиногенезу, зокрема, такі як Src тирозинкіназа, інсуліноподібний рецептор фактору росту 1 (IGF-IR) та кіназа фокальної адгезії (ФАК). Тирозинкіназа Src, яка сигналізує через ФАК, щільно асоційована з багатьма аспектами прогресування пухлини, в першу чергу, такими як проліферація клітин, метастазування та ангіогенез. Крім того, Src-тирозинкіназна сигналізація відома як критично важливе перехрестя регуляторних шляхів пов'язаних з ефектами ростових факторів і регуляції ангіогенезу. На додаток, пухлинні екзосоми сприяють ангіогенезу шляхом перенесення довгих міжгенних некодуючих РНК від клітин гліоми до ендотеліальних клітин (Lang, 2017).

Молекули практично усіх типів РНК представлені у екзосомах як загальний вантаж. Екзосомна мікроРНК-126а посилює експресію запального цитокіну IL-13, що призводить до активації утворення кровоносних судин і сприяє метастазуванню в легенях за раку молочної залози. Показаний значний потенціал як терапевтичних агентів екзосом завантажених невеликими інтерференційними РНК, однак специфічна для певного типу клітин спрямованість має бути вирішена у наступних дослідженнях (Yang, 2017).

Оскільки екзосомальний вантаж пухлин включає в себе численні макромолекули, які характерні саме для даного типу пухлин, цінні відомості про походження та стан пухлини можуть бути отримані з аналізу вмісту вантажу цих везикул. Окремими групами дослідників були зроблені зусилля, спрямовані на інтегральну характеристику вантажу пухлинних

екзосом для використання як біомаркерів у діагностиці та терапії пухлин (Lee, 2009; Bavisotto, 2017; Panagiotara, 2017). Біомаркери можуть бути ідентифіковані за допомогою вестерн блот аналізу для протеїнів або RT-qPCR для нуклеїнових кислот (Street, 2017). Найбільш перспективними біомаркерами пухлинних екзосом вважаються молекули мікроРНК, які виявилися корисними як різноманітне і широко представлене джерело біомаркерів. В якості біомаркерів, молекули мікроРНК мають, також, додаткові переваги через їх стабільність, високу специфічність та відносно прості методи збору.

Результати порівняння вмісту і складу мікроРНК між тканинами пухлин та пухлинними екзосомами показали високу гомологічність і дозволяють використання їх диференціювання доброякісних пухлини підшлункової залози та агресивної форми карциноми підшлункової залози.

Окремі результати клінічних випробувань екзосомальних терапевтичних препаратів вже показали корисний ефект для виявлення пухлин центральної нервової системи, при патології нирок, а також, при виявленні прееклампсії шляхом детекції плацентарних екзосом. Однак, дослідження вантажу та функцій пухлинних екзосом знаходяться лише на початковому етапі та потребують подальших досліджень, які зможуть надати більш повне розуміння біогенезу та ролі таких пухлинних везикул у малігнізації та стратегії використання протипухлинних засобів. Прогнозується, що екзосоми можуть бути корисними не тільки як біомаркери, але й потужним інструментом для виявлення ранніх стадій захворювань, так само, як і ефективним протипухлинним агентом (He, 2018).

Перспективи використання екзосом в імунотерапії пухлин

Екзосоми – дрібні мембранні везикули, які утворюються з внутрішніх мультивезикулярних ендосом, а потім зливаються з плазматичною мембраною, що приводить до вивантаження екзосом у позаклітинне середовище. Незважаючи на те, що імунотерапія слугує для пригнічення генерації пухлинних екзосом, інші способи лікування спрямовані на використання таких екзосом завдяки їх вигідним властивостям, такими як їх розмір, склад та спрямованість на пухлинні клітини (Bastos, 2018). Кілька сучасних стратегій терапії, що використовують екзосоми, включають протипухлинні вакцини, лікарські засоби для доставки ліків та генну терапію. Пухлинні екзосоми розкривають можливості унікального шляху для розробки протипухлинних вакцин завдяки їх інтегрованій функції у

взаємодії між пухлинними клітинами. Показано, що пухлинні екзосоми, одержані від клітинних ліній раку підшлункової залози, мають здатність ефективно знижувати проліферацію пухлинних клітин, хоча їх супресивний ефект опосередкований Notch-1-залежною сигналізацією та активацією мітохондрій-залежного апоптозного механізму. Показано, також, що пухлинні екзосоми можуть слугували сигналами для зменшення експресії внутрішньоклітинних мішеней Notch-1, і як наслідок, індукувати блокування клітинного циклу в фазі G_0-G_1 та апоптозну загибель пухлинних клітин). Окрім екзосом з пухлинних клітин, інші типи, такі як екзосоми, отримані з дендритних клітин, можуть бути використані для націлювання на пухлини, оскільки несуть вантаж з ознаками передметастазної ніші, і таким чином, спроможні викликати відповідь клітин НК (Tan, 2010). Невеликі розміри та структурний склад екзосом, також, роблять їх корисними для використання в якості потенційних наноносійів для доставки ліків. Вони можуть бути навантажені невеликими молекулами, протеїнами або нуклеїновими кислотами, які призначаються для певних типів клітин, уникаючи першого обміну у печінці та абсорбції в кишечнику, з можливістю перетину біологічних бар'єрів, таких як гематоенцефалічний бар'єр. Цитотоксичні лікарські засоби також можуть бути ефективно доставлені до клітин-мішеней, не змінюючи їх механізм дії, як це показано в доставці акридинового помаранчевого до клітин меланоми (Iessi, 2017). Проте, залишається багато невирішених питань вірного і спрямованого проектування екзосом для доставки ліків та уникнення небажаної імунної реакції. Доставка мікроРНК через екзосоми дозволяє швидко корегувати експресію генів у клітинах-мішенях через безпосередній цитозольний транспорт, уникаючи при цьому лізосомний шлях (György, 2017). Нажаль, бракує достатньої кількості даних про транспортування та екскрецію протеїнів та ліпідів екзосом. Найбільш перспективними регуляторами клітин-мішеней розглядаються ліпіди, такі як, сфінголіпіди, холестерин і церамід. Протеїновий вантаж екзосом, також, може виявляти регуляторні ефекти як в нормальних, так і трансформованих клітинах, але, велика чисельність різноманітних протеїнових компонентів ускладнює ідентифікацію ключових регуляторів (He, 2018).

Через складність і значне варіювання вантажу екзосом виникає невизначеність ролі та біологічних функцій окремих компонентів у розвитку пухлинного патогенезу, так само, як і можливостей використання екзосом для пригнічення пухлин. В будь якому разі, необхідні інтегративні дослідження вмісту та функцій екзосом для більш глибокого розуміння

екзосом і розробки стратегії їх використання у екзосомної тераностиці як у діагностичних, так і в терапевтичних цілях.

5.4. Екзосоми – новий спосіб комунікації клітин у нервовій системі

Забезпечення унікальних функцій нервової системи критично залежить від комплексу систем міжнейронального спілкування. Трансдукція сигналів, що опосередкована нейротрансмітерами, є класичною формою мереж нейронів у мозку. Останнім часом отримані докази того, що екзосоми та інші типи позаклітинних везикул можуть розглядатися як нова форма обміну інформацією між клітинами (Janas, 2016; Korkut, 2013). У нервовій системі однією з найбільш основних фізіологічних функцій є передача інформації в межах окремих нейронів шляхом генерації потенціалів дії. Передача інформації між сусідніми клітинами, як правило, опосередкована хімічними месенджерами, які вивільняються з попередньо «інформованих» клітин, розповсюджуються до ділянок специфічного розпізнавання, і в такий спосіб генерують відповідну клітинну реакцію в ході спілкування. Треба відмітити, безпосередня передача електричних сигналів між клітинами також має місце, але відсоток таких контактів в мозку надзвичайно малий. Безліч сигналів, якими обмінюються клітини, формують динамічну функціональну мережу нейронів, що забезпечує суттєву підтримку та модуляцію розвитку мозку, гомеостазу та пластичності в плинних зовнішніх умовах.

Зв'язок між клітинами центральної нервової системи (ЦНС) складається з двох принципово різних типів, а саме, міжклітинної взаємодії безпосередньо контактуючих та позаклітинної взаємодії віддалених у просторі клітин. Безпосередня міжклітинна взаємодія забезпечується унікальними за структурою формуваннями – синапсами, функціонування яких виконується через загальний для таких контактів механізм. Позаклітинні взаємодії мають відмінний механізм і складаються з вивільнення сигнальних молекул або структур, транспорт до клітин-мішеней та поверхневого розпізнавання або поглинання сигналів. Як правило, транспорт таких сигналів забезпечується позаклітинним рідиною, такими як кров, лімфа та спинномозкова рідина. До такого типу відносять гормональну регуляцію та, відносно новий спосіб, екзосому, або везикулярну міжклітинну комунікацію.

Вперше екзосоми були визнані як позаклітинні везикули, які викидають небажані матеріали з клітин у позаклітинний простір. Джонстон

та колеги показали, що вивільнення трансферинових рецепторів у позаклітинний простір під час дозрівання ретикулоцитів вівці супроводжується формуванням невеликих пухирців. На сьогоднішній день позаклітинні везикули класифікують за розміром та особливостями біогенезу як мікровезикули, апоптичні тіла та екзосоми. Мікровезикули (200-1000 нм) секретуються шляхом прямого мембранного розмноження. Апоптотичні тіла (0,5-3 мкм) є результатом випадкового утворення пухирців плазматичної мембрани під час апоптозу клітин (Valusu, 2016). Екзосоми (40-100 нм) є двошаровими ліпідними мембранними везикулами, які можуть бути секретовані багатьма типами клітин мозку, включаючи мікроглію, олігодендроцити, астроцити та нейрони. Екзосоми містять протеїни, ліпіди та різні види РНК, вміст яких варіює в залежності від походження клітин та фізіологічних або патологічних умов (Abels, 2016).

Локалізоване позаклітинне спілкування передбачає безпосередню взаємодію між клітинами і забезпечується специфічними системами, такі як щільні контакти, молекули адгезії та синаптична передача. Альтернативним способом віддаленої комунікації останнім часом розглядається сигналізація за допомогою різних типів позаклітинних везикул, які можуть модулювати поведінку та долю клітин-мішеней в широкому спектрі за допомогою різних типів вантажів (Kanninen, 2016). Екзосоми є найменшим за розмірами типом позаклітинних везикул, і саме тому, спроможні відносно вільно потрапляти у будь який орган чи тканину. Після того, як екзосоми виділяються в позаклітинну рідину, вони можуть взаємодіяти з клітинами-мішенями і виступати як місцеві паракринні посланці або комунікатори (Batiz, 2016).

Такий спосіб сигналізації абсолютно необхідний для розвитку клітин та підтримання гомеостазу в багатоклітинних організмах. В нервовій тканині екзосоми та їх метаболізм принципово відрізняються від синаптичних везикул, в першу чергу, за вмістом і біогенезом, так само, як і за функціями.

Формування екзосом у нервовій тканині

Формування екзосом у нервовій тканині принципово не відрізняється від біогенезу у інших типах клітин і зазвичай має три різні стадії: по-перше, утворення ендоцитарних пухирців з плазматичної мембрани; по-друге, внутрішнє брунькування мембрани ендосомального везикула, в результаті чого утворюються мультивезикулярні тіла (МВТ), які складаються з внутрішньопорожнинних везикул; по-третє, злиття цих МВТ з плазматичною мембраною та вивільнення вмісту позаклітинних везикул,

відомих як екзосоми. На першому етапі з плазматичної мембрани утворюються ендоцитозні везикули, створюючи ранні ендосоми, які потім дозрівають до пізніх ендосом.

Ці пізні ендосоми проходять внутрішнє брунькування, утворюючи везикули всередині просвіту. Показано, що комплекс сіндекан-сінтенін безпосередньо взаємодіє з протеїном ALIX за допомогою Leu-Tyr-Pro-X (n)-Leu ділянки для підтримки внутрішньоклітинного брунькування ендосомальних мембран. Крім того, існує два відомі шляхи формування MBT: один з ендосомальних сортувальних комплексів - необхідний для транспорту ESCRT-залежний, а інший незалежний від ESCRT. Ці MBT можуть або з'єднуватись з лізосомами для деградації або злиття з клітинною плазматичною мембраною для вивільнення екзосом (Urbanelli, 2013).

Механізми вивільнення екзосом клітинами нервової системи

Екзосоми вивільняються з клітин нервової тканини так само, як і з інших клітин шляхом екзоцитозу. Процес злиття екзосом з плазматичною мембраною регулюється деполяризацією, АТФ-азами як джерелом енергії та різними ферментами як регуляторами. Наприклад, PARK9, член надсімейства Р-типу АТФ-аз, регулює вивільнення екзосом у дофамінергічних нейронах, що важливо для запобігання клітинного накопиченню α -синуклеїна. У мікрогліальних клітинах сфингомелін-синтаза 2 модулює секрецію екзосом. У кортикальних нейронах виділення екзосом контролюється глутаматергічною синаптичною активністю та деполяризацією, що генерується активацією надходження кальцію через NMDA рецептори (Chivet, 2014). Екзосомне вивільнення з олігодендроцитів регулюється глутаматом. Вивільнення екзосом з клітин мікроглії індукується зв'язуванням серотоніну з його рецепторами та підвищенням рівня кальцію.

Звільнення екзосом з клітин Шванна модулюється надходженням кальцію шляхом активації рецепторів P2 та/або AMPA. Островський та його колеги відзначають, що Rab27a і Rab27b також до контролю секреції екзосом. Нокаут Rab27 або їх ефекторів, зокрема, SYTL4 та EXPH5, пригнічує вивільнення екзосом з клітин HeLa. Крім того, Юу та співавтори, показали, що онкорепресорний протеїн p53, так само, як і його ефектор TSAP6 можуть посилювати екзосомну продукцію.

Розпізнання екзосом та їх рециклінг

Циркулюючі екзосоми, як правило, завантажені протеїнами, ліпідами та РНК, які притаманні генеруючим їх клітинам. Специфічний вантаж екзосом обумовлює їх цілеспрямованість та ефекти модуляції фізіологічного стану клітин-мішеней. Націлювання екзосом на клітини-реципієнти передбачає різні механізми, які загалом, згуртовані в три типи взаємодії між екзосомами та їх клітинами-мішенями.

Перший тип – трансмембранні протеїни екзосом безпосередньо взаємодіють з рецепторами клітин-мішеней подібно до об'єднання протеїнів у щільних контактах.

Другий – екзосоми зливаються з плазматичною мембраною клітин-мішеней і доставляють власний вантаж до цитозолу клітин-мішеней.

Третій – екзосоми інтерналізуються в клітини-мішені і зливаються в ендосоми з подальшою альтернативною деградації клітинними ферментами або залучення до трансцитозу, який опосередковує перенос екзосом через клітину-мішень до сусідніх клітин, що нагадує паракринну секрецію (Tian, 2013).

Механізм поглинання екзосом розрізняється в окремих типах клітин нервової тканини. Показано, що поглинання екзосом нейронами здійснюється через клатрин і динамін-залежний ендоцитоз. В той же час, поглинання олігодендроцитарних екзосом клітинами мікроглії відбувається шляхом мікропіноцитозу.

Нещодавно показаний новий механізм опосередкований коннексином-43, який опосередковує інформаційне спілкування між екзосомами і клітинами-мішенями (Soares, 2015). Ці результати дозволяють припустити, що механізми екзосомального поглинання в значній мірі варіюють в залежності від типів клітин. Крім того, процес поглинання екзосом є виключно вибірконим процесом. Екзосоми значно навантажені тетраспанінами, суперродиною протеїнів з чотирма трансмембранними доменами, які утворюють динамічну просторову тетраспанінову мережу, завдяки взаємодії між собою та іншими трансмембранними протеїнами, наприклад, інтегринами в площині фосфоліпідного шару та цитозольними протеїнами всередині везикули. До того ж, екзосоми, що завантажені надлишком інтегрин- $\alpha 4$ переважно поглинаються клітинами ендотелію та підшлункової залози, що вказує на те, яким чином тетраспанін-інтегринова мережа бере участь у селективному захопленні екзосом.

Особливості екзосом з клітин нервової системи

Секреція екзосом з нейронів та астроцитів була вперше продемонстрована в культивованих ембріональних кортикальних нейронах. Вивільнення екзосом клітинами нервової тканини, як гліальними клітинами, так і нейронами регулюється глутаматом.

У нейронах мікровезикулярні тільця MBT виявляються в основному в сомато-дендритних компартментах.

Екзосоми, які генеруються нейронами, в 50 разів більше в сомах і дендритах, ніж в аксонах, що характерно як для периферійної, так і центральної нервової системи. В культурі культивованих зрілих кортикальних нейронів виявлено, що екзосоми переважно вивільняються з сомато-дендритних відділів. Екзосоми можуть вивільнятися пресинаптично у нервово-м'язовому з'єднанні. Постсинаптичне вивільнення в кортикальних нейронах стимулюється активацією синаптичних NMDA-рецепторів. Більш за те, постсинаптично генеровані екзосоми можуть потім зв'язуватися з пресинаптичною мембраною гіпокампних нейронів.

Порівняння синаптичних пухирців з екзосомами у пресинаптичному терміналі

В пресинаптичних кінцівках нейронів виявлені два типи надмалих мембранних везикул з діаметром від 35 до 55 нм та екзосом діаметром від 50 до 100 нм (Takamori, 2006; Cooney, 2002). Обидва типи везикул містять аналогічну кількість холестерину, але різняться за складом ліпідів та протеїнів. Екзосоми мають двошарову ліпідну мембрану, що містить різні типи ліпідів. На відміну від екзосом, синаптичні везикули мають одношарову ліпідну мембрану.

У синаптичних везикулах найбільш характерні протеїни в основному асоціюються з модуляцією рециклінгу SV та виведенням нейромедіаторів. Серед регуляторів рециклінгу екзосом, найбільш критичними є синаптофізини, які модулюють, також ендоцитоз синаптичних везикул за допомогою динаміна, Rab ГТФази, які забезпечують внутрішньоклітинний оборот синаптичних везикул, протеїни SNARE, які опосередковують стикування синаптичних везикул до пресинаптичної мембрани, синапсини та синаптотагміни, що регулюють виділення нейротрансмітерів шляхом екзоцитозу.

В той же час, екзосоми, на додаток до загального комплексу протеїнів даного клітинного типу, містять функціонально-специфічні протеїни, такі

як протеїни теплового шоку (Hsp 70 і Hsp 90), анексіни та протеїни сімейства Rab, що беруть участь у внутрішньоклітинних процесах зборки та спрямованого транспорту. ГТФ-ази, анексіни та флотилін модулюють мембранний транспорт та злиття. Тетраспаніни (CD9, CD63 та CD81) опосередковують мембранне злиття, міграцію клітин, міжклітинну адгезію та клітинну сигналізацію (Ha, 2016; Rana, 2012).

Екзосоми, також, мають значний вміст молекул адгезії інтегринового сімейства, які в нормі опосередковують зв'язування клітин із позаклітинною матрицею (Ha, 2016). Більше за те, екзосоми містять молекули РНК, які відсутні в синаптичних везикулах. Серед усіх РНК мікроРНК привертають велику увагу через їх вагомий внесок у регуляцію експресії генів у клітинах-мішенях як у фізіологічних, так і патологічних станах. Окремо треба відмітити, що співвідношення мікроРНК до загальної РНК в екзосомах вище, ніж у їхніх батьківських клітинах, що свідчить про їхню важливу роль у модуляції біологічних процесів клітин-мішеней.

Роль екзосом у нервовій системі

Згідно з попередніми дослідженнями, як гліальні клітини, так і нейрони, секретують екзосоми, які мають різнобічний функційний вплив в ЦНС, діючи як локальні або віддалені посланці та комунікатори (Agnati, 2014; Chivet, 2012).

По перше, опосередкована екзосомами комунікація між пре- та постсинаптичними клітинами, бере участь у підтримці нейронального гомеостазу та модуляції синаптичної пластичності. Транссинаптична передача екзосом забезпечує доставку протеїнів, РНК та ліпідів від материнських клітин до клітин-мішеней. Вантаж екзосом може модулювати синаптичну трансдукцію та модифікувати склад і функціональні властивості поверхні клітин клітини-мішені, як у фізіологічних, так і патологічних умовах.

По-друге, регульована секреція екзосом може бути альтернативним способом локальної елімінації нейронів через активацію опосередкованого мікрогліальними клітинами та/або астроцитами фагоцитозу. На додаток, секреція екзосом може діяти як важлива складова тотального захисного механізму для нейронів шляхом усунення застарілих протеїнів, РНК, токсичних речовин та небажаних клітинних відходів. Отримані різними групами дослідників дані свідчать про те, що екзосоми містять “токсичні” (патогенні) протеїни, включаючи антитіла, пріони, α -синуклеїн, протеїн-попередник амілоїду, і фосфорильований тау-протеїн. Враховуючи той

факт, що широке коло нейродегенеративних захворювань мають загальний молекулярний і клітинний механізм, який включає в себе неправильне згортання та агрегацію протеїнів, завантаження таких протеїнів у екзосомі і вивільнення з клітин може бути, також, сигналом для захисних механізмів та знищення клітин, що несуть ознаки патогенезу.

По-третє, екзосомна сигналізація відіграє важливу роль у активації регенеративних механізмів та нейрозахисту як в ЦНС, так і в ПНС. Наприклад, екзосомі шваннівських клітин, що містять мієліновий протеїн p75NTR, селективно інтерналізуються нейронами, в яких збільшують розростання нейритів та сприяють реконструкції аксонів як *in vitro*, так і *in vivo*.

На додаток до міжнейронального спілкування, екзосомі опосередковують передачу сигналів між нейронами та гліальними клітинами. Наприклад, екзосомі кортикальних нейронів транспортують мікроРНК-124а до астроцитів та індуюють в них збільшення експресії глутаматного транспортера-1 (GLT1). В той же час, такий екзосомний сигнал регулював рівень позаклітинного глутамата і модулював синаптичну активацію. З іншого боку, екзосомі, які генеруються клітинами гліальних пухлин прискорюють інтенсивність руйнування нейронів. Інші результати досліджень пухлинних екзосом показали, що їх вантаж може відігравати нейропротекторну роль при окисному стресі та в умовах нестачі енергетичних субстратів.

Клінічне застосування екзосом у терапії порушень нервової системи

Головними критеріями того, щоб біологічний маркер був адекватним і придатним для клінічного застосування, є присутність маркеру у біологічних рідинах, наявність нескладних методів виявлення, характерні показники маркеру повинні бути особливо специфічними для певних патологічних станів. Екзосомі відносно легко перетинають ГЕБ від крові до мозку і навпаки шляхом трансцитозу (Kalani, 2014). Вантаж екзосом (протеїни, ліпіди та РНК) змінюється в залежності від стану генеруючих екзосомі клітин, особливо під час глибоких патогенетичних змін, таких як нейродегенерація та канцерогенез (Properzi, 2015; Shi, 2014). Важливою особливістю екзосом є те, що їх структура надзвичайно стійка у фізіологічних умовах, і таким чином, їх вміст захищений від деградації всередині мембранної оболонки. На теперішній час, вивчені окремі характеристики екзосом, за якими можна відстежити їх трафік та

походження. Наприклад, екзосоми, що генеруються і вивільняються нейронами несуть GPI-закріплені пріони, молекули адгезії клітин L1 та субодиниці рецепторів глутамата, що загалом, дозволяє визначити нейрональне походження такого вантажу.

Екзосоми, які вивільняють астроцити, містять функціональні глутаматні транспортери і мт-ДНК. Екзосоми, що генеруються мікрогліальними клітинами, несуть специфічний вантаж, який обов'язково містить CD13 та монокарбоксилатний транспортер 1. Характерною рисою олігодендроцитарних екзосом є присутність специфічних для мієліну ліпідів.

Більше того, екзосоми можуть бути виявлені майже в усіх біологічних рідинах, включаючи кров, сечу, слину, грудне молоко, сперму та цереброваскулярну рідину (Properzi, 2015). Нейродегенеративні розлади характеризуються неправильним фолдингом протеїнів, який можна виявляти в екзосомах. Таким чином, за вмістом невірно згорнутих протеїнів можуть бути виявлені нейродегенеративні патології на ранніх стадіях їх розвитку, коли функціональні порушення не визначаються і відсутні характерні клінічні ознаки. Наприклад, у пацієнтів із хворобою Паркінсона (ХП) визначено підвищений рівень α -синуклеїнових протеїнів у екзосомах з плазми крові у порівнянні із здоровими контрольними зразками. Показано, що у пацієнтів групи ризику, рівень P-S396-tau, P-T181-tau та Ab1-42 в екзосомах нейронального походження вилучених з крові. Автори цього дослідження пропонують виявлення крові пацієнтів екзосом з нервової системи, які можуть бути використані для прогнозування розвитку хвороби Альцгеймера (ХА) у віддалений, як це очікують, до 10 років до початку клінічного нападу період (Fiandaca, 2015).

Результати іншого дослідження показали, що підвищений рівень лізосомних протеїнів у циркулюючих екзосомах відрізняє пацієнтів групи ризику розвитку ХА від контрольної групи за декілька років до клінічного нападу ХА. Останнім часом, розкриття біологічної активності та регуляторних механізмів мікроРНК привертає особливу увагу в дослідженні ефектів екзосомного спілкування між клітинами. Окремі мікроРНК, визначені як вантаж циркулюючих в крові екзосом, були запропоновані як біомаркери для діагностики раку. Інші мікроРНК і були ідентифіковані як пов'язані з специфічними порушеннями ЦНС, такими як ХА, ХП та травми мозку (Van, 2016).

Всі ці характеристики вказують на те, що екзосоми можуть служити специфічними біомаркерами для діагностики широкого спектру розладів нервової системи. З іншого боку, дослідження біогенезу екзосом та їх

біологічної активності, у свою чергу, можуть пролити світло на молекулярні і клітинні механізми патогенетичних порушень в нервовій системі.

Враховуючи те, що екзосоми є ендогенними, нетоксичними та стійкими формуваннями, ці позаклітинні везикули за умов певних модифікацій, можуть служити в якості систем спрямованої доставки ліків або специфічних молекул у клінічній терапії. В даний час найбільш переважно запропонованими системами доставки ліків є ліпосоми та полімерні наночастинки. Обидва шляхи важко представити ідеальними системами доставки з точки зору їх стабільності та не токсичності. Проте, екзосоми можуть бути більш ефективною і бажаною системою доставки через їх безсумнівні переваги. Першою перевагою екзосом є тривалий період напівжиття циркуляції в крові та стабільність. Екзосоми можуть потенційно уникати ендосомального шляху та деструкції в лізосомах, а їх вантаж захищений від РНКаз і протеаз. Екзосоми можуть бути безпосередньо доставлені в цитоплазму клітини-мішені без небажаного накопичення в печінці, таким чином уникаючи метаболічного ефекту першого проходу до досягнення цільових ділянок.

Важливою перевагою використання екзосом є практична відсутність імуногенності у цих позаклітинних везикулах внаслідок природи вмісту власного клітинного продукту. Таким чином, екзосоми не несуть сигналів чужорідності для лімфоцитів або фагоцитуючих клітин і не деградуються ними.

Екзосоми можуть бути зручним інструментом селективної доставки їх вантажу до клітин-мішеней через можливість додавання поверхневих протеїнів або антитіл для націлювання на конкретний клітинний тип. Більш за те, існує практична можливість завантаження певного молекулярного вантажу з терапевтичним ефектом. Окремий практичний інтерес пов'язаний з тим, що екзосоми відносно вільно можуть перетинати ГЕБ і завдяки цій властивості можуть бути месенджерами сигналів між клітинами нервової тканини та іншими тканинами і системами (Argani, 2016; Zhuang, 2011). На додаток, екзосомні сигнали можуть діяти тривалий термін часу завдяки тому що, поглинені екзосоми за певних умов залучаються до рециклінгу і повторно використовуються в наступному кроці сигналізації клітинами-мішенями. Наявні дані свідчать про значний потенціал екзосом у лікуванні нейродегенеративних захворювань. Наприклад, екзосоми, що додатково завантажені каталазою, ефективно накопичуються в нейронах і мікрогліальних клітинах мозку, в яких активують механізми антиоксидантного захисту і забезпечують нейропротективний ефект при лікуванні хвороби Паркінсона.

Останнім часом представлені результати шляхів молекулярного конструювання екзосом одержаних із стовбурових клітин. Подібні спрямовано модифіковані екзосоми можуть бути новою терапевтичною стратегією для деяких порушень ЦНС завдяки специфічному націлюванню на причині об'єкти патогенетичних порушень у нервовій системі (Luarte, 2016). Окремі функціональні або структурні ознаки нейронів розглядаються як специфічна мішень для доставки функціональної si-РНК із використанням попередньо трансфікованих та модифікованих екзосом. Наприклад, системна доставка екзосом, що містять si-РНК проти α -сінуклеїна, зменшує рівень мРНК і протеїнів α -сінуклеїна в мозку. Важливим досягненням у практичному використанні екзосом є результати, в яких продемонстровано, що екзосоми, введені інтраназально, здатні доставляти куркумін до клітин мікроглії в мозковій паренхімі. Доставка таких навантажених куркуміном екзосом в тваринній моделі розсіяного склерозу була ефективним засобом для функціонального відновлення ушкоджених клітин. Отже, система опосередкованої екзосомами доставки специфічних молекулярних сигналів і нейропротекторних сполук може забезпечити ефективну терапевтичну стратегію для захворювань нервової системи.

Застосування сучасних методів виявлення, очищення та модифікації вантажу екзосом має великий потенціал для клінічного використання цих природних наноструктур у діагностиці порушеннях ЦНС так само, як і в якості ефективної нейропротекторної стратегії. Дієвість екзосом обумовлюється їх унікальними властивостями, а саме, тривалим часом напівжиття і високою стабільністю у фізіологічних умовах, низькою імуногенністю, проникністю через біологічні бар'єри та адаптованістю до селективної доставки молекулярних вантажів.

Проте, загалом, існують деякі проблеми, які залишаються невирішеними. Нажаль, не розроблена уніфікована ефективна технологія очищення і виділення екзосом високої чистоти. Крім того, цілком ймовірно, що як нативні екзосоми, так і екзосомні гібридні типи мають занадто складний вміст молекул материнських клітин. У свою чергу широка різноманітність екзосомних вантажів обумовлює велику кількість молекулярних механізмів специфічного спрямування екзосом на певні клітинні мішені. Один з таких механізмів міжклітинної сигналізації був змодельований за допомогою штучного мембранного синтезу і синтетичних ліпосом, які несли тетраспанін-інтегриновий вантаж на штучній екзосомній мембрані. В такий спосіб дослідники досягли високої специфічності у спрямуванні поглинання екзосом певним клітинним типом (Sato, 2016).

У поєднанні з лікувальними препаратами такі штучні екзогенні екзосоми можуть виявити небажані та побічні ефекти (На, 2016). Тим не менш, застосування екзосом може забезпечити перспективну і новітню терапевтичну стратегію високоселективної доставки різних синтетичних та біологічних молекул в клітини-мішені. Подальші дослідження і розуміння екзосомного біогенезу, секреції та опосередкованої екзосомами міжклітинної комунікації в нервовій тканині може допомогти розробити нові діагностичні та терапевтичні стратегії для захворювань нервової системи.

У нейронах МВТ присутні в основному в сомато-дендритних компартментах і містять внутрішньопрозорі везикули, які утворюються внаслідок внутрішнього зародження з ранньої двошарової ліпідної ендосомальної мембрани. Внутрішньопрозорі пухирці відокремлюються як екзосоми після того, як МВТ зливаються з плазматичною мембраною клітин. На відміну від цього, синаптичні везикули з одношаровою ліпідною мембраною переважно знаходяться у пресинаптичній ділянці нервових кінцівок. Синаптичні везикули містять, переважно, нейромедіатори, тоді як екзосоми містять протеїни, ліпіди та РНК, які відсутні в синаптично-везикулярному пулі. Нейромедіатори виділяються в синаптичну щілину, де вони зв'язуються з рецепторами в постсинаптичній мембрані для передачі сигналу. Окрім вивільнення нейронами, екзосоми можуть також виділятися мікрогліальними клітинами та астроцитами в ЦНС, поглинатись локально або перетинати ГЕБ та цереброспінальний бар'єр (ЦСБ) і циркулювати в потоці крові, так само, як і у цереброспінальній рідині. Навпаки, екзосоми, отримані з крові та цереброспінальної рідини, також можуть потрапляти через ГЕБ та ЦСБ у паренхіму мозку. Таким чином, вантаж екзосом з крові та цереброспінальної рідини може бути валідним показником для діагностики та лікування захворювань нервової системи, включаючи нейродегенеративні розлади.

Міжклітинна сигналізація забезпечує фагоцитарну регуляцію гомеостазу мозка

Тривалий час вважалося, що нейрони можуть бути фагоцитовані лише тоді, коли вони мертві або вмирають через критичні пошкодження. Однак, недавно отримані експериментальні докази того, що життєздатні синапси, дендрити, аксони та цілі нейрони можуть бути фагоцитовані живими. Таке явище отримало назву нейрофагія, і є важливою складовою широкого спектру подій в ході розвитку, фізіологічних та патологічних процесів.

Фагоцитоз живих синапсів, дендритів та аксонів глією сприяє формуванню унікальних нейронних мереж під час розвитку. З іншого боку, надмірний фагоцитоз синапсів може сприяти патогенетичним порушенням, таким як, хвороба Альцгеймера, шизофренія та віковий спад функційних спроможностей.

Молекулярний ансамбль поверхні нейронів обумовлюється великим числом метаболічних процесів і надзвичайно складною взаємодією між усіма механізмами, які забезпечують підтримку гомеостазу у нервовій тканині. Окремі компоненти плазматичної мембрани, зокрема фосфатидилсерин та калретікулін, слугують сигналами “з’їжте мене” і, таким чином, провокують фагоцитоз через мікрогліальні рецептори. Інший тип сигналів виявлений як ступінь сіалізування нервових поверхонь. Достатня щільність залишків сіалової кислоти діє як сигнал “не їжте мене”, пригнічує фагоцитоз, а десіалітація, навпаки, може спровокувати фагоцитоз. Опсоніни, такі як компоненти комплементу та аполіпропротеїни, виділяються під час запалення і здатні покращити поглинання нейронів. Фагоцитоз нейронів спостерігається при багатьох захворюваннях людини, але залишається незрозумілі, чи гальмування фагоцитозу буде сприятливим при лікуванні неврологічних захворювань.

Механізми стимуляції і гальмування нейрофагії активно досліджуються лише відносно короткий час. Незважаючи на це, окремі результати показали критичну роль гліальних клітин в регуляції фагоцитозу живих нейронів та синапсів, а також, залучення цього фагоцитозу до процесів розвитку нервової системи та патогенезу.

Фагоцитоз – це клітинний процес поглинання та травлення великих (> 0,5 нм), позаклітинних частинок, включаючи інші клітини або частини клітин. Вираз “фагоцитоз нейронів” відображає такі події, коли нейрони з’їдаються чимось іншим. В той же час, “нейрональний фагоцитоз” означає нейрони, що їдять щось інше. Отже, “мікрогліальний фагоцитоз синапсів” означає такі події, коли мікроглія поглинає і перетравлює синапси, а не навпаки.

Типи клітин, що спеціалізуються на фагоцитозі, відомі як фагоцити, а основними, професійними фагоцитами в мозку є мікрогліальні клітини (Wolf, 2017). Мікроглія захищає мозок шляхом фагоцитозу патогенів, мертвих клітин, критично ушкоджених клітин, сміття та протеїнових агрегатів. Більш за те, клітини мікроглії залучаються до процесів розвитку ЦНС шляхом фагоцитозу надлишку синапсів, дендритів, аксонів, так само, як і нейронів або нейрональних попередників. Однак, надмірний мікрогліальний фагоцитоз синапсів і нейронів може сприяти патології.

Астроцити є найбільш поширеною у ЦНС субпопуляцією гліальних клітин, яка забезпечує гомеостаз і захист нейронів. Так само, як і мікроглія, астроцити спроможні к фагоцитозу синапсів, і їх активність збільшується аполіпропротеїном Е, ішемією мозку та функційними розладами, зокрема, втратою сну (Chung, 2016; Bellesi, 2017). Більш за те, астроцити також можуть сприяти фагоцитозу мієлінового сміття. Показано, що в мозку *Drosophila*, астроцити можуть поглинати життєздатні аксони, дендрити, та навіть, цілі нейрони під час розвитку (Tasdemir-Yilmaz, 2014). Запальний процес в нервовій тканині активує інфільтрацію з крові моноцитів і нейтрофілів, які безпосередньо залучаються до нейрофагії (Prinz, 2017).

Фагоцитоз має три основні етапи: розпізнавання, поглинання та травлення. Розпізнавання опосередковується фагоцитарними рецепторами, такими як рецептор вітронектина (VNR), тирозинкіназний рецептор MER (MerTK) або рецептор С3 комплементу (CR3) на фагоцитах. Усі ці рецептори розпізнають сигнали типу “з’їж мене”, а саме, такі як фосфатидилсерин, калретікулін, опсоніни. Опсоніни – це розчинні протеїни, які при зв’язуванні з поверхнею клітини стимулюють фагоцити до фагоцитозу саме цієї клітини. Класичні опсоніни включають антитіла та компоненти системи комплементу C1q та C3b. На додаток, окремі сигнальні фактори зв’язують як експонований фосфатидилсерин, так і фагоцитарні рецептори, включаючи MFG-E8. Наприклад, аполіпропротеїн Е опсонізує зв’язування як відкритого фосфатидилсерину з фагоцитарним рецептором, так і з рецептором ліпопротеїна низької щільності (LDP) або рецептором, що обумовлює презентацію мієлоїдних клітин 2 (TREM2) (Atagi, 2015). Фаза цукрового фагоцитозу супроводжується активацією рецептора P2Y6 на фагоцитах його лігандом, УДФ, що притаманний поверхні нейронів (Brown, 2014) (рис. 37).

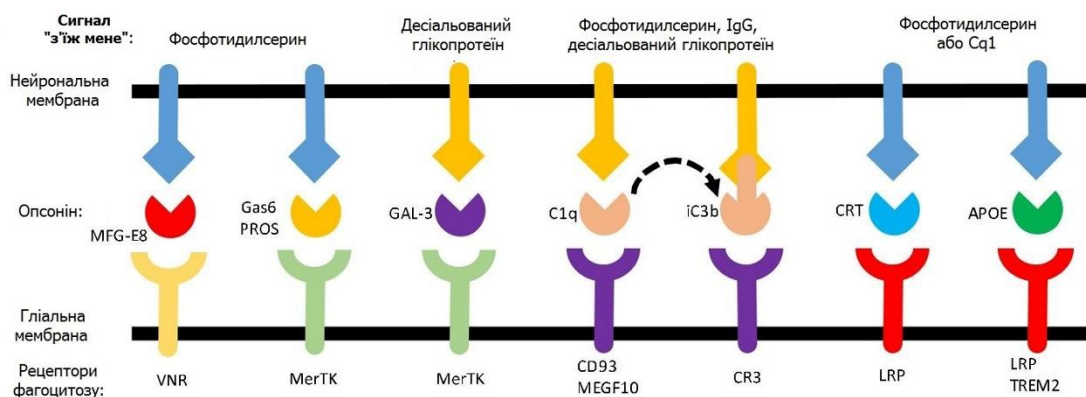


Рис. 37 Міжклітинна сигналізація фагоцитозу

Існують дані про залучення інших різноманітних рецепторів до опосередкування фагоцитозу, але немає чітких доказів участі Fc рецепторів, рецепторів поглиначів та лектинових рецепторів C-типу у нейрофагії.

Сигнал “з’їж мене” за участю фосфатидилсерину, може мати незворотний вплив на апоптотичні клітини за рахунок активації фосфатидилсерин скремблази, Xk-родина протеїна 8 (Xkr8) та інгібування фосфатидилсеринових транслоказ АТР11А і АТР11С (Segawa, 2014; Suzuki, 2016).

Проте, в життєздатних нейронах фосфатидилсериновий сигнал може бути вимкнений в результаті активації локальної циркуляції кальцію, сімейства фосфатидилсерину СММЕМ16 та/або інгібування кальцієм транслокаторів АТР11А або АТР11С. Поширений в нервовій системі метаболіт, глутамат, може викликати швидкий і зворотний вплив фосфатидилсерину на нейрони, провокуючи мікрогліальний фагоцитоз цих нейронів, у випадку, якщо мікрогліальні клітини присутні в ділянках експозиції фосфатидилсерина на поверхні нейронів. Однак, такі нейрони виживають у довгостроковій перспективі, якщо відсутня активована мікроглія. Фосфатидилсериноподібні нейрони звичайно розпізнаються або через рецептори опсоніну Gas6 і MerTK/Axl на мікроглії або опсонін MFG-E8 та VNR на мікроглії (Fricker, 2012; Neher, 2013). Калретікулін може діяти як альтернативний сигнал “з’їж мене” при експозиції на поверхні клітини. В такому випадку, нейрофагія може бути результатом стресу ендоплазматичного ретикулуму. Калретікулін індукує фагоцитоз через рецептори LRP на мікроглії. С1q може діяти як опсонін шляхом зв’язування на поверхні клітин з фосфатидилсерином, калретікуліном або з десіальованою поверхнею та індукувати фагоцитоз через генерацію опсоніна С3b або шляхом безпосереднього зв’язування з фагоцитарним рецептором CR3 на мікроглії (Linnartz, 2012) (рис. 38).

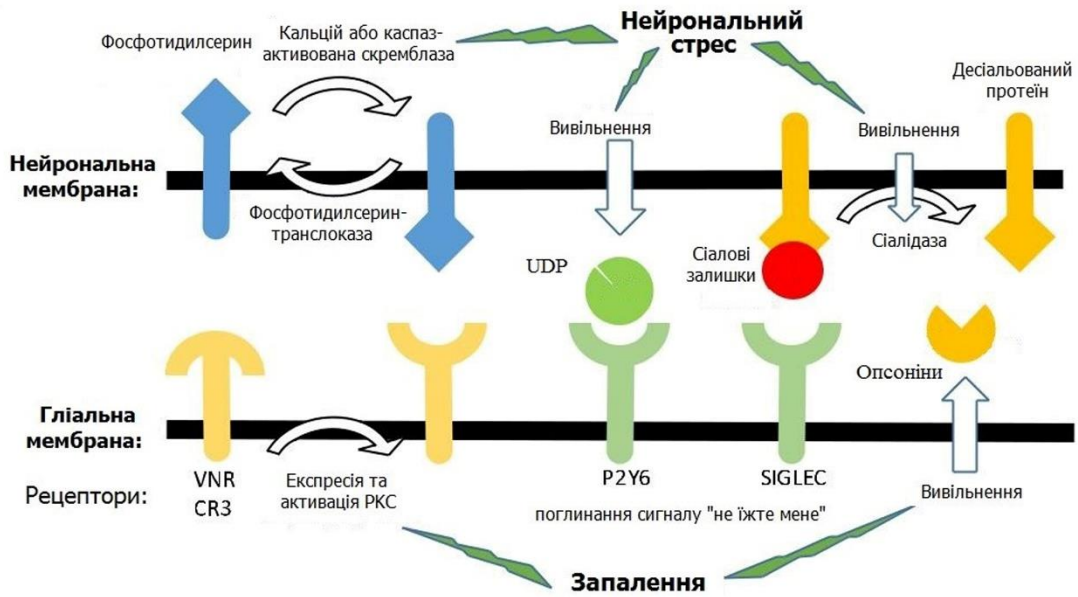


Рис. 38 Сигналізація й регуляція фагоцитозу

Активация нейрофагії, також, можлива через зв'язування з чисельними доменами епідермального фактору роста 10 (MEGF10) на астроцитах (Iram, 2016). Інший тип сигналів “не їсти” на поверхні нейронів, наприклад, CD47, який інгібує фагоцитоз клітини-мішені шляхом залучення інгібіторних рецепторів на сигнал-регулюючий протеїн (SIRP) на фагоцитуючих гліальних клітинах. Проте, інша ізоформа такого протеїна SIRP β може, навпаки, стимулювати мікрогліальний фагоцитоз. Сіалілування нервової поверхні діє як сигнал “не їжте мене”, блокуючи фагоцитоз шляхом залучення мікрогліальних рецепторів Siglec. Рецептори Siglec переважно інгібують фагоцитоз, але Siglec-H може активізувати, наприклад, через посередництво мікрогліального фагоцитозу живих клітин гліоми.

Десіалізація робить можливим фагоцитоз нейронів, через зв'язування з поверхнею клітини опсоніна C1q, який ініціює фагоцитоз за участі рецепторів CR3. Можлива, також, опсонізація галектин-3 шляхом активації рецепторів MerTK (Nomura, 2017). Надмірно стимульовані або пошкоджені нейрони вивільняють АТФ та фракталкіни, що слугують розчинним сигналом типу “знайди мене”. Ці фактори, притягують хемотаксисом мікрогліальні клітини до таких нейронів через мікрогліальні P2Y12 і фракталкінові рецептори відповідно (Wolf, 2017).

Викладене вище представляє молекулярні механізми міжклітинної сигналізації, що регулює фагоцитоз нейронів у ЦНС. Фагоцитарні рецептори, які розпізнають відповідні сигнали на поверхні нейронів-

мішеней, ініціюють ланцюг подій внутрішньоклітинної сигналізації для індукування фагоцитозу. Екстраклітинна взаємодія рецепторів CR3, VNR та TREM2 трансформує сигнал про зв'язування в клітинну відповідь, тобто, активацію фагоцитуючої активності. Внаслідок такої взаємодії активується сімейство Src-кіназ, які фосфорилують тандемні залишки тирозину на внутрішньоклітинних імунорецепторах тирозинової активації (ITAM) або інших рецепторів пов'язаних з трансмембранним адаптером ДНК-активації протеїна 12 (DAP12). Фосфорильований домен ITAM потім залучає і активує тирозинкіназу (Syk), яка фосфорилує Vav. Vav, у свою чергу, активує Rac1 або інші G-протеїни у форми з високою спорідненістю до ГТФ, що веде до інтенсивної модифікації і перерозподілу цитоскелетних структур. Перебудови цитоскелета є головним механізмом, що обумовлює локальні морфологічні зміни плазматичної мембрани і формування ділянок поглинання.

VNR також активує Rac1 за допомогою фокальної адгезивної кінази. MerTK і Axl є рецепторами тирозинкіназ, які можуть залучати Src для активації фагоцитозу через активацію фосфатидилінозитол 3-кінази та фосфоліпази C. Залучення LRP1 також активує Src і фокальну адгезію кіназу. SIRPa та інгібіторні рецептори Siglec мають внутрішньоклітинний імунорецептор тирозину спрямований на інгібування, таким чином, стимуляція таких рецепторів активує тирозинфосфатазу SHP-1, яка дефосфорилує тирозинові залишки. Активація тирозинфосфатази SHP-1 має протилежну спрямованість ефектам, які опосередковані Src та/або Syk, і тим самим, інгібує фагоцитоз.

Фагоцитоз життєздатних синапсів: синаптофагія

Синаптичне видалення, також відоме як синаптична елімінація, це процес ліквідації синапсу, що відбувається під час розвитку. Елімінація окремих функціонально не критичних синапсів сприяє удосконаленню мереж нейронів, активно-залежній модифікації синапсів і формуванню процесів навчання та пам'яті в період між народженням та пізнім підлітковим віком у людей (Neniskyte, 2017). Синаптична елімінація включає в себе втрату окремих аксонів і дендритів, але не впливає на виживання нейронів. Загалом, більшість моделей синаптичної обрізки пов'язані з втратою чи скороченням аксонів .

Запропоновано чотири головних механізми синаптичної обрізки: синаптично/аксональна дегенерація, синаптично/аксональна ретракція, синаптично/аксонний витік та синаптично/аксональне поглинання. Тільки

останній відповідає синаптофагії, тому терміни не можуть бути використані як синоніми, і, дійсно, прирівнювання синаптичного обрізання до синаптофагії призвело до деякої плутанини в минулому.

Докази того, що фагоцитоз сприяє синаптичній елімінації, включають результати досліджень які отримані *in vivo* та *in vitro*. Показано, що астроцити здатні до виконання тривалого фагоцитозу синапсів, як у період розвитку ЦНС, так і у дорослих мишей. В той же час, знищення фагоцитарних рецепторів MEGF10 та MerTK блокує синаптичну елімінацію. Таке блокування нейрофагії обумовлено тим, що MEGF10 зв'язує C1q, і тим самим забезпечує астроцитарний фагоцитоз опсонізованих клітин C1q (Iram, 2016). Шваннівські клітини виявлені в ділянках тривалого фагоцитозу синапсів в ході розвитку нервово-м'язових з'єднань.

Встановлено, що мікроглія охоплює синаптичні контакти під час елімінації, а безпосередньо поглинання залежить від нейрональної активності, залучення компоненту C3 до опсонізації та стимуляції рецептора комплементу CR3. Компонент системи комплементу C1q також є опсоніном і локалізується в синапсах. На додаток, нокаут компоненту C3 гальмує синаптичну елімінацію. На особливу увагу заслуговує той факт, що C1q-подібний протеїн 1 (C1ql3) регулює синаптичну щільність через рецептор інгібітору ангіогенезу мозку 3 (BAI3) (Kakegawa, 2015) незалежно від фагоцитозу. Це пояснюється тим, що компоненти C1q та C3 є консервативними багатофакторіальними протеїнами і беруть участь у широкому колі інших механізмів, крім фагоцитозу.

Інший механізм активації мікрогліальної нейрофагії реалізується за допомогою фракталінів. Нейрони експресують і вивільняють фракталін CX3CL1, який залучає мікроглію до нейрофагії за допомогою її рецептора CX3CR1. Так само, делеція і інгібування експресії цього рецептора запобігає синаптичній елімінації синапсів за участі мікрогліальних клітин в гіпокампі, що, у свою чергу, порушує функціональну здатність ЦНС і веде до дефіциту соціальної поведінки у мишей.

“Синаптична розчистка” спочатку означала втрату пресинаптичних терміналів на нейронах моторного мозку внаслідок пошкодження моторних нейронів, наприклад, після аксотомії. На теперішній час, це поняття використовується для позначення вторинної втрати синапсів на пошкоджених нейронах, або взагалі, відображає втрату функціонально важливих синапсів в патологічному контексті. Наприклад, ін'єкція мертвих бактерій в мозок викликає синаптичні втрати, які опосередковані активацією мікроглії. Синаптичні втрати, переважно, визначаються для

збуджувальних синапсів, але не інгібіторних. Таким чином, була запропонована важлива біологічна спрямованість нейрофагії як захисного механізму від ексайтотоксичності. Знову ж таки, тому що синаптичні втрати можуть виникнути за допомогою декількох механізмів, синаптичні втрати не є синонімом синаптофагії. Основним запропонованим механізмом синаптичного видалення є фізичне поглинання і травлення за участі мікроглії та/або астроцитів, котре попередньо активується в ділянках постсинаптичних елементів. Проте, є деякі обмежені докази, що підтверджують роль фагоцитозу в синаптичній елімінації, наприклад, у С3 нокаутних мишей були виявлені значно менші синаптичні втрати.

Надмірна активація гліального фагоцитозу у нервовій тканині сприяє синаптичним втратам при деяких патологіях. У мишачих амілоїдних моделях хвороби Альцгеймера показаний мікрогліальний фагоцитоз синапсів, а інгібування або нокаут з C1q, C3 або CR3 попереджало втрати синапсів (Shi, 2017). Аналогічні синаптичні втрати, викликані вірусом, супроводжувались локалізацією комплементу опсоніну C1q на синаптичних мембранах і активацією мікрогліального фагоцитозу синапсів, тоді як нокаут опсоніну комплементу C3 або інгібування метаболічної активності мікроглії зменшило синаптичні втрати.

ВІЛ-індуковані синаптичні втрати, так само, супроводжуються мікрогліальним фагоцитозом синапсів. Нокаут компоненту C3 запобігає втратам, як синапсів, так і нейронів у гіпокампі, котрі супроводжують процес старіння. Ще одним важливий регулятором елімінації синапсів виявлений в мікроглії є TAR-ДНК-зв'язуючий протеїн 43 (TDP-43). Нокаут цього протеїна посилює фагоцитоз у нервовій тканині, а у мишей, що не мали TDP-43 у мікроглії визначені значні втрати синапсів. Наявність різних варіантів генів компонентів C4 системи комплементу є ознакою схильності до шизофренії у людей. Показано, що компонент C4 каталізує адсорбцію C3 компонента на поверхню клітин, і тим самим, сприяє фагоцитозу синапсів під час розвитку у мишей, що свідчить про те, що надмірний фагоцитоз синапсів може сприяти шизофренії. Слід зауважити, що десятки, можливо, сотні генів, сприяють генетичному ризику шизофренії.

Окремі метаболічні сигнали, наприклад, індуковані дією з високим вмістом жиру можуть ініціювати втрату синапсів гіпокампа у мишей разом із активацією макро- та мікроглії. Виділені з мозку мишей астроцити і мікрогліальні клітини виявляли здатність до підвищеного фагоцитозу ізольованих синапсів (Нао, 2016).

Враховуючі відомі на сьогодні дані, одним з ключових механізмів сигналізації між клітинами, які опосередковують синаптичні втрати під час

розвитку, пошкодження нейронів та нейродегенерацію, є компоненти системи комплементу C1q та C3, а також рецептор CR3. Компонент C1q адсорбується в ділянках синаптичних мембран, змушуючи C3 похідні накопичуватися на тих же синапсах. Згодом, C3 компонент зв'язується з гліальним рецептором CR3 індукуючи мікроглію та/або астроцити до фагоцитозу цих синапсів.

Однак, залишається незрозумілим, що саме призводить до депонування C1q на певних синапсах і які саме події в них є індукторами опсонізації. Найбільш перспективними кандидатами для ініціації опсонізування розглядають фосфатидилсерин, калретікулін і десіалізацію. В той же час, показано, що компоненти C1q, C3 і рецептор CR3 можуть в принципі викликати синаптичні пошкодження незалежно від фагоцитозу.

Фагоцитоз життєздатних аксонів і дендритів

Фагоцитоз аксонів і дендритів, також, включає фагоцитоз синапсів, але фагоцитоз аксонів та дендритів, на відміну від синаптофагії, призводить до масштабної реорганізації архітектури нейронів та їх зв'язків (рис. 39).

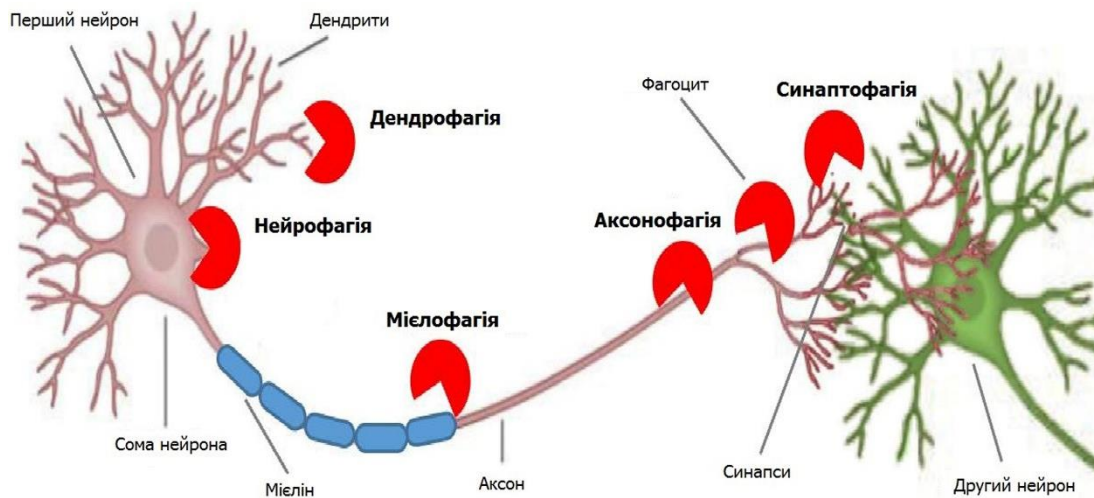


Рис. 39 Типи нейрофагії

Елімінація аксонів видаляє потужну комунікаційну можливість нейронних зв'язків під час розвитку, і, як викладено вище, є дані, що фагоцитоз сприяє цьому процесу. Втрата аксонів, що контролюють нервово-м'язові з'єднання супроводжується Шваннівським клітинним фагоцитозом кінцівок аксонів. Показано, що гліальні клітини *Drosophila* поглинають життєздатні аксони під час розвитку нервової системи, а порушення роботи гліального фагоцитозу затримує елімінацію аксонів. Різні порушення у

нервових клітинах можуть індукувати мікрогліальний фагоцитоз як пошкоджених, так і неушкоджених мієлінізованих аксонів. Блокування мікрогліального рецептора P2Y₁₂ запобігає активації такого надмірного фагоцитозу аксонів. Валеріанова дегенерація аксонів супроводжується експозицією фосфатидилсерина на поверхні аксонів, що сприяє активації фагоцитозу дегенеративних аксонів (Wakatsuki, 2017). Проте, залишається незрозумілим, чи блокування фагоцитозу за таких умов є корисним чи шкідливим для гомеостазу нервової системи.

Видалення дендритів у деяких випадках може бути спричинено активізацією субтоксичної каспази, яка може провокувати фагоцитоз клітин у ссавців та у нематоди *Caenorhabditis elegans*. У випадку *C. elegans*, активація каспаз зніціюється експозицією фосфатидилсерина на поверхню аксону і, у свою чергу, активує фагоцитоз аксонів з таким фосфатидилсериним сигналом (Oren-Suissa, 2017).

У змішаній культурі клітин показано, що обробка сіалідазами, яка обумовлює десіалізацію нейронів призводить до активації мікрогліального фагоцитозу живих нейритів. Таким чином, нестача залишків сіалової кислоти на зовнішній поверхні дендритів та аксонів є сигналом «з'їжте мене». Зазвичай, залишки сіалових кислот на поверхні нейронів активізують Siglec рецептори на мікроглії через які інгібують мікрогліальний фагоцитоз. Десіалізована поверхня нейронів дозволяє зв'язування компоненту C1q, що забезпечує мікрогліальний фагоцитоз шляхом активації рецептора CR3 (Claude, 2013). У *Drosophila* астроцити здатні поглинати дендрити під час розвитку (Tasdemir-Yilmaz, 2014).

Фагоцитоз частини аксона або дендрита, в принципі, може бути активований в будь якій ділянці нервового відростку. Таким чином, аксональна або дендритна елімінація шляхом гліального фагоцитозу здатна генерувати фрагменти відростків і забезпечує ефективну і швидку аксотомію «надлишкових» нейритів під час формування функціонально важливих нейрональних ансамблів. Однак, такий механізм потребує подальшого дослідження *in vivo* у тваринних моделях.

Фагоцитоз інтактного мієліну

Інтактний мієлін є частиною олігодендроцитів або клітин Шванна, але не нейронів, тому фагоцитоз інтактного мієліна, безпосередньо, не є нейрофагією. З іншого боку, оскільки мієлін структурно та функціонально щільно асоціюється з нейронами, патогенез мієлінових оболонки може вести до суттєвого погіршення нейрональних функцій.

Широке коло різних патологій ЦНС, таких як розсіяний склероз, асоційовані з втратою мієлінових оболонок. Демієлінізація як правило, виникає як результат дегенерації мієліна. У свою чергу, дегенерації мієліну потребує очищення від залишків мієлін-синтезуючих клітин, тобто, фагоцитозу мієлінового сміття. Саме тому, що залишки мієліну стимулюють запальний процес у нервовій тканині, що затримує ремієлінізацію і відновлення нервових функцій, важливою складовою підтримки гомеостазу у нервовій системі є регуляція фагоцитозу мієліна.

Розвиток розсіяного склерозу у людини і ранні пошкодження мієліна супроводжуються опсонізацією мієлінових оболонок компонентами системи комплементу та антимієліновими антитілами, а також, активацією фагоцитарних процесів. Все це свідчить про принципову важливість того, що активація фагоцитозу пошкоджених мієлінових оболонок реалізується за участі опсонінів. У пошкоджених периферичних нервових клітинах синтезується і вивільняється аполіпопротеїн D, який діє як опсонін для сприяння макрофагальному фагоцитозу інтактного мієліна. Фізичні ушкодження нейронів спинного мозку, також супроводжуються вивільненням широкого кола цитоплазматичних факторів, які провокують активацію мікроглії та мікрогліальний фагоцитоз інтактного мієліна.

Блокування P2Y₁₂ рецептору на мікрогліальних клітинах запобігає активації такого фагоцитозу, що свідчить про ключову роль цього рецептору в регуляції поглинання мієліна гліальними клітинами. Окремі вірусні інфекції мікроглії здатні активувати їх до фагоцитозу інтактних мієлінових оболонок. Таким чином, широке коло різних за походженням факторів може спричиняти фагоцитоз мієліну.

Фагоцитоз живих нейрональних попередників

Гомеостаз нейрональних мереж суттєвою мірою підтримується за рахунок заміни старих і пошкоджених нейронів новою генерацією клітин, які походять від пулу нейрональних попередників. Показано, що стовбурові клітини і попередники нейронів зберігаються в окремих ділянках мозку на протязі всього життя. Встановлено, що мікроглія здатна до фагоцитозу живих клітин-попередників нейронів у корі головного мозку шурів та мавп, а нокаут фагоцитарних рецепторів MerTK та Axl сприяє збільшенню кількості нейрональних попередників у мозку миші (Cunningham, 2013; Fourgeaud, 2016). У нервовій системі *Drosophila* астроцити здатні фагоцитувати незрілі нейрони у процесі розвитку (Tasdemir-Yilmaz, 2014). В ході розвитку *C. elegans* реалізується запрограмована загибель клітин,

зокрема, попередників нейронів та новонароджених нейронів сусідніми фагоцитозними гліальними клітинами, що сприяє формуванню функціонально значимих нейрональних мереж (Hoerrner, 2001).

Фагоцитоз життєздатних нейронів призводить до смерті нейронів і нейродегенерації. Загибель клітин шляхом фагоцитозу отримала назву короткочасного фагоцитозу і означає смерть клітин внаслідок того, що клітина мішень поглинається фагоцитозом іншою клітиною. Мертві або апоптотичні клітини достатньо швидко фагоцитуються шляхом так званого вторинного фагоцитозу або ефероцитозу. Пригнічення фагоцитозу у цьому випадку не заважатиме клітинній загибелі, а скоріше спричинить накопичення мертвих або апоптотичних клітин. Проте, в деяких обставинах, життєздатні клітини фагоцитуються і перетравлюються, що призводить до їх загибелі та елімінації клітинного матеріалу. Такий процес називають первинним фагоцитозом або фагоптозом. У випадку фагоптозу, інгібування фагоцитозу запобігає загибелі клітин, і ця характерна властивість може бути використана для діагностики первинного фагоцитозу (Brown, 2014). Окремо, треба зазначити, що пригнічення фагоцитозу може в деяких випадках мати інші ефекти, в першу чергу, розвиток запальної реакції. Саме тому, важливо враховувати, чи можуть такі ефекти впливати на загибель клітин незалежно від фагоцитозу.

Широке коло експериментальних результатів показали, що запальна активація мікроглії стимульована ліпополісахаридом, фактором некрозу пухлини- α або β -амілоїдом веде до індукованої загибелі нейронів через мікрогліальний фагоцитоз життєздатних нейронів протягом декількох днів в змішаній культурі клітин. Активована мікроглія вивільняє фактори, які обумовлюють процеси окиснення у плазматичній мембрані нейронів. Окисні ушкодження мембранних молекул індукують транслокацію нейронального фосфатидилсерина з внутрішнього на зовнішній бік плазматичної мембрани і, таким чином, вмикається сигнал «з'їжте мене», що викликає опсонізацію та мікрогліальний фагоцитоз.

Запобігання і гальмування мікрогліального фагоцитозу шляхом блокування фосфатидилсерина, калретікуліна, MFG-E8, MerTK або P2Y6 рецепторів, що, загалом, попереджає загибель нейронів, було виявлено як в культурі клітин, так і в мозку тварин (Neher, 2013). Введення ліпополісахариду в ділянки мозку гризунів викликало стимуляцію мікрогліального фагоцитозу нейронів і втрату нейронів. В той же час, нокаут рецепторів опсонінів MFG-E8, VNR або P2Y6 в значній мірі гальмував фагоцитоз та елімінацію нейронів. Аналогічно, транз'єнтна ішемія мозку стимулює мікрогліальний фагоцитоз нейронів, а нокаут MFG-

E8 або MerTK гальмує втрати нейронів через інгібування фагоцитозу. Однак, потрібно зазначити, що нокаут різних фагоцитарних рецепторів, зокрема, TREM2, був шкідливим при ішемії мозку (Kawabori, 2015).

Процеси, які асоційовані із старінням можуть бути одним з факторів стимуляції фагоцитозу нейронів. В тваринній моделі показано, що втрата нейронів гіпокампа у старих тварин співпадала з активацією фагоцитозу. Той факт, що генетичне виключення генів опсоніну комплементу C3 запобігає нейрональним втратам, свідчить про важливу роль гліального фагоцитозу у вікових змінах міжклітинної сигналізації між нейронами і гліальними клітинами. Втрата сенсорних нейронів сітківки в моделі пігментного ретиніту була компенсована шляхом інгібування мікрогліальної активності або блокування VNR (Zabel, 2016).

У моделях хвороби Паркінсона виявлено, що втрата дофамінергічних нейронів в чорній субстанції обумовлена активацією гліального фагоцитозу. Роль гліальних клітин була підтверджена блокуванням окремих ланок сигналізації фагоцитозної активності. Декілька окремих моделей показали зменшення нейрональних втрат за рахунок зниження фагоцитозу, зокрема, (а) нокаут компоненту C3 системи комплементу в моделі периферичної токсичності ліпополісахариду, (б) інгібування VNRs в метил-феніл-тетрагідропіридин (MPTP) моделі; (в) блокування Rho-асоційованої протеїнкінази в моделі MPTP; (г) нокаут фагоцитарного адаптерного протеїна DAP12 в моделі гідроксидопаміна і (д) блокування експонованого фосфатидилсерина з анексіном V у гістаміновій моделі. Більш за те, нокаут фагоцитарних рецепторів MerTK та Ax1 збільшував виживаність нейронів у асинуклеїновій моделі хвороби Паркінсона. Однак, як зазначалося вище, цілком можливо, що у всіх цих моделях нокаут фагоцитарних рецепторів або опсонінів міг впливати на смерть нейронів за допомогою інших засобів, ніж фагоцитоз.

Нокаут опсоніну компоненту C3 знижує втрати нейронів і погіршення пам'яті, незважаючи на зростання числа амілоїдних бляшок в моделі хвороби Альцгеймера, яка супроводжується активацією мікрогліальних клітин. Мутації і формування агрегатів TDP-43 пов'язані з лобно-скроневою дегенерацією та аміотрофічним склерозом. Виявлено, що блокування експресії TDP-43 в мікроглії підвищує фагоцитоз та індукує синаптичні втрати. Мутації та поліморфізм гена програнуліна (PGRN) пов'язані з дегенерацією лобно-скроневої частки, хворобою Альцгеймера, хворобою Паркінсона та аміотрофічним склерозом. В той же час, інактивация PGRN викликає підвищений фагоцитоз апоптотичних нейронів, що свідчить про можливість того, що до розвитку таких відомих

нейродегенеративних патологій можуть залучатися порушення в сигналізації гліального фагоцитозу, оскільки PGRN запобігає, зазвичай, надмірній активації фагоцитозу.

Як зазначено вище, у *C. elegans* фагоцитоз сприяє запрограмованій клітинній загибелі нейрональних попередників під час розвитку. З іншого боку, виявлено, що фагоцитоз також спричиняє смерть дорослих нейронів і веде до субтоксичного інсульту або появи клітин, що експонують фосфатидилсерин через експресію мутантних фосфатидилсеринових транслоказ. Таким чином, є докази того, що смерть клітин нейронів шляхом фагоцитозу є поширеним під час розвитку та патології.

Фагоцитоз може призвести до загибелі клітин, якщо клітина-мішень повністю поглинається фагоцитуючою клітиною. Однак клітина може бути необоротно ушкоджена внаслідок часткового фагоцитозу клітини-мішені (French, 2017). Наприклад, фагоцитоз дендритів може пошкодити цілісність плазматичної мембрани в тій мірі, в якій клітина, безпосередньо, входить в стадію некрозу. Або фагоцитоз може призвести до аксотомії, яка вбиває клітину шляхом дегенерації Валеріана, хоча експериментальних доказів такого розвитку подій суттєво бракує. В принципі, надмірний фагоцитоз синапсів може призвести до вторинної нейронної смерті пре- або постсинаптичного нейрону. Специфічно спрямований фагоцитоз збудливих синапсів міг би, в принципі, підтримувати виживаність нейронів, запобігаючи надмірній активації та смерті нейронів за рахунок ексайтотоксичності. З іншого боку, фагоцитоз, специфічно інгібіторних синапсів, цілком можливо, може призвести до надмірної активації та смерті нейронів за рахунок ексайтотоксичності. Таким чином, нейрофагія може бути спрямована, як на елімінацію нейронів, так і призвести до нейропротекторних ефектів за рахунок реалізації значного числа відмінних шляхів сигналізації між клітинами та різних механізмів внутрішньоклітинних подій.

Нейрофагія

“Нейрофагія” – це термін, який був вперше запропонований у 1890-х роках невропатологом Жоржем Маринеско, який дослідив фіксовані ділянки головного мозку у пацієнтів і виявив гліальні клітини, які, очевидно, фагоцитували нейрони. Узагальнення напрямків та мішеней нейронального фагоцитозу представлено на рис. 38.

Фагоцитоз нейронів може швидко призвести до загибелі клітини-мішені, якщо така клітина поглинається повністю. Ж. Маринеско

використовував термін “нейронофагія” для позначення знищених фагоцитозом нейронів (Marinesco, 1907). Однак, в даний час, цей термін використовується невропатологами для позначення фагоцитів, що поглинають нейрони, не вказуючи, чи нейрони фагоцитуються мертвими або живими, і чи є фагоцитоз причиною смерті клітин-мішеней. Це питання є принципово важливим для визначення ролі нейрофагії у забезпеченні гомеостазу ЦНС, так само, як і у розвитку патогенетичних порушень. На жаль, патологи не можуть в даний час визначити, чи нейрон був перетравлений мертвим або живим у фіксованій ділянці мозку. Таким чином, “нейронофагія” і “нейрофагія” відрізняються в тому сенсі, що перший термін в даний час означає фагоцитоз нейронів (мертвих або живих), тоді як останні стосуються фагоцитозу живих (життєздатних) нейронів та/або їх складових частин. Деякі випадки повідомлень про нейронофагію можуть бути нейрофагією. Наприклад, є декілька повідомлень про нейронофагію в мозку, інфікованому різними вірусами, включаючи ентеровірус 71, де вірусна інфекція призвела до виявлення калретікуліну на нейронах які, очевидно, були живими перетравлені гліальними клітинами (Hu, 2017).

Це підвищує можливість того, що однією з функцій нейронофагії та нейрофагії є видалення та знищення вірусно-інфікованих нейронів, з метою запобігти поширенню вірусу. Нейронофагія виявлена, також, в інших патологіях людського мозку та тваринних моделях захворювання, зокрема, у випадках інсульту із діабетом, епілепсії, старіння, тваринних моделях старіння та розсіяного склерозу.

Фагоцитоз мертвих і вмираючих нейронів як клітинного “сміття”

На додаток до елімінації живих нейронів, мікроглія здатна до масштабного фагоцитозу мертвих і вмираючих (апоптотичних) нейронів, а також, більшості типів нейронального сміття. Такий фагоцитоз опосередковується фосфатидилсеринним нейрональним сигналом, який виявляється всіма опсонінами та рецепторами, орієнтованими на фосфатидилсерин (рис. 37). Оскільки, фосфатидилсерин може бути експонований, в деяких випадках, і на поверхні життєздатних нейронів, такий сигнал обумовлює той факт, що фагоцитоз мертвих нейронів перебивається з фагоцитозом живих нейронів.

Відомо, що система комплементу C1q, C3 і CR3, система УДФ і P2Y6, і нейрональна десіалізація можуть бути посередниками мікрогліального фагоцитозу живих нейронів або окремих нейрональних частин. Однак, в даний час невідомо, чи можуть вони виступати як посередники фагоцитозу мертвих нейронів. Таке питання є вкрай важливим для лікування широкого кола хвороби ЦНС. Розкриття такого питання дозволить розробити терапевтичну стратегію, яка дозволить використовувати нетоксичні специфічні молекулярні інструменти для блокування фагоцитозу живих нейронів, без запобігання фагоцитозу мертвих нейронів або нейронального сміття.

Враховуючи той факт, що фагоцитоз синапсів, дендритів, аксонів та нейронів має спільні механізми сигналізації, цілком можливе використання специфічних інгібіторів окремих ланок експонування молекулярних сигналів, специфічного розпізнавання та активації ефекторних клітин. Сучасні дані доводять, що механізми елімінації нейронів та їх окремих функціонально важливих ділянок збігаються і мають перехресні ефекти. Наприклад, компоненти системи комплементу C1q, C3b та CR3 беруть участь у фагоцитозі синапсів, дендритів та цілих нейронів. Вплив фосфатидилсерину або десіалілування поверхні можуть індукувати фагоцитоз будь-якого нейронального компоненту.

В той час, існує величезна кількість питань, які ми не знаємо про нейрофагію, в тому числі:

1. Які сигнали від синапсів, аксонів та дендритів сприяють та/або пригнічують фагоцитоз?
2. Яку роль відіграє нейрофагія у фізіології та патології?
3. Яким чином і коли корисно блокувати нейрофагію в конкретних захворюваннях?

Для того, щоб відповісти на ці запитання, нам потрібно збільшити нашу обізнаність відносно молекулярних механізмів сигналізації нейрофагії *in vivo* та *in vitro*, виявити специфічні маркери нейрофагії у фіксованих ділянках мозку.

Haderk, F., Schulz, R., Iskar, M., Cid, L.L., Worst, T., Willmund, K.V., & Seiffert, M. (2017). Tumor-derived exosomes modulate PD-L1 expression in monocytes. *Science Immunol*, 2(13), pii: eaah5509.

Hao, S., Dey, A., Yu, X., & Stranahan, A.M. (2016). Dietary obesity reversibly induces synaptic stripping by microglia and impairs hippocampal plasticity. *Brain Behav Immun*, 51, 230–239.

He, C., Zheng, S., Luo, Y., & Wang, B. (2018). Exosome theranostics: biology and translational medicine. *Theranostics*, 8(1), 237-255.

Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T.L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., & Lyden, D. (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, 527(7578), 329–335.

Hoshino, D., Kirkbride, K.C., Costello, K., Clark, E.S., Sinha, S., Grega-Larson, N., & Weaver, A.M. (2013). Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior. *Cell Rep*, 5(5), 1159–1168

Hsu, Y.L., Hung, J.Y., Chang, W.A., Jian, S.F., Lin, Y.S., Pan, Y.C., & Kuo, P.L. (2018). Hypoxic lung cancer-derived extracellular vesicle miR-103a increases the oncogenic effects of tumor associated macrophages by targeting PTEN. *Mol Ther*, 26(2), 568–581.

Hu, D.D., Mai, J.N., He, L.Y., Li, P.Q., Chen, W.X., Yan, J.J., Zhu, W.D., Deng, L., Wei, D., Liu, D.H., Yang, S.D., & Yao, Z.B. (2017). Glucocorticoids prevent enterovirus 71 capsid protein VP1 induced calreticulin surface exposure by alleviating neuronal ER stress. *Neurotox Res*, 31(2), 204–217.

Huang, F., Wan, J., Hao, S., Deng, X., Chen, L., & Ma, L. (2017). TGF- β 1-silenced leukemia cell-derived exosomes target dendritic cells to induce potent anti-leukemic immunity in a mouse model. *Cancer Immunol Immunother*, 66(10), 1321–1331.

Hyenne, V., Apaydin, A., Rodriguez, D., Spiegelhalter, C., Hoff-Yoessle, S., Diem, M., Tak, S., Lefebvre, O., Schwab, Y., Goetz, J.G. & Labouesse, M. (2015). RAL-1 controls multivesicular body biogenesis and exosome secretion. *J Cell Biol*, 211(1), 27–37.

Iessi, E., Logozzi, M., Lugini, L., Azzarito, T., Federici, C., Spugnini, E.P., Mizzoni, D., Di Raimo, R., Angelini, D.F., Battistini, L., Cecchetti, S. & Fais, S. (2017). Acridine orange-exosomes increase the delivery and the effectiveness of acridine orange in human melanoma cells: A new prototype for theranostics of tumors. *J Enz Inhib Med Chem*, 32(1), 648–657.

Imjeti, N. S., Menck, K., Egea-Jimenez, A. L., Lecointre, C., Lembo, F., Bouguenina, H., Badache, A., Ghossoub, R., David, G., Roche, S. & Zimmermann, P. (2017). Syntenin mediates SRC function in exosomal cell-to-cell communication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 114(47), 12495–12500.

Iram, T., Ramirez-Ortiz, Z., Byrne, M.H., Coleman, U.A., Kingery, N.D., Means, T.K., Frenkel, D. & El Houry, J. (2016). Megf10 is a receptor for C1Q that mediates clearance of apoptotic cells by astrocytes. *J Neurosci*, 36(19), 5185–5192.

Itoh, S., Mizuno, K., Aikawa, M. & Aikawa, E. (2018). Dimerization of sortilin regulates its trafficking to extracellular vesicles. *J Biol Chem*, 293(12), 4532–4544.

Kahlert, C., Melo, S.A., Protopopov, A., Tang, J., Seth, S., Koch, M. & Kalluri, R. (2014). Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. *J Biol Chem*, 289(7), 3869–3875.

Kahlert, C. & Kalluri, R. (2013). Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med (Berl)*, 91(4), 431–437.

Kakegawa, W., Mitakidis, N., Miura, E., Abe, M., Matsuda, K., Takeo, Y.H., Kohda, K., Motohashi, J., Takahashi, A., Nagao, S. Muramatsu, S., Watanabe, M., Sakimura, K., Aricescu, A.R. & Yuzaki, M. (2015). Anterograde C1ql1 signaling is required in order to determine and maintain a single-winner climbing fiber in the mouse cerebellum. *Neuron*, 85(2), 316–329.

Kalani, A., Tyagi, A. & Tyagi, N. (2014). Exosomes: mediators of neurodegeneration, neuroprotection and therapeutics. *Mol Neurobiol*, 49(1), 590–600.

Kamerkar, S., LeBleu, V.S., Sugimoto, H., Yang, S., Ruivo, C.F., Melo, S.A., Lee, J.J. & Kalluri, R. (2017). Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature*, 546(7659), 498–503.

Kanninen, K., Bister, N., Koistinaho, J. & Malm, T. (2016). Exosomes as new diagnostic tools in CNS diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1862(3), 403–410.

Kawabori, M., Kacimi, R., Kauppinen, T., Calosing, C., Kim, J.Y., Hsieh, C.L., Nakamura, M.C. & Yenari, M.A. (2015). Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) deficiency attenuates phagocytic activities of microglia and exacerbates ischemic damage in experimental stroke. *J Neurosci*, 35(8), 3384–3396.

Kordelas, L., Rebmann, V., Ludwig, A.K., Radtke, S., Ruesing, J., Doeppner, T.R. & Giebel, B. (2014). MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. *Leukemia*, 28, 970–973.

Korkut, C., Li, Y., Koles, K., Brewer, C., Ashley, J., Yoshihara, M. & Budnik, V. (2013). Regulation of postsynaptic retrograde signaling by presynaptic exosome release. *Neuron*, 77(6), 1039–1046.

Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J.P., Primdal-Bengtson, B., Dingli, F., Loew, D., Tkach, M. & Théry, C. (2016). Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 113(8), E968–E977.

Marinesco, G. (1907). *Le Cellule Nerveuse*, Vol. 2. Octave Doin et Fils, Paris.

Maybruck, B.T., Pfannenstiel, L.W., Diaz-Montero, M. & Gastman, B.R. (2017). Tumor-derived exosomes induce CD8+ T cell suppressors. *J Immunother Cancer*, 5(1), 65.

Melo, S.A., Sugimoto, H., O'Connell, J.T., Kato, N., Villanueva, A., Vidal, A., Qiu, L., Vitkin, E., Perelman, L.T., Melo, C.A., et al. (2014). Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. *Cancer Cell*, 26(12), 707–721.

Morgan-Fisher, M., Wewer, U.M. & Yoneda, A. (2013). Regulation of ROCK activity in cancer. *J Histochem Cytochem*, 61(3), 185–198.

Mukherjee, K., Ghoshal, B., Ghosh, S., Chakrabarty, Y., Shwetha, S., Das, S. & Bhattacharyya, S.N. (2016). Reversible HuR-microRNA binding controls extracellular export of miR-122 and augments stress response. *EMBO Reports*, 17(8), 1184–1203.

Lang, H.L., Hu, G.W., Zhang, B., Kuang, W., Chen, Y., Wu, L. & Xu, G.H. (2017). Glioma cells enhance angiogenesis and inhibit endothelial cell apoptosis through the release of exosomes that contain long non-coding RNA CCAT2. *Oncol Reports*, 38(2), 785–978.

Lawson, J., Dickman, C., MacLellan, S., Towle, R., Jabalee, J., Lam, S. & Garnis, C. (2017). Selective secretion of microRNAs from lung cancer cells via extracellular vesicles promotes CAMK1D-mediated tube formation in endothelial cells. *Oncotarget*, 8(48), 83913–83924.

Lawson, J., Dickman, C., MacLellan, S., Towle, R., Jabalee, J., Lam, S. & Garnis, C. (2017). Selective secretion of microRNAs from lung cancer cells via extracellular vesicles promotes CAMK1D-mediated tube formation in endothelial cells. *Oncotarget*, 8(48), 83913–83924.

Lázaro-Ibáñez, E., Sanz-García, A., Visakorpi, T., Escobedo-Lucea, C., Siljander, P., Ayuso-Sacido, Á. & Yliperttula, M. (2014). Different gdnf content in the subpopulations of prostate cancer extracellular vesicles: Apoptotic bodies, microvesicles, and exosomes. *Prostate*, 74(14), 1379–1390.

Li, L., Li, C., Wang, S., Wang, Z., Jiang, J., Wang, W., Li, X., Chen, J., Liu, K., Li C. & Zhu, G. (2016). Exosomes derived from hypoxic oral squamous cell carcinoma cells deliver miR-21 to normoxic cells to elicit a prometastatic phenotype. *Cancer Res*, 76(7), 1770–1780.

Linnartz, B., Kopatz, J., Tenner, A.J. & Neumann, H. (2012). Sialic acid on the neuronal glycolyx prevents complement C1 binding and complement receptor-3-mediated removal by microglia. *J Neurosci*, 32(3), 946–952.

Linnartz-Gerlach, B., Schuy, C., Shahraz, A., Tenner, A.J. & Neumann, H. (2016). Sialylation of neurites inhibits complement-mediated macrophage removal in a human macrophage-neuron Co-Culture System. *Glia*, 64(1), 35–47.

Liu, Y., Gu, Y., Han, Y., Zhang, Q., Jiang, Z., Zhang, X. & Cao, X. (2016). Tumor exosomal RNAs promote lung pre-metastatic niche formation by activating alveolar epithelial TLR3 to recruit neutrophils. *Cancer Cell*, 30(2), 243–256.

Lu, Z., Zuo, B., Jing, R., Gao, X., Rao, Q., Liu, Z., Qi, H., Guo, H. & Yin, H. (2017). Dendritic cell-derived exosomes elicit tumor regression in autochthonous hepatocellular carcinoma mouse models. *Hepatology*, 67(4), 739–748.

Luarte, A., Batiz, L., Wyneken, U. & Lafourcade, C. (2016). Potential therapies by stem cell-derived exosomes in CNS diseases: focusing on the neurogenic niche. *Stem Cells Int*, 5736059.

Luga, V., Zhang, L., Vitoria-Petit, A.M., Ogunjimi, A.A., Inanlou, M. R., Chiu, E. & Wrana, J.L. (2012). Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell*, 151(7), 1542–1556.

Nabet, B. Y., Qiu, Y., Shabason, J.E., Wu, T.J., Yoon, T., Kim, B.C. & Minn, A.J. (2017). Exosome RNA unshielding couples stromal activation to pattern recognition receptor signaling in cancer. *Cell*, 170(352–366), e313

Neher, J.J., Emmrich, J.V., Fricker, M., Mander, P.K., Thery, C. & Brown, G.C. (2013). Phagocytosis executes delayed neuronal death after focal brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(43), E4098–E4107.

Németh, A., Orgovan, N., Sódar, B.W., Osteikoetxea, X., Pálóczi, K., Szabó-Taylor, K.É., Vukman, K.V., Kittel, Á., Turiák, L. & Wiener, Z. (2017). Antibiotic-induced release of small extracellular vesicles (exosomes) with surface-associated DNA. *Sci Rep*, 7(1), 8202.

Neniskyte, U. & Gross, C.T. (2017). Errant gardeners: glial-cell-dependent synaptic pruning and neurodevelopmental disorders. *Nat Rev Neurosci*, 18(11), 658–670.

Nishida-Aoki, N., Tominaga, N., Takeshita, F., Sonoda, H., Yoshioka, Y. & Ochiya, T. (2017). Disruption of circulating extracellular vesicles as a novel therapeutic strategy against cancer metastasis. *Mol Ther*, 25(1), 181–191

Nomura, K., Vilalta, A., Allendorf, D.H., Hornik, T.C. & Brown, G.C. (2017). Activated microglia desialylate and phagocytose cells via neuraminidase, galectin-3, and Mer tyrosine kinase. *J Immunol*, 198(12), 4792–4801.

Ostenfeld, M.S., Jeppesen, D.K., Laurberg, J.R., Boysen, A.T., Bramsen, J.B., Primdal-Bengtson, B., Hendrix, A., Lamy, P., Dagnaes-Hansen, F., Rasmussen, M.H., Bui, K.H., Fristrup, N., Christensen, E.I., Nordentoft, I., Morth, J.P., Jensen, J.B., Pedersen, J.S., Beck, M., Theodorescu, D., Borre, M., Howard, K.A3, Dyrskjøt, L. & Orntoft, T. F. (2014). Cellular disposal of miR23b by RAB27-dependent exosome release is linked to acquisition of metastatic properties. *Cancer Res*, 74(20), 5758–5771.

- Ohno, S., Takanashi, M., Sudo, K., Ueda, S., Ishikawa, A., Matsuyama, N., Fujita, K., Mizutani, T., Ohgi, T., Ochiya, T., et al. (2013). Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells. *Mol Ther*, 21, 185–191
- Oren-Suissa, M., Gattegno, T., Kravtsov, V. & Podbilewicz, B. (2017). EFF-1-mediated regenerative axonal fusion requires components of the apoptotic pathway. *Genetics*, 206(7533), 215–230.
- Panagiotara, A., Markou, A., Lianidou, E.S., Patrinos, G.P. & Katsila, T. (2017). Exosomes: A cancer theranostics road map. *Public Health Genomics*, 20(2), 116–125.
- Paul, C. D., Mistriotis, P. & Konstantopoulos, K. (2017). Cancer cell motility: lessons from migration in confined spaces. *Nat Rev Cancer*, 17(20), 131–140.
- Pegtel, D.M., Cosmopoulos, K., Thorley-Lawson, D.A., van Eijndhoven, M.A., Hopmans, E.S., Lindenberg, J.L. & Middeldorp, J.M. (2010). Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107(14), 6328–6333.
- Peinado, H., Zhang, H., Matei, I.R., Costa-Silva, B., Hoshino, A., Rodrigues, G. & Lyden, D. (2017). Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. *Nat Rev Cancer*, 17(5), 302–317.
- Peinado, H., Alečkovič, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., García-Santos, G. & Ghajar, C.M. (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through met. *Nat Med*, 18(6), 883–891.
- Perez-Hernandez, D., Gutierrez-Vazquez, C., Jorge, I., Lopez-Martin, S., Ursa, A., Sanchez-Madrid, F. & Yanez-Mo, M. (2013). The Intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *J Biol Chem*, 288(7), 11649–11661.
- Prinz, M. & Priller, J. (2017). The role of peripheral immune cells in the CNS in steady state and disease. *Nat Neurosci*, 20(2), 136–144.
- Properzi, F., Ferroni, E., Poleggi, A. & Vinci, R. (2015). The regulation of exosome function in CNS: implications for neurodegeneration. *Swiss Med Wkly*, 145(w14204), 1–14.
- Pucci, F., Garris, C., Lai, C. P., Newton, A., Pfirschke, C., Engblom, C., Alvarez, D., Sprachman, M., Evavold, C., Magnuson, A., von Andrian, U.H., Glatz, K., Breakefield, X.O., Mempel, T.R., Weissleder, R. & Pittet, M. J. (2016). SCS macrophages suppress melanoma by restricting tumor-derived vesicle-B cell interactions. *Science*, 352(6282), 242–246.
- Ramirez, M.I., Amorim, M.G., Gadelha, C., Milic, I., Welsh, J.A., Freitas, V.M., Nawaz, M., Akbar, N., Couch, Y., Makin, L. (2018). Technical challenges of working with extracellular vesicles. *Nanoscale*, 10(3), 881–906
- Rana, S., Yue, S., Stadel, D. & Zoller, M. (2012). Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. *Int J Biochem Cell Biol*, 44(9), 1574–1584.
- Ratajczak, J., Miekus, K., Kucia, M., Zhang, J., Reca, R., Dvorak, P. & Ratajczak, M. Z. (2006). Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*, 20(5), 847–856.
- Rath-Wolfson, L., Shvero, A., Bubis, G., Buzaverov, G., Zeidman, A., Ram, E. & Koren, R. (2017). Morphological changes in peri-prostatic sympathetic ganglion cells in aging males. *Mol Clin Oncol*, 6(5), 713–717.
- Rashed, M. H., Kanlikilicer, P., Rodriguez-Aguayo, C., Pichler, M., Bayraktar, R., Bayraktar, E. , & Berestein, G.L. (2017). Exosomal miR-940 maintains SRC-mediated

oncogenic activity in cancer cells: a possible role for exosomal disposal of tumor suppressor miRNAs. *Oncotarget* 8(3), 20145–20164

Ricklefs, F., Mineo, M., Rooj, A.K., Nakano, I., Charest, A., Weissleder, R., Breakefield, X.O., Chiocca, E.A., Godlewski, J. & Bronisz, A. (2016). Extracellular vesicles from high-grade glioma exchange diverse pro-oncogenic signals that maintain intratumoral heterogeneity. *Cancer Res*, 76(10), 2876–2881

Ruiz-Martinez, M., Navarro, A., Marrades, R.M., Vinolas, N., Santasusagna, S., Munoz, C., Ramirez, J., Molins, L. & Monzo, M. (2016). YKT6 expression, exosome release, and survival in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 7(32), 51515–51524.

Salomon, C., Guanzon, D., Scholz-Romero, K., Longo, S., Correa, P., Illanes, S.E. & Rice, G.E. (2017). Placental exosomes as early biomarker of preeclampsia-Potential role of exosomal microRNAs across gestation. *J Clin Endocrinol Metabol*, 102(9), 3182–3194.

Santangelo, L., Giurato, G., Cichini, C., Montaldo, C., Mancone, C., Tarallo, R. & Tripodi, M. (2016). The RNA-binding protein SYNCRIP is a component of the hepatocyte exosomal machinery controlling microRNA sorting. *Cell Reports* 17(4), 799–808.

Sansone, P., Savini, C., Kurelac, I., Chang, Q., Amato, L.B., Strillacci, A. & Bromberg, J. (2017). Packaging and transfer of mitochondrial DNA via exosomes regulate escape from dormancy in hormonal therapy-resistant breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 114(34), E9066–E9075.

Sato, Y., Umezaki, K., Sawada, S., Mukai, S., Sasaki, Y., Harada, N., Shiku, H. & Akiyoshi, K. (2016). Engineering hybrid exosomes by membrane fusion with liposomes. *Sci Rep*, 6, 21933.

Schillaci, O., Fontana, S., Monteleone, F., Taverna, S., Di Bella, M.A., Di Vizio, D. & Alessandro, R. (2017). Exosomes from metastatic cancer cells transfer amoeboid phenotype to non-metastatic cells and increase endothelial permeability: Their emerging role in tumor heterogeneity. *Sci Rep*, 7(1), 4711.

Schoneberg, J., Lee, I.H., Iwasa, J.H. & Hurley, J.H. (2017). Reverse-topology membrane scission by the ESCRT proteins. *Nature Reviews. Mol Cell Biol*, 18(5), 5–17

Schwarzenbach, H. (2015). The clinical relevance of circulating, exosomal miRNAs as biomarkers for cancer. *Expert Rev Mol Diagn*, 15(9), 1159–1169.

Segawa K, Kurata S, Yanagihashi Y, Brummelkamp TR, Matsuda F & Nagata S (2014) Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure. *Science*, 344(6188), 1164–1168.

Shi, Q., Chowdhury, S., Ma, R., Le, K.X., Hong, S., Caldarone, B.J., Stevens, B. & Lemere, C.A. (2017). Complement C3 deficiency protects against neurodegeneration in aged plaque-rich APP/PS1 mice. *Sci Transl Med*, 9(392), eaaf6295.

Shinohara, H., Kuranaga, Y., Kumazaki, M., Sugito, N., Yoshikawa, Y., Takai, T., Taniguchi, K., Ito, Y. & Akao, Y. (2017). Regulated polarization of tumor-associated macrophages by miR-145 via co-lorectal cancer-derived extracellular vesicles. *J Immun*, 199(4), 1505–1515.

Shurtleff, M.J., Temoche-Diaz, M.M., Karfilis, K.V., Ri, S. & Schekman, R. (2016). Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction. *Elife*, 5, pii: e19276.

Sinha, S., Hoshino, D., Hong, N.H., Kirkbride, K.C., Grega-Larson, N.E., Seiki, M. & Weaver, A.M. (2016). Cortactin promotes exosome secretion by controlling branched actin dynamics. *J Cell Biol*, 214(2), 197–213.

Skog, J., Wurdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D.H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, W.T.Jr., Carter, B.S., Krichevsky, A.M. & Breakefield, X.O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*, 10(12), 1470–1476.

Soares, A., Martins-Marques, T., Ribeiro-Rodrigues, T., Ferreira, J., Catarino, S., Pinho, M. & Giraó, H. (2015). Gap junctional protein Cx43 is involved in the communication between extracellular vesicles and mammalian cells. *Sci Rep*, 5, 13243.

Song, J., Song, J., Mo, B. & Chen, X. (2015). Uridylation and adenylation of RNAs. *Sci China Life Sci*, 58(11), 1057–1066.

Squadrito, M.L., Baer, C., Burdet, F., Maderna, C., Gilfillan, G.D., Lyle, R. & De Palma, M. (2014). Endogenous RNAs modulate microRNA sorting to exosomes and transfer to acceptor cells. *Cell Rep*, 8(5), 1432–1446.

Street, J.M., Koritzinsky, E.H., Glispie, D.M. & Yuen, P.S.T. (2017). Urine exosome isolation and characterization. In: Gautier J-C, ed. *Drug safety evaluation: Methods and Protocols*. (New York, NY: Springer New York), pp. 413–423.

Sung, B.H. & Weaver, A.M. (2017). Exosome secretion promotes chemotaxis of cancer cells. *Cell Adhesion & Migration* 11(1), 187–195.

Suzuki, J., Imanishi, E. & Nagata, S. (2016). Xkr8 phospholipid scrambling complex in apoptotic phosphatidylserine exposure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 113(34), 9509–9514.

Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E., Grønborg, M., Riedel, D., Rammner, B., Gräter, F., Hub, J.S., De Groot, B.L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmüller, H., Heuser, J., Wieland, F. & Jahn, R. (2006). Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell*, 127(4), 831–846.

Takahashi, A., Okada, R., Nagao, K., Kawamata, Y., Hanyu, A., Yoshimoto, S., Yakasugi, M., Watanabe, S., Kanemaki, M.T., Obuse, C. & Hara, E. (2017). Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. *Nat Commun*, 9(1), 15287.

Tan, A., Pena, H. & Seifalian, A.M. (2010). The application of exosomes as a nanoscale cancer vaccine. *Int J Nanomed*, 5, 889–900.

Tasdemir-Yilmaz, O.E. & Freeman, M.R. (2014). Astrocytes engage unique molecular programs to engulf pruned neuronal debris from distinct subsets of neurons. *Genes Dev*, 28(1), 20–33.

Thakur, B. K., Zhang, H., Becker, A., Matei, I., Huang, Y., Costa-Silva, B., Zheng, Y., Hoshino, A., Brazier, H., Xiang, J., Williams, C., Rodriguez-Barrueco, R., Silva, J.M., Zhang, W., Hearn, S., Elemento, O., Paknejad, N., Manova-Todorova, K., Welte, K., Bromberg, J., Peinado, H. & Lyden, D. (2014). Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res*, 24(6), 766–769.

Thomou, T., Mori, M.A., Dreyfuss, J.M., Konishi, M., Sakaguchi, M., Wolfrum, C., Rao, T.N., Winnay, J.N., Garcia-Martin, R., Grinspoon, S.K., Gordon, P. & Kahn, C. R. (2017). Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. *Nature*, 542(7642), 450–455.

Tian, T., Zhu, Y., Hu, F., Wang, Y., Huang, N. & Xiao, Z. (2013). Dynamics of exosome internalization and trafficking. *J Cell Physiol*, 228(7), 1487–1495.

Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B. & Simons, M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*, 319(5867), 1244–1247.

Yang, T., Fogarty, B., LaForge, B., Aziz, S., Pham, T., Lai, L., Bai, (2017). Delivery of small interfering RNA to inhibit vascular endothelial growth factor in zebrafish using natural brain endothelia cell-secreted exosome nanovesicles for the treatment of brain cancer. *AAPS J*, 19(2), 475–486.

Yokoi, A., Yoshioka, Y., Yamamoto, Y., Ishikawa, M., Ikeda, S.-I., Kato, T., Kiyono, T., Takeshita, F., Kajiyama, H. & Kikkawa, F. (2017). Malignant extracellular vesicles carrying mmp1 mRNA facilitate peritoneal dissemination in ovarian cancer. *Nat Commun*, 8, 14470.

Yogev, O., Henderson, S., Hayes, M.J., Marelli, S.S., Ofir-Birin, Y., Regev-Rudzki, N., Herrero, J. & Enver, T. (2017). Herpesviruses shape tumour microenvironment through exosomal transfer of viral microRNAs. *PLoS Pathog*, 13(8), e1006524.

Wakatsuki, S., Tokunaga, S., Shibata, M. & Araki, T. (2017). GSK3B-mediated phosphorylation of MCL1 regulates axonal autophagy to promote Wallerian degeneration. *J Cell Biol*, 216(2), 477–493.

Wang, Y., Xu, Y.M., Zou, Y.Q., Lin, J., Huang, B., Liu, J., Li, J., Zhang, J., Yang, W.M. & Min, Q.H. (2017). Identification of differential expressed PE exosomal miRNA in lung adenocarcinoma, tuberculosis, and other benign lesions. *Medicine*, 96, e8361.

Webber, J.P., Spary, L.K., Sanders, A.J., Chowdhury, R., Jiang, W.G., Steadman, R., Wymant, J., Jones, A.T., Kynaston, H., Mason, M.D., Tabi, Z. & Clayton, A. (2015). Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes. *Oncogene*, 34(3), 290–302.

Wei, J.x., Lv, L.h., Wan, Y.l., Cao, Y., Li, G.l., Lin, H.m., Zhou, R., Shang, C.z., Cao, J. & He, H. (2015). Vps4A functions as a tumor suppressor by regulating the secretion and uptake of exosomal microRNAs in human hepatoma cells. *Hepatology*, 61(4), 1284–1294.

Wei, Z., Batagov, A.O., Schinelli, S., Wang, J., Wang, Y., El Fatimy, R., Rabinovsky, R., Balaj, L., Chen, C.C. & Hochberg, F. (2017). Coding and noncoding landscape of extracellular RNA released by human glioma stem cells. *Nat Commun*, 8(1), 1145.

Wolf, S.A., Boddeke, H.W. & Kettenmann, H. (2017). Microglia in physiology and disease. *Annu Rev Physio*, 79, 619–643.

Wu, Q., Wu, X., Ying, X., Zhu, Q., Wang, X., Jiang, L., Chen, X., Wu, Y. & Wang, X. (2017). Suppression of endothelial cell migration by tumor associated macrophage-derived exosomes is reversed by epithelial ovarian cancer exosomal lncRNA. *Cancer Cell Int*, 17, 62.

Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J.J. & Lotvall, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 9, 654–659.

Van, V.G. & An, S. (2016). Emergence of exosomal miRNAs as a diagnostic biomarker for Alzheimer's disease. *J Neurol Sci*, 360, 141–152.

Villarroya-Beltri, C., Baixauli, F., Mittelbrunn, M., Fernandez-Delgado, I., Torralba, D., Moreno-Gonzalo, O., Baldanta, S., Enrich, C., Guerra, S. & Sanchez-Madrid, F. (2016). ISGylation controls exosome secretion by promoting lysosomal degradation of MVB proteins. *Nat Commun*, 7, 13588.

Villarroya-Beltri, C., Gutierrez-Vazquez, C., Sanchez-Cabo, F., Perez-Hernandez, D., Vazquez, J., Martin-Cofreces, N. & Sanchez-Madrid, F. (2013). Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun*, 4, 2980

Urbanelli, L., Magini, A., Buratta, S., Brozzi, A., Sagini, K., Polchi, A., Tancini, B. & Emiliani, C. (2013). Signaling pathways in exosomes biogenesis, secretion and fate. *Genes*, 4(2), 152–170.

Zabel, M.K., Zhao, L., Zhang, Y., Gonzalez, S.R., Ma, W., Wang, X., Fariss, R.N. & Wong, W.T. (2016). Microglial phagocytosis and activation underlying photoreceptor degeneration is regulated by CX3CL1-CX3CR1 signaling in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Glia*, 64(9), 1479–1491.

Zhang, H., Li, F., Yang, Y., Chen, J. & Hu, X. (2015). SIRP/CD47 signaling in neurological disorders. *Brain Res*, 1623, 74–80.

Zhou, W., Fong, M. Y., Min, Y., Somlo, G., Liu, L., Palomares, M. R., O'Connor, S.T., Chin, A.R., Yen, Y., Wang, Y., Marcusson, E.G., Chu, P., Wu, J., Wu, X., Li, A.X., Li, Z., Gao, H., Ren, X., Boldin, M.P., Lin, P.C. & Wang, S. E. (2014). Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. *Cancer Cell*, 25(4), 501–515.

Zhu, L., Kalimuthu, S., Gangadaran, P., Oh, J.M., Lee, H.W., Baek, S.H., Jeong, S.Y., Lee, S.W., Lee, J. & Ahn, B.C. (2017). Exosomes derived from natural killer cells exert therapeutic effect in melanoma. *Thranostics*, 7(10), 2732–2745.

Zomer, A., Maynard, C., Verweij, F.J., Kamermans, A., Schafer, R., Beerling, E., Schiffelers, R.M., de Wit, E., Berenguer, J., Ellenbroek, S.I.J., Wurdinger, T., Pegtel, D.M. & van Rheenen, J. (2015). In Vivo imaging reveals extracellular vesicle-mediated phenocopying of metastatic behavior. *Cell*, 161(5), 1046–1057.

Наукове видання

УШАКОВА Галина Олександрівна
НЕДЗВЕЦЬКИЙ Віктор Станіславович
КИРИЧЕНКО Світлана Василівна

МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ МІЖКЛІТИННОЇ КОМУНІКАЦІЇ

За редакцією професора Г.О. Ушакової

Монографія

Підписано до друку 27.12.2018. Формат 60x84/16. Папір друкарський.
Друк плоский. Ум. друк. арк. 12,56. Ум. фарбовідб. Тираж 200 пр.
Зам. № 51.

ПП «Ліра ЛТД», вул. Наукова, 5, м. Дніпро, 49107.
Свідоцтво про внесення до Державного реєстру
Серія ДК № 6042 від 26.02.2018 р.