

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
"Институт экспериментальной медицины"

На правах рукописи

Карпенко Марина Николаевна

Регуляция адаптивных реакций мозга кальпаинами

1.5.5. – Физиология человека и животных

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:

Клименко Виктор Матвеевич
доктор медицинских наук, профессор

Санкт-Петербург – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	14
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1. Геномная организация и регуляция экспрессии генов μ -, m -кальпаина и кальпастина.....	15
1.2. Доменная организация кальпаинов.....	17
1.3. Регуляция активности кальпаинов.....	22
1.4. Субстратная специфичность кальпаинов.....	31
1.5. Тканевая локализация кальпаинов.....	33
1.6. Физиологические функции кальпаинов.....	39
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	62
2.1. Материалы.....	62
2.2. Лабораторные животные.....	62
2.3. Общая характеристика пациентов.....	64
2.4. Дизайн исследований, проводимых с использованием лабораторных животных.....	66
2.4.1. Проведение экспериментов на образцах, полученных от интактных крыс.....	66
2.4.2. Схема экспериментов с введением животным субсептической дозы ЛПС.....	66
2.4.3. Схема экспериментов с интраназальным введением животным $MnCl_2$	67
2.5. Методы анализа поведения животных, манипуляции с животными.....	69
2.5.1. Тест «Открытое поле».....	69
2.5.2. Оценка параметров походки в тесте «Следы».....	69
2.5.3. Измерение глубокой температуры тела у крыс.....	70
2.6. Лабораторные методы исследования.....	70
2.6.1. Получение гомогената клеток стриатума (препараты, обогащенные кальпаинами).....	70
2.6.2. Получение синаптосом.....	71
2.6.3. Определение активности ЛДГ.....	72
2.6.4. Денатурирующий электрофорез в ПААГ.....	72

2.6.5. Иммуноблоттинг	73
2.6.6. Иммунопреципитация	74
2.6.7. Казеиновая зимография в геле	74
2.6.8. Модифицированный метод казеиновой зимографии в геле	75
2.6.9. Казеиновая зимография в растворе	76
2.6.10. Атомно-абсорбционная спектрометрия	76
2.6.11. Выделение тотальной мРНК.....	76
2.6.12. Обратная транскрипция	77
2.6.13. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени	77
2.6.14. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)	79
2.6.15. Определение содержания ИЛ-1 β , ФНО-альфа в крови крыс	80
2.6.16. Гистологические методы исследования	81
2.7. Компьютерные программы и базы данных	82
2.8. Методы математической статистики	82
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	84
3.1. Влияние различных биологически активных веществ на активность кальпаинов <i>in vitro</i>	84
3.2. Влияние биологически активных веществ на способность m-кальпаина высвободиться из синапсом	94
3.3. Выявление механизма высвобождения/секреции m-кальпаина из синапсом.....	104
3.4. Содержание и активность кальпаинов в мозге крыс после действия биологически активных веществ.....	119
3.4.1. Содержание и активность кальпаинов в ЦНС крыс после введения субсептической дозы ЛПС.....	120
3.4.2. Содержание и активность кальпаинов в ЦНС крыс после интраназального введения MnCl ₂	151
3.5. Последствия подавления активности кальпаинов при интраназальном введении MnCl ₂ крысам	167
3.6. Активность кальпаинов в плазме крови пациентов с	192
заболеваниями экстрапирамидной системы	192
ВЫВОДЫ.....	219
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	225

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Центральная роль в реализации механизмов приспособления человека и животных к действию различных экологических факторов принадлежит мозгу. Индукция этих механизмов обеспечивает способность мозга и организма в целом поддерживать гомеостаз за счет перераспределения энергетических, метаболических и структурных ресурсов. Несмотря на то, что мозг обладает огромными адаптационными возможностями, при действии на организм экстремальных факторов возникает опасность развития дисрегуляторных процессов, приводящих к срыву адаптационных механизмов, причем область толерантности к действию экологического фактора зависит от индивидуальных особенностей организма и природы самого фактора.

Адаптационный потенциал клеток ЦНС в первую очередь определяется активностью внутриклеточных регуляторных систем, среди которых ключевой является кальциевая сигнальная система. Причем особенности ее функционирования заключаются в уникальной способности выполнять роль своеобразного триггера при переключении адаптационных процессов на патологические. В связи с этим, изучение вклада различных компонентов кальциевой сигнальной системы в формирование адаптивного потенциала клеток мозга является актуальной медико-биологической задачей, имеющей теоретическое и практическое значение. В этом аспекте особый интерес вызывает Ca^{2+} -зависимая кальпаиновая система внутриклеточных протеаз. Кальпаиновая система представлена кальпаинами (от слов «calmodulin»- кальмодулин и «papain»- папаин) - нейтральными Ca^{2+} -зависимыми, цистеиновыми протеазами и кальпастатином (эндогенным высокоспецифичным ингибитором кальпаинов). Наиболее изученными являются μ -кальпаин и m -кальпаин. Обе формы кальпаина имеют сходные биохимические характеристики, но их активация происходит при различной концентрации ионов Ca^{2+} : μ -кальпаину требуется микромолярная

концентрация Ca^{2+} , m-кальпаину – миллимолярная. Считается, что физиологическая роль кальпаинов полностью определяется их способностью к ограниченному протеолизу белков и пептидов. Так, идентифицировано более 100 белков - субстратов кальпаина. Среди них транскрипционные факторы, трансмембранные рецепторы, различные ферменты, белки цитоскелета, белки нервных окончаний. Таким образом, активация кальпаинов приводит к расщеплению белков-субстратов и, как следствие, к реорганизации цитоскелета клетки, изменению силы межклеточных связей, преобразованию пластических свойств клеточных мембран, модификации трансдукции сигнала от рецептора до генома, т.е. к активации базисных для реализации адаптации механизмов. Принимая во внимание вышеизложенное, представляемое исследование, направленное на выявление роли кальпаиновой системы в регуляции ответа клеток ЦНС на действие неблагоприятных средовых факторов различной природы, дополняет представление о физиологических функциях кальпаинов и открывает новые мишени для фармакологического воздействия с целью повышения адаптационного потенциала клеток ЦНР.

Степень разработанности темы исследования

В основу современных представлений об особенностях адаптации организма к изменяющимся условиям внешней и/или внутренней среды легли теории критических фаз развития организма [1], функциональных систем [2], нейроэнтропийная теория [3], теория дисрегуляционной патологии [4] и др. При исследовании процессов адаптации организма к неблагоприятным факторам особое внимание всегда уделялось ЦНС, обеспечивающей объединение всех информационных сигналов, необходимых для реализации физиологических функции [5–7]. Доказано, что в реализации адаптивных реакций мозга принимают участие нейромедиаторные системы, цитокины и некоторые протеолитические ферменты [4, 8–14]. Выявлен вклад регуляторных пептидов, образованных при ограниченном протеолизе белков,

в механизмы переноса информации между системами организма, его органами, тканями, группами клеток, клетками и клеточными органеллами, для реализации интегративной функции [15, 16].

В последние годы показана роль отдельных протеолитических систем в реализации адаптивных реакций мозга. Например, стало понятно, что наряду с участием в апоптотической гибели, каспаза-3 вовлечена в процессы структурной и функциональной адаптации головного мозга к изменяющимся условиям внешней и внутренней среды и в механизмы дифференцировки нервных клеток [17]. Список исследований, посвященных изучению роли кальпаиновой системы в регуляции адаптивных реакций мозга, весьма короткий, но непрерывно расширяется. Например, было установлено, что в мозге крыс при умеренной гипотермии, глубокой гипотермии и иммобилизации активность кальпаинов снижается, но возрастает при пролонгировании глубокой гипотермии [18]. При воздействии на водные организмы, принадлежащие к разным таксонам, факторов среды различной природы, включая антропогенный, показано, что протеолиз белков и пептидов под действием кальпаинов является приспособительным ответом [19]. В работах последних лет все чаще стала обсуждаться возможная плейотропная роль кальпаинов, поскольку при развитии патологии ЦНС ферменты данного семейства теоретически могут определять как гибель нервных клеток, так и компенсаторные процессы, необходимые для нормального функционирования мозга [20].

Цель исследования: выявить кальпаин-опосредованные механизмы регуляции повреждающих и защитных процессов, развивающихся в центральной нервной системе в ответ на действие неблагоприятных факторов различной природы.

Задачи исследования:

1. Оценить способность факторов бактериальной и химической природы (липополисахарид, $MnCl_2$, 3-нитропропионовая кислота, МФТП) влиять на активность кальпаинов *in vitro* и на модели нервных окончаний (синапсом).
2. Проанализировать влияние факторов бактериальной и химической природы (липополисахарид, $MnCl_2$, 3-нитропропионовая кислота, МФТП) на способность m-кальпаина высвободиться из синапсом.
3. Установить связь между степенью активации кальпаинов и содержанием внутри- и внесинапсомального пула нейромедиаторов (на примере дофамина).
4. Выявить механизм высвобождения m-кальпаина из синапсом.
5. Среди внеклеточных и трансмембранных белков произвести поиск неизвестных ранее белков-субстратов кальпаина.
6. Определить содержание и активность кальпаинов в мозге крыс после воздействия на организм неблагоприятных факторов бактериальной и химической природы.
7. Оценить возможность повышения адаптационного потенциала клеток ЦНС с помощью подавления активности кальпаинов.
8. Определить активность кальпаинов в плазме крови пациентов с различной тяжестью течения заболеваний экстрапирамидной системы.

Научная новизна

В настоящей работе выявлено включение кальпаиновой системы в механизмы регуляции ответа клеток ЦНС на действие повреждающих факторов бактериальной и химической природы, а именно: впервые показано, что μ -кальпаин активируется в присутствии хлорида марганца; аппликация нейротропных факторов химической природы ($MnCl_2$, МФТП, 3-НПК) к выделенным нервным окончаниям вызывает активацию m -кальпаина, а $MnCl_2$ также стимулирует, блокируемое глибенкламидом, высвобождение m -кальпаина из синапсом; подавление активности m -кальпаина с помощью синтетических ингибиторов интенсифицирует высвобождение дофамина выделенными нервными окончаниями; впервые среди внеклеточных и трансмембранных белков обнаружены потенциальные субстраты кальпаинов (матриксная металлопротеаза 2, матриксная металлопротеаза 9, внеклеточный домен D(1A) рецептора дофамина, КОМТ и др.).

Установлено, что при действии на организм повреждающих факторов бактериальной (ЛПС) или химической ($MnCl_2$) природы продукция мРНК/белка и активность μ - и m -кальпаина в клетках стриатума и гиппокампа меняется, причем временная динамика и выраженность данных изменений специфична для вида воздействия и для отдела мозга. При интоксикации $MnCl_2$ впервые продемонстрировано протективное действие синтетического ингибитора кальпаинов, соответствующего (184-210) аминокислоте в последовательности кальпастина человека, при хроническом интраназальном способе введения в дозе 50 мкг/кг в день.

Обнаружено повышение активности кальпаинов в плазме крови при развитии экстрапирамидных нарушений (БП и ЭТ), причем при БП, но не при ЭТ, активность кальпаинов возрастает при переходе от ранних к развернутым стадиям заболевания: на ранних стадиях развития БП повышение активности кальпаинов определяется вкладом μ -кальпаина, а на развернутых стадиях заболевания - m -кальпаином.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты дополняют существующие представления о физиологических функциях кальпаинов, расширяют понимание природы различной функциональной роли μ - и m -кальпаина.

В ходе исследования выявлены потенциальные мишени, воздействуя на которые возможно скорректировать негативное влияние повреждающих факторов бактериальной и химической природы на клетки ЦНР. На основе полученных данных могут быть разработаны методические подходы, позволяющие включить в схемы лечения социально значимых заболеваний нервной системы препараты на основе ингибиторов кальпаина, действующие с учетом различной функциональной роли μ - и m -кальпаина.

Результаты, полученные в ходе выполнения данного исследования, позволяют дополнить современные представления о молекулярных основах патогенеза экстрапирамидных нарушений и будут способствовать разработке стратегии выявления среди пациентов с БП групп риска с высокой скоростью прогрессирования заболевания.

Полученные данные могут быть использованы при преподавании курсов лекций по физиологии, нейрохимии, патологической физиологии.

Методология и методы исследования

Объектом настоящего исследования были частично очищенные протеазы семейства кальпаинов; выделенные нервные окончания – синапсомы; самцы крыс Вистар; плазма крови, полученная от пациентов с заболеваниями нервной системы.

Методология исследования состояла в оценке последствий воздействия на объекты исследования неблагоприятных факторов бактериальной и химической природы, которые оценивались по изменению содержания мРНК, белка, активности, локализации и спектра доступных субстратов основных представителей кальпаиновой системы (μ - и m -кальпаина), по изменению

содержания мРНК основных провоспалительных цитокинов, по уровню дофамина и его метаболитов и др.

Для выполнения поставленных задач применялись методы анализа поведения животных (тест «Открытое поле», тест «Следы»), методы выделения и частичной очистки белков, субклеточного фракционирования, различные виды электрофореза в ПААГ, иммуноблоттинг, иммунопреципитация, ПЦР в реальном времени, атомно-абсорбционная спектрометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография, иммуноферментный анализ, компьютерный анализ первичной структуры белков, арсенал методов математической статистики и др.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Под действием неблагоприятных факторов различной природы m-кальпаин высвобождается нервными окончаниями во внеклеточное пространство, где он сохраняет свою протеолитическую активность и может расщеплять ряд внеклеточных и трансмембранных белков.
2. При подавлении активности синапсомального m-кальпаина синтетическими ингибиторами интенсифицируются компенсаторные процессы, направленные на поддержание физиологического уровня внеклеточного дофамина.
3. При действии на организм бактериальных (липополисахарид) или химических ($MnCl_2$) токсинов переходное состояние от нормы к патологии характеризуется фактор-специфичным вовлечением различных изоформ кальпаинов; при развитии нейродегенеративного процесса вне зависимости от типа повреждающего действия происходит гиперактивация исключительно m-кальпаина.
4. Подавление активности m-кальпаина с помощью синтетического ингибитора Cast (184-210) способствует повышению адаптационного потенциала клеток ЦНС при действии на организм неблагоприятных факторов.

5. Повышение активности m-кальпаина в плазме крови при болезни Паркинсона является потенциальным маркером перехода с ранних на развернутые стадии заболевания.

Степень достоверности и апробации результатов

Высокая степень достоверности результатов исследований подтверждается достаточным объемом выборок и числом независимых экспериментов, выполненных с использованием современных адекватных методов исследования. Основные результаты работы были представлены на научных семинарах и заседаниях Физиологического отдела им. И.П. Павлова ФГБНУ «ИЭМ» (2011-2020); в виде устных и стендовых докладов на следующих всероссийских и международных конференциях: III Съезд физиологов СНГ (Ялта, Украина, 2011); Multidisciplinary International Neuroscience and Biological Psychiatry «Stress and Behavior» (Санкт-Петербург, 2012-2019); Всероссийская молодежная конференция "Нейробиология интегративных функций мозга" (Санкт-Петербург, 2013); Международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Крым, Россия, 2014, 2015, 2017, 2018); IV Съезд физиологов СНГ (Сочи- Дагомыс, Россия, 2014); XIII Всероссийская молодежная научная конференция института физиологии Коми НЦ УрО РАН «Физиология человека и животных: от эксперимента к клинической практике» (Сыктывкар, 2014); Международная научная конференция Научного Парка СПбГУ «Трансляционная биомедицина: современные методы междисциплинарных исследований в аспекте внедрения в практическую медицину» (Санкт-Петербург, 2015); III Всероссийская научная конференция молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2016); XXIII Съезд Российского Физиологического Общества им. И.П. Павлова (Воронеж, 2017); 16th International Symposium of Trace Elements in man and Animals (Saint Peterburg, 2017); Зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии (Рощино, 2017-2019); Юбилейный

конгресс с международным участием «Давиденковские чтения» (Санкт-Петербург, 2018); FEBS Open Bio (Прага, Чешская Республика, 2018); VI Съезд физиологов с международным участием (Сочи-Дагомыс, Россия, 2019); III Российская научно-практическая конференция «Фундаментальные и клинические аспекты нейродегенеративных заболеваний» (Ижевск, 2019).

Публикации

По теме диссертации опубликованы 28 работ, из них 14 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ, в т.ч. 9 статей в изданиях, входящих в базы данных Scopus и Web of Science.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно проведен анализ литературных источников по теме диссертации, планирование экспериментальных исследований и подбор методов для достижения поставленной цели. Экспериментальные исследования выполнялись автором лично. Обработка полученных данных, их интерпретация, написание научных статей, подготовка научных докладов и оформление работы осуществлены автором самостоятельно. Основные положения диссертации, составляющие ее новизну и практическую значимость, сформулированы автором.

Структура диссертации

Диссертация содержит разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений», «Список литературы», включающий 380 источника. Диссертация изложена на 270 страницах. Результаты и обсуждение представлены в 2 таблицах и иллюстрированы 82 рисунками.

Финансовая поддержка

Работа проводилась в рамках изучения фундаментальных основ функционирования мозга, предусмотренных платформой «Неврология» стратегии развития медицинских наук до 2025г., а именно в рамках изучения

роли провоспалительных факторов в формировании патологии ЦНС, проводимого в Физиологическом отделе им. И.П. Павлова. Материалы диссертационного исследования получены при выполнении плановых научно-исследовательских работ и отражены в отчетах НИР:

- Молекулярно-клеточные механизмы пластичности развивающегося и зрелого мозга при действии провоспалительных факторов, СПб, 2010 г;
- Молекулярно-клеточные механизмы функциональных перестроек в ЦНС при формировании минимальных мозговых дисфункций и нейродегенеративных процессов, СПб, 2013 г.;
- Нейробиологические основы формирования дисфункций мозга и пути их коррекции, СПб, 2016 г.;
- Молекулярно-клеточные механизмы формирования нейродегенеративных процессов и поиск путей их коррекции; СПб, 2019.

Работа выполнена при частичной поддержке грантов РФФИ № 12-04-31065 (2012-2013) и РФФИ №14-04-00587 (2014-2016).

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Кальпаины были впервые идентифицированы в 60-х годах XX века двумя независимыми научными группами, которые обнаружили в белковых экстрактах, приготовленных из мозга [21] или скелетных мышц [22] крысы, чувствительную к содержанию кальция в среде протеолитическую активность. В 70-х годах XX века фермент был очищен и получил название Calcium-activated neutral protease (CANP) - кальций-зависимая нейтральная протеаза, поскольку оптимум его ферментативной активности наблюдался при нейтральных значениях pH. Термин «calpain» (calcium-dependent papain like enzyme) был впервые предложен и применен Murachi в 1980 г. [23]. Вскоре было показано, что у млекопитающих протеазы семейства кальпаинов представлены двумя гомологами (степень гомологии выше 90%), характеризующимися различной потребностью к содержанию кальция в среде, необходимой для их активации [24]. На этом основании к данным гомологам были применены термины μ -кальпаин и m -кальпаин, для указания на микромолярную и миллимолярную концентрацию кальция, необходимую для их активации *in vitro* (в другой классификации это кальпаин-1 и кальпаин-2).

На сегодня уже охарактеризовано 15 членов семейства кальпаинов (кальпаин-1 – кальпаин-15). Показано, что основные представители данного семейства – μ - и m -кальпаин – являются гетеродимерами, состоящими из большой (массой примерно 80 кДа) каталитической субъединицы и общей для обоих кальпаинов малой регуляторной (массой 28 кДа) субъединицы; описана доменная организация соответствующих белков, показано наличие в их структуре нескольких EF-hand доменов, раскрыта структура активного центра; идентифицированы гены, кодирующие данные субъединицы [25]. Тем не менее, многие вопросы, касающиеся физиологических функций и механизмов регуляции активности кальпаинов, остаются дискуссионными.

1.1. Геномная организация и регуляция экспрессии генов μ -, m -кальпаина и кальпастина

Нуклеотидная последовательность и структура генов протеаз семейства кальпаинов расшифрована для многих млекопитающих. Ниже будет приведена информация относительно строения генов, кодирующих μ - и m -кальпаины человека и крысы.

Ген, кодирующий большую субъединицу μ -кальпаина человека (CAPNS 1), расположен на 11 хромосоме (11q13.1), имеет длину порядка 30 kb и состоит из 25 экзонов. Ген, кодирующий большую субъединицу m -кальпаина человека (CAPN 2) – на 1-й хромосоме (1q41), имеет длину 74 kb и содержит 22 экзона. Ген CAPN 4, кодирующий малую субъединицу кальпаинов, расположен на 19-й хромосоме (19q13.12), имеет длину 11 kb и включает 11 экзонов, причем экзон 1 и частично экзон 11 – это некодирующие последовательности; кодирующая область начинается с 16-го нуклеотида экзона 2 и заканчивается 8-м нуклеотидом экзона 11. Любопытно, что каждая из последовательностей EF-2, -3, -4 и -5 малой субъединицы кодируется определенным экзоном (7, 8, 9 и 10, соответственно) и только последовательность EF-1 – двумя (4-м и 5-м) экзонами [26].

Промоторные области генов, кодирующих каталитическую и регуляторную субъединицы кальпаинов, богаты GC повторами и содержат Sp1 (specificity protein1)-, NRF-1 (nuclear respiratory factor)-, AP-1 (activator protein 1)-связывающие сайты, причем транскрипционный фактор NRF-1 является основным транс-регулятором экспрессии гена CAPNS 1 человека [27]. Судя по данным Nata et al. (1992), инкубация клеток HeLa в присутствии 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетата, который через активацию протеинкиназы С (ПКС) действует как опухолевый промотор, вызывает значительное усиление экспрессии гена CAPN 2, но не влияет на экспрессию генов CAPN 1 и CAPNS1 [28]. Этот факт указывает на существование не только универсальных, но специфических для каждого из описанных выше генов механизмов регуляции экспрессии.

На экспрессию генов, кодирующих субъединицы кальпаинов, также могут влиять однонуклеотидные замены в промоторной области их генов. Например, показано, что замена g.-1256 A>C, ss 1917715340 в промоторной области гена CAPN 1 приводит к значительному усилению продукции μ -кальпаина в сперматозоидах [29].

Расположение генов CAPN у крысы иное. Так, ген, кодирующий большую субъединицу μ -кальпаина крысы, длиной 25 kb, находится на 1-й хромосоме (1q43) и включает 25 экзонов. Ген, кодирующий большую субъединицу m -кальпаина крысы (CAPN 2) – на 13-й хромосоме (13q26), имеет длину более 50 kb и содержит 21 экзон. Ген CAPN 4, кодирующий малую субъединицу кальпаинов крысы, расположен на 1-й хромосоме (1q21), имеет длину около 7 kb, включает 9 экзонов. Исследований, посвященных выявлению механизмов регуляции экспрессии данных генов у крысы, практически нет.

К настоящему времени проведено клонирование, секвенирование кДНК кальпастина многих млекопитающих, в том числе человека, мыши, крысы; определена аминокислотная последовательность и выявлена структура кальпастина. У человека и некоторых других млекопитающих выявлен один ген кальпастина, однако, благодаря наличию нескольких промоторов и в результате альтернативного сплайсинга, продуцируется набор изоформ кальпастина с молекулярными массами от 17,5 кДа до 172 кДа [25].

Ген, кодирующий кальпастин человека (CAST), расположен на 5 хромосоме (5q15), имеет длину порядка 254 kb и состоит из 36 экзонов. Согласно данным UniProt, было обнаружено десять различных транскриптов кальпастина человека длиной от 590 до 791 аминокислот, являющихся продуктами альтернативного сплайсинга и имеющих различную тканеспецифичность. Активно изучаются однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) в гене CAST. Показано, что SNP rs4434401 (T>C) в позиции 96.039.025 положительно ассоциирован с развитием кератоконуса (дегенеративного заболевания глаз) с отношением шансов 1,92 [30]. Кроме этого, в гене CAST

человека была обнаружена нонсенс мутация с.544G>T (p.Glu182*), ассоциированная с развитием лейкохинии [31].

Ген, кодирующий кальпастан крысы, расположен на 2 хромосоме (2q11), имеет длину порядка 110 kb и состоит из 32 экзонов. Уже в 90-х годах XX века для гена кальпастана крысы была определена полная нуклеотидная последовательность кодирующей области; показано наличие одной рамки считывания, с которой считывается полипептид длиной 603 аминокислоты (полипептиды, соответствующие кальпастану других млекопитающих, значительно длиннее, например, кальпастан человека состоит из 694 аминокислот, а мыши – 788 аминокислот). Сравнение аминокислотной последовательности кальпастана крысы с последовательностями других млекопитающих показало, что гомология составляет около 60%. Было выявлено наличие в аминокислотной последовательности кальпастана крысы трех делеций по 30-40 аминокислотных остатков [32]. Позже, согласно данным UniProt, обнаружено три различных транскрипта кальпастана крысы длиной 713, 690 и 675 аминокислот, являющихся продуктами альтернативного сплайсинга [33]. В этих последовательностях отсутствуют аминокислоты, соответствующие 3-му экзону, которые участвуют в связывании кальпастана с плазматической мембраной [34]. Следовательно, субклеточная локализация кальпастана крысы и кальпастана других млекопитающих может различаться.

1.2. Доменная организация кальпаинов

Аминокислотная последовательность и кристаллическая структура кальпаинов была определена уже достаточно давно. Первыми кристаллизованы m-кальпаины крысы и человека [35, 36]. Благодаря этим исследованиям стало возможным определение границ функциональных доменов m-кальпаина, а после – и других представителей семейства кальпаинов.

Как уже было сказано выше, *m*-кальпаин является гетеродимерным белком, состоящим из двух субъединиц: каталитической (молекулярная масса *m*-кальпаина человека составляет 79,9 кДа, аминокислотная последовательность насчитывает 821 аминокислоту) и регуляторной (молекулярная масса 28 кДа, 268 аминокислот). Обе субъединицы имеют доменную структуру. В составе каталитической субъединицы μ - и *m*-кальпаинов выделяют от 4-х до 6 доменов [37, 38]. Согласно данным, полученным в серии работ Suzuki с коллегами, большая субъединица μ - и *m*-кальпаинов состоит из четырех доменов (I-IV).

Домен I находится в N-концевой части каталитической субъединицы; 19 N-концевых аминокислотных остатка этого домена образуют альфа-спираль и необходимы для заякоривания большой и малой субъединицы кальпаинов путем его взаимодействия с VI доменом. Позже было показано, что C-концевая часть домена I относится к коровой (протеолитической) части протеазы, к которой ранее относили только домен II, что потребовало выделения этой области в отдельный домен. Однако для того, чтобы избежать изменения уже устоявшейся к тому времени нумерации доменов, были введены обозначения «домен IIa» и «домен IIb» [38].

Домен II (каталитический домен) содержит остатки Cys, His, Asn, которые составляют каталитическую триаду, характерную для цистеиновых протеаз, таких как папаин, бромелаин, катепсины В и Н. Домен IIa содержит Cys в положении 115 (для μ -кальпаина человека) или 105 (для *m*-кальпаина человека), а два других члена каталитической триады – His в положении 272 (μ -кальпаин человека) или в положении 262 (для *m*-кальпаина человека) и Asn-296 (μ -кальпаин человека) или в положении 286 (для *m*-кальпаина человека) - находятся в домене IIb. Согласно данным кристаллографических исследований в безкальциевой среде остаток Cys-105 *m*-кальпаина человека находится на расстоянии 10 Å от остальных остатков, образующих каталитическую триаду (остатков His-262 и Asn-286), что исключает образование функционального комплекса протеазы. Следовательно, должны

существовать механизмы «сближения» этих остатков. Действительно, в доменах Па и Пб были выявлены Ca^{2+} -связывающие мотивы длиной 8 и 9 аминокислотных остатков, не относящиеся к EF-hand мотивам; связывание этими мотивами ионов кальция, согласно данным [39], приводит к формированию активной каталитической триады. Кроме этого, анализ аминокислотной последовательности позволяет предположить наличие на С-конце Пб домена потенциального кальций-связывающего EF-hand домена, также вовлеченного в процесс активации протеазы. Более подробно возможные механизмы регуляции активности кальпаинов будут обсуждены ниже.

В отличие от домена I, для которого степень гомологии для человека, крысы, цыпленка и кролика составляет 72-86%, для домена II она уже 85-93%, причем последовательность Ca^{2+} -связывающих мотивов у млекопитающих и птиц полностью идентична [39]. В совокупности эти данные свидетельствуют о высокой консервативности каталитического домена и необходимости связывания кальция для активации протеазы.

Домен III служит связующим звеном между каталитическим доменом и доменом IV; содержит в своей структуре бета-сэндвич, состоящий из 8 бета-цепей, образующих C2-подобный (C2L – C2-like) мотив, который даже получил название Calpain-type beta-sandwich (CBSW) домен (calpain.net/3dstructure). Этот домен впервые был обнаружен у ПКС, для которой было показано, что он выполняет функцию Ca^{2+} -зависимого мембранного якоря и обеспечивает взаимодействие киназы с фосфолипидами плазматической мембраны, приводящее к активации киназного домена [40, 41]. Аналогичная функция этого домена была показана и для кальпаинов: за счет C2L домена реализуется кальций-зависимое связывание кальпаинов с плазматической мембраной, облегчающее процесс активации протеазы [42]. Кроме этого, показана возможность электростатического взаимодействия между кластером основных аминокислот домена Пб и кислых - домена III,

причем ослабление данного взаимодействия средствами сайт-направленного мутагенеза приводит к «облегчению» активации кальпаинов [42].

Домен IV. Аминокислотная последовательность этого домена гомологична кальмодулину (Ca^{2+} -связывающий белок эукариот), содержит пять Ca^{2+} -связывающих EF-hand мотивов и, следовательно, относится к PEF (penta-EF-hand) доменам. Четыре из указанных выше EF-hand мотива способны связывать кальций, а последний – нет, но он, как и домен I, обеспечивает ассоциацию большой и малой субъединицы протеазы за счет взаимодействия с доменом VI [43]. Интересно, что активность рекомбинантного μ -кальпаина, лишённого IV домена, не зависит от содержания кальция в среде, а его замена на IV домен m -кальпаина приводит к увеличению сродства к ионам кальция и восстанавливает зависимость активности протеазы от содержания кальция в среде [44, 45]. Межвидовая гомология аминокислотной последовательности, соответствующей этому домену, составляет около 90%.

Домен V является N-концевым доменом малой регуляторной субъединицы кальпаинов. Аминокислотная последовательность, соответствующая этому домену, чрезвычайно богата глицином. Например, в составе малой субъединицы кальпаинов человека из 268 аминокислот – 51 остаток глицина, причем в цепи подряд расположено два кластера, состоящих из 11 и 20 остатков глицина. Следовательно, данный домен является гидрофобным, и, вероятно, участвует в связывании малой субъединицы кальпаинов с фосфолипидами плазматической мембраны. Данная гипотеза находит подтверждение в работе Dennison SR с коллегами (2005). Они показали, что связывание с мембраной происходит за счет образующего альфа-спираль мотива GTAMRILGGV, следующего сразу за вторым глициновым кластером, а сам кластер лишь стабилизирует данное взаимодействие [46]. Эта область характеризуется высокой степенью межвидовой гомологии (от 93% до 100%), что свидетельствует о крайней необходимости описанных выше мотивов для нормального

функционирования протеаз семейства кальпаинов. В более поздних исследованиях на 16 хромосоме человека в локусе 16q12.2 был обнаружен безынtronный ген, кодирующий повсеместно экспрессирующуюся «неклассическую» малую субъединицу кальпаинов (CSS2 – calpain small subunit 2), состоящую из 248 аминокислот. Затем продукция данного пептида была обнаружена и у других млекопитающих. Этот пептид, в отличие от классической малой субъединицы, не содержит мотивы из 11 и 20 остатков глицина и, как следствие, в слабой степени связывается с каталитической субъединицей кальпаинов [47, 48].

Через полипролиновый линкер домен V соединяется с доменом VI, который гомологичен домену IV каталитической субъединицы и также содержит пять EF-hand мотивов [49]. Данный домен, как уже сказано выше, вовлечен в процесс ассоциации большой и малой субъединиц кальпаинов, которая обеспечивается пятью EF-hand мотивами каждого из доменов. С этим же доменом взаимодействует N-концевой участок домена I.

Для всех известных изоформ кальпастина также характерна доменная организация. Считается, что молекула кальпастина состоит из N-концевого L-домена, размер которого варьируется, благодаря альтернативному сплайсингу, и четырех повторяющихся доменов (I - IV) протяженностью 140 аминокислотных остатков. В свою очередь, каждый домен состоит из трех высококонсервативных субдоменов, обозначаемых А, В и С [25]. Для кальпастина некоторых млекопитающих, например, для кальпастина быка, показано наличие дополнительного XL-домена. Ранее считалось, что наличие этого домена не характерно для грызунов, однако в 2007 г. вариант молекулы кальпастина, содержащий XL-домен был обнаружен и у крысы [33]. L-домен участвует в связывании кальпастина с мембраной и не обладает ингибиторной активностью. Ингибиторные свойства кальпастина определяются субдоменом В, а субдомены А и С в присутствии ионов Ca^{2+} связываются с IV и VI доменами кальпаина соответственно, и увеличивают ингибиторную активность субдомена В. В составе субдомена В содержится

высококонсервативная последовательность LGXK(R)D(E)XYIPXRXLL, которая, определяет ингибиторные в отношении кальпаинов свойства кальпастатина, но сама по себе она обладает низкой ингибиторной активностью [34].

1.3. Регуляция активности кальпаинов

В отсутствие ионов кальция в среде аминокислотные остатки, образующие каталитическую триаду кальпаинов (для μ - кальпаина – это Cys-115, His-272 и Asn-296), находятся на значительном расстоянии друг от друга (около 10 Å), что делает невозможным депротонизацию тиола цистеина остатком гистидина и, как следствие, протеаза находится в неактивном состоянии.

Еще до получения данных рентгеноструктурного анализа на основании аминокислотной последовательности кальпаинов был предложен следующий механизм активации протеаз данного семейства: связывание Ca^{2+} EF-hand мотивами, находящимися в С-концевой части регуляторной и каталитической субъединицы кальпаинов, вызывает конформационные перестройки в структуре димера; в результате таких перестроек от N-конца каталитической субъединицы автолитически отщепляются первые 19 аминокислотных остатков (домен I); аминокислотные остатки, образующие каталитическую триаду, сближаются; протеаза переходит в активное состояние.

В конце 80-х годов XX-го века было получено частичное экспериментальное подтверждение описанного выше механизма, а также показано, что скорость автолиза μ -кальпаина прямо пропорциональна концентрации самой протеазы и обратно пропорциональна концентрации продуктов протеолитического расщепления ее субстратов [50]. Таким образом, уже к этому времени не оставалось сомнений, что активация кальпаинов *in vitro* происходит исключительно в присутствии ионов кальция в среде, причем в достаточно большой «нефизиологической» их концентрации, что оставляет открытыми множество вопросов о регуляции

активности кальпаинов. Поэтому в дальнейшем каждое звено в описанной выше гипотетической схеме активации кальпаинов будет подвергнуто сомнению и не найдет 100% экспериментального подтверждения.

В первую очередь был подвергнут сомнению тезис о конформационных перестройках в структуре кальпаинов после связывания Ca^{2+} EF-hand мотивами, находящимися С-концевой части регуляторной и каталитической субъединицы. Подобные перестройки характерны для кальмодулина, но, как оказалось, не для кальпаинов. С помощью создания рекомбинантного μ -кальпаина крысы, лишённого EF-hand мотивов, было показано, что для активации такого модифицированного кальпаина достаточно связывания кальция двумя Ca^{2+} -связывающими мотивами в доменах IIa и IIb. При этом для формирования активного центра наличие EF-hand мотивов не является обязательным. Однако активность модифицированного μ -кальпаина была несколько ниже, чем у кальпаина дикого типа, что авторы связывают с отсутствием в его структуре III-го домена, который необходим для «стабилизации» протеазы в активированном состоянии [39]. Позднее авторы данного исследования выдвинули гипотезу о двухстадийном процессе активации кальпаинов. На первой стадии происходят конформационные изменения в доменах IV и VI, способствующие диссоциации N-концевого якорного пептида от малой субъединицы; затем происходят конформационные изменения в домене III, возможно, малая субъединица диссоциирует от большой; якорный пептид отщепляется путем автолиза. На второй стадии происходит перестройка активного центра протеазы, вызванная связыванием ионов кальция с Ca^{2+} -связывающими мотивами в доменах IIa и IIb [51]. Однако остается неразрешенным вопрос о механизмах инициации конформационных изменений в доменах IV и VI и о роли EF-hand мотивов в процессе активации протеаз данного семейства. Исследований, посвященных этому вопросу, немного. В одном из них было показано, что именно связывание Ca^{2+} со вторым EF-hand мотивом на малой субъединице кальпаинов, структурно расположенного напротив якорного участка домена I,

вызывает отталкивание положительно заряженных аминокислот в его составе, тем самым облегчая диссоциацию якорного пептида от малой субъединицы [52]. Также показана возможность распространения конформационных перестроек от EF-hand мотивов IV домена через линкерный пептид на Pb домен и C2L мотив, которые обеспечивают стабилизацию протеазы в активном состоянии [53]. Возможно и прямое влияние. Например, связывание Ca^{2+} третьим EF-hand мотивом на большой субъединице нарушает электростатическое взаимодействие между Glu-626 и Lys-629 с последующим формированием водородной связи между Lys-629 и Pe-446 в составе C2L мотива. Такая перестройка способствует дополнительной стабилизации активного центра протеазы [54]. Вероятнее всего, функция EF-hand мотивов состоит в обеспечении дополнительного уровня защиты протеаз от случайной или чрезмерной активации.

В ряде работ было показано, что протеолитическая активность μ - и m -кальпаина регулируется за счет их ассоциации с фосфолипидами плазматической мембраны. Например, μ -кальпаин, выделенный из скелетных мышц, «требовал» 40-50 мкМ Ca^{2+} для полумаксимальной скорости протеолиза своего субстрата - казеина; 140-150 мкМ Ca^{2+} для полумаксимальной скорости автолиза в присутствии 80 мкМ фосфатидилинозитола и 190-210 мкМ Ca^{2+} - для полумаксимальной скорости автолиза в отсутствие фосфолипидов. Для m -кальпаина, выделенного из скелетных мышц крупного рогатого скота, требовалось 700-740 мкМ Ca^{2+} для полумаксимальной скорости протеолиза казеина, 370-400 мкМ Ca^{2+} - для полумаксимальной скорости автолиза в присутствии 80 мкМ фосфатидилинозитола и 740-780 мкМ Ca^{2+} - для полумаксимальной скорости автолиза в отсутствие фосфолипидов. Исходя из этих данных, вероятнее всего, m -кальпаин функционирует в автолизованной, а μ -кальпаин - в неавтолизованной форме, а фосфолипиды, в первую очередь, «снижают» концентрацию Ca^{2+} , необходимую для автолиза [55]. Последующие исследования показали, что комбинация фосфатидилинозитола с различными

ганглиозидами, цереброзидами и сульфатидами более эффективно снижает концентрацию Ca^{2+} , необходимую для активации μ -кальпаина, максимальное снижение наблюдалось при использовании комбинации GD1a (100 мкМ) и цереброзида (750 мкМ) [56]. Однако механизмы наблюдаемого в эксперименте снижения потребности кальпаинов в Ca^{2+} раскрыты не были. Ясно было одно - для того, чтобы активироваться при взаимодействии с мембраной, кальпаины должны иметь возможность связаться с ней при более низкой концентрации Ca^{2+} , чем она требуется для их активации.

Для выявления Ca^{2+} -зависимых механизмов связывания кальпаинов с мембраной были использованы рекомбинантные кальпаины с нарушенной структурой активного центра или не способные к автолизу, но претерпевающие аналогичные с немодифицированной молекулой конформационные изменения; анализировалось их взаимодействие с липосомами. Оказалось, что взаимодействие μ -кальпаина с мембраной обусловлено увеличением гидрофобности молекулы, наблюдаемой во время активации протеазы. Константа диссоциации (K_d) образуемого белок-липидного комплекса близка к K_d , характерной для ПКС, имеющей в своей структуре С2 домен, что указывает на участие в образовании белок-липидного комплекса С2L домена кальпаинов [57]. Предложенный механизм взаимодействия кальпаинов с мембраной позволяет также объяснить выявленную ранее способность μ -кальпаина встраиваться в мембраны органелл подобно интегральным мембранным белкам [58].

Делеция V домена в структуре μ -кальпаина человека приводит к 10-ти кратному снижению способности протеазы связываться с плазматической мембраной, а аминокислотные замены в «кислой» петле III-го домена, содержащего С2L-мотив, напротив, никак не отражаются на аффинности данной протеазы к плазматической мембране, но снижают потребность в Ca^{2+} , необходимой для активации протеазы [57, 59]. Вероятнее всего, взаимодействие кальпаинов с мембраной не способствует активации кальпаинов, а лишь является механизмом стабилизации или же

концентрирования нескольких активированных молекул кальпаинов для облегчения протеолитического расщепления связанных с мембраной субстратов

Отдельного обсуждения требует роль **автолиза** в процессе активации кальпаинов. Существует ряд исследований, убедительно показывающих, что автолитическое отщепление N-концевого домена (домена I) от каталитической субъединицы μ - или m -кальпаина существенно снижает концентрацию Ca^{2+} , необходимую для активации этих протеаз (например [55, 60] и мн. др.). Однако следует отметить, что сайт автолитического расщепления в значительной мере удален от активного центра протеазы, и поэтому в процесс его отщепления неизбежно должна вовлекаться еще одна молекула μ - или m -кальпаина, а для этого она должна быть активирована. Этот факт ставит под сомнение гипотезу об автолизе как необходимом звене процесса активации кальпаинов. Предполагается, что автолиз происходит при выделении и очистке кальпаинов, когда в условиях *in vitro* искусственно достигается высокая концентрация протеазы, а в физиологических условиях автолиз либо вообще не происходит, либо имеет другое функциональное значение.

За последние 20-30 лет были накоплены данные, подтверждающие и опровергающие данную гипотезу. К первой группе исследований относятся следующие. В 1997 году с помощью сайт-направленного мутагенеза был получен не способный к автолизу, но проявляющий протеолитическую активность, m -кальпаин [61]. Позже появились данные, что неавтолизированный кальпаин является активной протеазой [62], а процессы активации и автолиза протекают абсолютно независимо [63]. Более того, за счет домена I осуществляется взаимодействие большой и малой субъединицы кальпаинов и, строго говоря, пока эти субъединицы ассоциированы, сайт автолитического расщепления защищен от гидролиза и становится доступным (но не обязательно отщепленным) для протеаз только после диссоциации каталитической и регуляторной субъединицы. При такой последовательности событий (отсутствие необратимого протеолитического отщепления якорного

пептида) существует вероятность многократных циклов ассоциации-диссоциации этих субъединиц, что может рассматриваться как еще один механизм регуляции активности кальпаинов [54]. Однако эта гипотеза оспаривается рядом авторов. Например, показано, что в присутствии ионов кальция в концентрации достаточной для активации протеазы (в отсутствие в среде кальпастина) обе субъединицы μ -кальпаина остаются ассоциированы друг с другом [53, 64].

Во второй серии работ убедительно показано наличие автолизованного кальпаина не только *in vitro*, но и *in vivo*. Например, инкубация в течение 5 минут эритроцитарного μ -кальпаина человека в безсубстратном растворе, содержащем 100 мкМ Ca^{2+} , приводила к образованию путем автолиза укороченной каталитической субъединицы с молекулярной массой 75 кДа, а при увеличении времени инкубации до 20 минут ее содержание снижалось, причем добавление в инкубационную среду рекомбинантного кальпастина, лишённого ингибиторной активности в отношении μ -кальпаина, отменяло последний эффект [65]. Эти же авторы в лизатах клеток менингиомы человека, полученных при оперативном удалении опухолей, в шести из девяти образцов обнаружили полноразмерную 80кДа субъединицу и ее автолизованную 75 кДа форму в различных соотношениях; в трех образцах присутствовала только полноразмерная молекула [65]. Следовательно, автолитическое расщепление каталитической субъединицы μ -кальпаина происходит *in vivo*, причем в зависимости от условий (в том числе от содержания эндогенного кальпастина и/или его особой формы, лишённой ингибиторной активности) интенсивность данного процесса меняется. Таким образом, автолитическое расщепление каталитической субъединицы кальпаинов, несомненно, имеет определенное, но еще не до конца изученное физиологическое значение. Например, обсуждается, что именно с автолизованной формой кальпаина связывается «особая», лишённая ингибиторной активности молекула кальпастина, тем самым, препятствуя деградации активного кальпаина [66].

В ряде работ конца XX века описываются молекулы, которые могут в условиях *in vivo* «повышать» активность кальпаинов. Среди них выделяют: изовалерилкарнитин; термостабильный 45кДа-пептид, выделенный из нейтрофилов человека; 45кДа белок-активатор, выделенный из эритроцитов, а также Ацетил-КоА связывающий белок, UK114-подобный белок, ФРФ и др., в том числе, как это не парадоксально, и кальпастатин [25]. Эти белки условно можно разделить на две группы: белки, снижающие потребность кальпаина в Ca^{2+} , необходимой для активации, и белки, увеличивающие каталитическую активность кальпаина, но не влияющие на требуемую для активации концентрацию Ca^{2+} . К белкам первой группы, например, относят ацил-КоА связывающий белок, который снижает Ca^{2+} потребность кальпаина до 6-7 μM , а к белкам второй группы - эпидермальный фактор роста фибробластов (ФРФ) и BDNF, чьи эффекты опосредуются через ERK-киназу, фосфорилирующую Ser-50 в составе m-кальпаина [67, 68]; к обратному эффекту (подавлению активности кальпаина) приводит фосфорилирование Ser-369 и Thr-370 ПКА [69], причем описанные выше эффекты были характерны только для m-кальпаина. На сегодняшний день идентифицировано 8 сайтов фосфорилирования для m- и 9 – для μ -кальпаина, которые сгруппированы в двух областях молекулы: на границе доменов I и IIa (в положении 77-81 для μ -кальпаина и в положении 50, 66-70 - для m-кальпаина); в домене IIb (в положении 360-380 для μ -кальпаина и в положении 316-370 для m-кальпаина). Это сайты фосфорилирования для ПКА, ПКС, ПКГ, ККИ, ERK [70]. Однако физиологическое значение фосфорилирования показано не для всех сайтов. Кроме сайтов, о которых говорилось выше (Ser-50, Ser-369 и Thr-370), существуют данные о том, что дефосфорилирование молекулы μ -кальпаина щелочной фосфатазой облегчает автолитическое расщепление протеазы и увеличивает скорость ее деградации [70, 71]. Таким образом, как минимум для одного класса белков-активаторов кальпаина характерен механизм действия посредством введения посттрансляционных модификаций, таких как фосфорилирование.

Еще один механизм повышения активности кальпаинов - без влияния на потребность протеазы в Ca^{2+} - был показан для БТШ 90. Оказалось, что БТШ 90 образует комплекс с μ -кальпаином (но не m -кальпаином), причем последний при этом сохраняет свою активность, так как каталитическая триада не участвует в ассоциации. Однако образование этого комплекса препятствует взаимодействию μ -кальпаина с кальпастатином, следовательно, возникновение комплекса μ -кальпаин-БТШ 90 предотвращает ингибирование протеолитической активности даже в присутствии высоких концентраций кальпастина [72].

Основным эндогенным регулятором активности кальпаинов, как уже было сказано выше, является кальпастин. Связывание кальпаина с кальпастином происходит при физиологической концентрации ионов Ca^{2+} , а значит кальпастин может связаться с неактивированным кальпаином, что и было обнаружено Melloni E с коллегами [73]. Следовательно, должен существовать механизм поддержания кальпаина в активном состоянии в присутствии кальпастина. Обсуждается ряд возможных механизмов регуляции кальпаин-кальпастинового взаимодействия, однако общепринятого мнения на этот счет не существует.

Для эффективного подавления активности кальпаинов необходимо, чтобы кальпастин связался с молекулой кальпаина по трем сайтам: субдомен А кальпастина - с доменом IV кальпаина (Ca^{2+} -зависимым образом), субдомен С - с доменом VI кальпаина (Ca^{2+} -зависимым образом), субдомен В - с близкой к активному центру областью кальпаина [25]. Однако синтетические пептиды, соответствующие субдоменам А и С, не обладают ингибиторной активностью, не влияют на степень автолиза кальпаина, но влияют на способность кальпаина связываться с клеточной мембраной и, тем самым, регулируют протеолитическую активность. Показано, что одна молекула кальпастина может ингибировать до четырех молекул μ -кальпаина [74]; при этом наиболее выраженное ингибирование μ -кальпаина кальпастином проявляется для протеазы, фосфорилированной ПКА [75].

Интересный факт был обнаружен Томра с сотрудниками [76]: синтетические пептиды, соответствующие субдоменам А и С кальпастина, напротив, оказались способны активировать μ -кальпаин эритроцитов человека и m -кальпаин крысы. Поскольку известно, что кальпастин подвергается протеолитическому расщеплению некоторыми протеазами, в том числе и кальпаином [77], авторы считают, что фрагменты кальпастина могут образовываться в клетке *in vivo* и активировать кальпаин.

Недавно *in vivo* обнаружили особую форму кальпастина с усеченным L доменом, который авторы обозначили как L-DOM-кальпастин [33]. Было показано, что эта форма кальпастина связывается с неавтолизированной (80 кДа) каталитической субъединицей кальпаина в отсутствие ионов кальция в среде. При инкубации автолизированного μ -кальпаина (75 кДа) с неавтолизированным (80 кДа) в присутствии 5 мкМ Ca^{2+} (этого недостаточно для автолиза μ -кальпаина, но достаточно для поддержания автолизированного μ -кальпаина в активном состоянии) наблюдается постепенная деградация молекулы кальпаина 80 кДа без активации протеазы. Если же в инкубационной смеси заменить неавтолизированный кальпаин на комплекс, то деградации 80 кДа- μ -кальпаина под действием 75 кДа μ -кальпаина не происходит. Следовательно, в присутствии относительно низкой концентрации кальция в среде L-DOM-кальпастин предотвращает деградацию неавтолизированного μ -кальпаина, увеличивая тем самым клеточный «запас» способного к активации кальпаина [65].

Таким образом, к настоящему времени накоплены данные об участии в регуляции активности кальпаинов ионов Ca^{2+} , белков-активаторов, кальпастина, фосфолипидов плазматической мембраны клетки и мембран ее органелл; предложен ряд гипотетических механизмов регуляции активности кальпаинов, однако остается неясным, насколько близок к истине каждый из них.

1.4. Субстратная специфичность кальпаинов

Считается, что физиологическая роль кальпаинов полностью определяется их способностью к протеолизу. На сегодняшний день идентифицировано более 100 белков-субстратов кальпаина. Среди них транскрипционные факторы, трансмембранные рецепторы, различные ферменты, белки цитоскелета, синаптосомальные белки. Некоторые субстраты подвергаются полной деградации под действием кальпаинов, а большинство – ограниченному протеолизу. В результате такого протеолиза образуются стабильные белковые фрагменты, которые теряют свойства целой молекулы и приобретают новые, иногда противоположные функции [78].

Если аминокислотные остатки, образующие пептидную связь, расщепляемую кальпаинами, представить в виде $p_4-p_3-p_2-p_1-p_1'-p_2'-p_3'-p_4'$, то, согласно первоначальным исследованиям, кальпаины предпочтительно расщепляют пептидные связи с лейцином или валином в p_2 положении. Однако в более поздних работах продемонстрирован лишь косвенный «эффект» аминокислотного остатка субстрата на специфичность кальпаинов: расщепление происходит и по отрицательно заряженным, и по положительно заряженным, и по полярным аминокислотным остаткам. Еще в 1997 году была проведена серия исследований с помощью метода сайт-направленного мутагенеза, когда в положение p_2 альфа II спектрина поочередно вводили 20 протеиногенных аминокислот: введение аргинина, валина или аланина в положение p_2 способствовало, а аспарагиновой кислоты, пролина и гистидина – препятствовало расщеплению данного субстрата m-кальпаином. При этом отмечалось, что в первом случае замены приводили к разрушению третичной структуры субстрата, а во втором, напротив, - к ее стабилизации. Следовательно, специфичность протеолиза обеспечивается не первичной структурой субстрата, а наличием у него определенной конформации [79]. Тем не менее, некоторые «предпочтения» в отношении аминокислотного состава субстрата в области его расщепления кальпаинами были обнаружены. Например, в позиции p_3 предпочтительно нахождение фенилаланина /

триптофана/ лейцина/ валина, p2 – лейцина/ валина, p1 – аргинина/ лизина, p1' – аргинина/ лизина/ лейцина. Мета-анализ работ, посвященных субстратной специфичности кальпаинов, позволил построить позиционно весовую матрицу (ПВМ) для аминокислотных остатков p30-p30' [80]. С использованием ПВМ была предсказана наиболее оптимальная последовательность аминокислот в позиции p5-p3': PF[F(> L > P)][L(> V)][L/F]-|- [M(> A > R)]E[R(> K)], где «|» - сайт расщепления [81]. Оказалось, что такой пептид (PLFAER) расщепляется μ -кальпаином в 18 раз быстрее, чем пептид, соответствующий сайту расщепления в молекуле альфа-спектрина (EVYGM), и в 300 раз быстрее, чем синтетический субстрат, используемый для определения активности кальпаинов (SLY-MCA). Парадоксально, но эта «идеальная» для субстрата кальпаинов последовательность в базах данных эукариотических белков не найдена. Поэтому позже на его основе с целью определения активности кальпаинов *in vivo* были разработаны два олигопептида, которые расщеплялись μ - и m -кальпаином, но не трипсином, химотрипсином, катепсином и каспазами [82, 83].

С целью выявления субстратной специфичности кальпаинов была создана библиотека уже выявленных субстратов кальпаинов. На основании анализа этой библиотеки синтезировали флуоресцентный олигопептид – субстрат кальпаинов (H-E(EDANS)PLFAERK (DABCYL)-OH), который используют для анализа активности кальпаинов [84].

Также были предприняты попытки выявить закономерности аминокислотного состава субстратов кальпаина, основываясь на 3D-структуре кальпаинов. Однако такой метод, как оказалось, позволяет анализировать только сайты p4', p5', p7' и p9'. Еще один подход к поиску специфических для кальпаинов сайтов расщепления основан на анализе взаимодействия кальпаинов и кальпастина с применением метода машинного обучения. Он оказался весьма успешным. Полученные данные обобщены и суммированы в [81].

Позже для этих же целей был применен метод Поиска количественных соотношений структура-свойство (совместное использование методов математической статистики и машинного обучения для решения задачи классификации). Авторы тестировали синтетические двадцатичленные олигопептиды, соответствующие p_{10} - p_{10}' , и обнаружили 483 последовательности, которые расщеплялись кальпаинами, 360 из них были выявлены впервые [85].

Также исследовалась специфичность действия μ - и m -кальпаина, и было показано полное совпадение продуктов протеолиза μ - и m -кальпаином альфа-тропомиозина и бета-казеина, но скорость образования этих продуктов зависела от вида протеазы [86]. Однако на степень расщепления субстратов кальпаинами влияет наличие посттрансляционных модификаций. Например, фосфорилирование тропонина I ПКА снижает чувствительность к действию μ -кальпаина, а фосфорилирование этого же субстрата ПКС, напротив, увеличивает чувствительность [87].

Таким образом, нет убедительных данных о структуре канонической последовательности расщепления кальпаинами. Данные о наличии в структуре белка сайта расщепления кальпаинами, полученные с помощью методов *in silico*, носят выраженный вероятностный характер и требуют дополнительного экспериментального подтверждения. Однако в основе недавно разработанных алгоритмов лежат методы математической статистики, имеющие высокую предсказательную силу, что позволяет опираться на полученные с их помощью данные при построении гипотетических схем.

1.5. Тканевая локализация кальпаинов

Кальпастатин, μ -кальпаин или m -кальпаин обнаруживаются во всех типах клеток млекопитающих, но их соотношение варьирует в зависимости от типа клетки. Например, в некоторых клетках присутствует только одна из протеаз и кальпастатин: эритроциты и тромбоциты человека не содержат μ -

кальпаина, но в них продуцируется m-кальпаин и кальпастатин, а в тромбоцитах быка и крысы выявляется только μ -кальпаин и кальпастатин (для обзора [25]). Кальпаины и кальпастатин обнаруживаются в лимфоидных клетках, причем в активированных T-клетках человека преобладает m-кальпаин [88]. Клетки почек, селезенки, скелетных мышц крысы и других млекопитающих содержат приблизительно равные количества μ - и m-кальпаина; в клетках сердечной мышцы преобладает m-кальпаин и кальпастатин, гладкие мышцы тоже практически не содержат μ -кальпаина [89, 90]. Высокий уровень кальпаинов и кальпастатина выявлен в клетках плаценты млекопитающих, а также в яйцеклетках и сперматозоидах [91].

Особый интерес вызывает распределение кальпаинов и кальпастатина в различных отделах ЦНС млекопитающих. Работ, посвященных этой теме, довольно много, в них исследуется представленность компонентов кальпаиновой системы на уровне или мРНК, или белка, или активности протеаз методами различной чувствительности и специфичности. Однако ни в одном из обнаруженных в базе NCBI исследований на всех уровнях одновременно (мРНК, белок, активность) кальпаины не исследовались. В работе Li et al. (1995) у мышей в гиппокампе, коре головного мозга, мозжечке и в спинном мозге анализировали исключительно уровень мРНК μ - и m-кальпаина. Оказалось, что максимальное содержание обеих протеаз наблюдается в клетках спинного мозга; высокий уровень мРНК m-кальпаина обнаруживался в клетках Пуркинье мозжечка; в клетках коры и гиппокампа уровень мРНК μ - и m-кальпаина было примерно одинаковым [92]. С помощью метода гибридизации *in situ* проанализировано распределение мРНК кальпаинов в мозге крысы. Оказалось, что для клеток коры характерная слабая продукция мРНК m-кальпаина, а в клетках гиппокампа, голубого пятна и клетках Пуркинье мозжечка продукция данной протеазы была от слабой до умеренной. В среднем и заднем мозге мРНК m-кальпаина детектировалась преимущественно в красном ядре и в большинстве ядер черепных нервов. В сером веществе спинного мозга уровень мРНК m-кальпаина был слабым, а в

нейронах передних рогов – высоким [93]. В другой работе уже методом ОТ-ПЦР был определен уровень мРНК μ - и m -кальпаина в стволе, мозжечке, коре и спинном мозге крыс линии Спрег-Доули. Максимальное содержание мРНК обоих кальпаинов наблюдалось в клетках спинного мозга, а минимальное – в коре, при этом только в стволе и в спинном мозге отношение мРНК μ -кальпаин/мРНК m -кальпаин было больше единицы [94].

Одновременно на уровне белка (методом Вестерн блоттинга) и мРНК (методом ОТ-ПЦР) содержание кальпаинов и кальпастина в целом мозге крысы в онтогенезе анализировалось в работе Li Y с коллегами (2009). Оказалось, что с E18 до P90 содержание μ -кальпаина и кальпастина увеличивается на 75%, причем максимальная скорость их нарастания наблюдается с P10 до P20. При этом уровень мРНК m -кальпаина в указанный выше период не изменялся [95]. На взрослых животных методами иммуногистохимии показано наличие μ -кальпаина в клетках Пуркинье, пирамидальных нейронах гиппокампа и нейронах неокортекса, при этом m -кальпаин был наиболее представлен в клетках глии [96]. В работе Friedrich P с коллегами в мозге крысы методом иммуногистохимии анализировалось содержание двух изоформ малой субъединицы кальпаинов – CSS1 и CSS2. CSS1 выявлялась в перикариальной области, а CSS2 – в аксонах пирамидальных нейронов гиппокампа и нейронов гранулярного слоя зубчатой извилины [48].

Общепризнано, что кальпаины и кальпастин локализируются исключительно внутриклеточно [25], но субклеточная локализация m - и μ -кальпаина различна и зависит от типа клетки и ее функционального состояния. Например, в нейронах μ -кальпаин обнаруживается в дендритах и теле клетки, а m -кальпаин - в аксонах [96]. Однако в более поздних исследованиях показано, что и μ - и m -кальпаин выявляются в области постсинаптического уплотнения и в дендритных шипиках нейронов [97, 98].

Внутриклеточная локализация кальпаинов, согласно данным нескольких исследовательских групп, меняется в зависимости от

функционального состояния клетки. При некоторых условиях кальпаины визуализируются диффузно в цитоплазме, или вблизи плазматической мембраны, или вблизи мембран органелл, или же присутствуют в детергент-устойчивых сигнальных доменах плазматической мембраны – рафтах [88]. Например, на клетках COS7 (фибробластоподобные клетки почек африканской зеленой мартышки) показано, что в отсутствие каких-либо внешних воздействий кальпаины и кальпастины диффузно распределены в цитоплазме; после обработки клеток ионофором кальция кальпаин обнаруживается вблизи плазматической мембраны, а локализация кальпастина не меняется [99]. В Т-лимфоцитах человека, активированных различными фармакологическими агентами, также выявлено перемещение активированного кальпаина из цитоплазмы к плазматической мембране [100].

Несмотря на то, что способность компонентов кальпаиновой системы к перемещению внутри клетки уже давно описана, пространственно-временные аспекты регуляции этой «миграции» до сих пор не изучены, определены лишь некоторые стимулы, вызывающие транслокацию кальпаинов. Например, связывание τ -кальпаина с липидами в составе рафтов происходит только при наличии в среде 20 мМ (или больше) CaCl_2 , и практически полностью предотвращается добавлением 100 мкМ кальпептина [88]. Увеличение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме вызывает перемещение кальпаинов в область клетки, обогащенную белками цитоскелета, например, в конусы ростов нейритов [78, 101]. Hood с коллегами (2003) с помощью метода конфокальной микроскопии показали, что при инкубации клеток SNB19 (клетки глиомы) на ламининовой подложке μ -кальпаин распределен в цитоплазме диффузно и присутствует в области псевдоподий в минимальных количествах; τ -кальпаин, напротив, преимущественно обнаруживается в области псевдоподий, при этом в клетках данной линии отношение содержания τ -/ μ -кальпаина значительно больше единицы [102, 103]. Этой же исследовательской группой было показано, что μ -кальпаин, 78 кДа субъединица τ -кальпаина и CSS-субъединица способны встраиваться в

мембраны эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи по типу интегральных белков [58].

В ряде исследований продемонстрирована митохондриальная локализация кальпаинов. Например, еще в 1991 г. появилось сообщение об идентификации кальпаин-подобной активности в матриксе и межмембранном пространстве митохондрии гепатоцитов крысы [104]. В митохондриях, выделенных из разных тканей, содержание μ -кальпаина отличается: представленность μ -кальпаина в митохондриях гепатоцитов значительно ниже, чем в митохондриях, выделенных из коры головного мозга крысы [105]. μ -кальпаин также обнаруживался в митохондриях кардиомиоцитов, причем его содержание увеличивается при экспериментальном повреждении миокарда у крыс [106]. m -кальпаин тоже был обнаружен в митохондриях кардиомиоцитов и гепатоцитов, причем в последних в связанном с глюкозо-регулирующим белком 75 кДа состоянии [107, 108]. Кальпаастатин выявлялся на внутренней мембране, но не в матриксе и не в межмембранном пространстве митохондрий [109, 110]. Перемещение кальпаинов в митохондрии может быть вызвано развитием патологического процесса, например, увеличением содержания агрегатов амилоида. Действительно, интрацеребральное введение пептида $A\beta_{25-35}$ крысам приводило к транслокации μ - и m -кальпаина из цитоплазмы в митохондрии с последующим высвобождением из митохондрий катепсина В и D, а также β -галактозидазы [111].

Немногочисленные экспериментальные исследования свидетельствуют о внеклеточной локализации кальпаинов. Deshpande с коллегами выявили, что стимуляция лимфоидных клеток линии U-937, ТНР-1 фторболовым эфиром совместно с Ca^{2+} -ионофором, приводит к секреции кальпаина в культуральную среду, добавление которой к выделенным из миелина белкам приводит к протеолитическому расщеплению основного белка миелина [112].

Исследования клеток карциномы человека NCI-H69 показали, что основной компонент сигаретного дыма нитрозамин инициирует

фосфорилирование и стимулирует секрецию активированных μ - и m -кальпаина во внеклеточную среду. При этом и секреция, и фосфорилирование кальпаинов под действие нитрозамина подавляется PD98059 (ингибитор MEK/ERK сигнального пути) и ботулотоксином [113].

На клетках линии N27 (линия дофаминергических нейронов) было показано, что их обработка MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine – селективный для дофаминергических нейронов нейротоксин - МПТП) вызывает высвобождение кальпаина в культуральную среду. При добавлении внеклеточной жидкости, содержащей кальпаин, к культуре глиальных клеток наблюдается активация последних, что, в свою очередь, оказывает токсическое действие преимущественно на дофаминергические нейроны [114].

Стимуляция клеток хрящевой ткани с помощью ФНО- α (10 нг/мл) приводит к высвобождению m -кальпаина в межклеточную среду, что сопровождается увеличением активности внутриклеточного m -кальпаина, эффект подавляется нестероидными противовоспалительными препаратами [115]. Кроме этого, на клетках предшественниках остеобластов мыши линии MC3T3-E1 было показано наличие m -кальпаина в культуральной среде, причем его высвобождение не блокировалось добавлением брефельдина А и моненсина, что указывает на неклассический путь секреции m -кальпаина из клетки. Однако эти же авторы отмечают, что высвобождение m -кальпаина было нехарактерно для клеток HeLa [116]. В работе Perez с коллегами [117] удалось показать, что ядерные клетки крови человека и лимфоциты, выделенные из селезенки мыши, секретируют кальпаин по ABCA1-зависимому пути в составе микровезикул, которые во внеклеточной среде быстро разрушаются и высвобождают свое содержимое. Их гипотеза строится на том, что добавление в культуральную среду 100 мкМ глибурида (ингибитор ABCA1-транспортера) препятствовало секреции кальпаинов (μ - и m -кальпаина).

Существует ряд работ, в которых показано, что кальпаины присутствуют во внеклеточном пространстве, в частности, в различных биологических жидкостях человека (сыворотка крови, ликвор, синовиальная жидкость). Этот факт объясняли пассивным высвобождением кальпаина из поврежденных клеток. Например, кальпаин находили в синовиальной жидкости пациентов с ревматоидным артритом или остеоартритом, но не в синовиальной жидкости здоровых волонтеров [118]; в сыворотке крови пациентов с нарушениями свертываемости крови [119], в ликворе пациентов с болезнью Альцгеймера [120]. Причем уровень m-кальпаина в ликворе этих пациентов был в среднем в 2,5 раза выше (по сравнению с контрольной группой), и увеличивался по мере снижения их когнитивных способностей. Наличие около 100 пМ/л m-кальпаина в СМЖ относительно здоровых доноров свидетельствует о том, что нельзя отрицать возможность высвобождения/секреции кальпаинов некоторыми клетками.

Вероятно, в физиологических условиях кальпаины локализируются исключительно внутриклеточно в свободной и/или мембрансвязанной форме; при развитии определенных форм патологии некоторые клетки приобретают способность секретировать или высвобождать кальпаин, тем самым спектр доступных кальпаинам субстратов расширяется, а значит расширяется и спектр их функций.

1.6. Физиологические функции кальпаинов

Кальпаины расщепляют белки-субстраты по ограниченному числу сайтов с образованием крупных фрагментов, что приводит к модификации специфической активности последних. В связи с этим, основной функцией кальпаинов является регуляторная и/или сигнальная функция. Вероятно, кальпаины могут также выполнять функции, не связанные с их протеолитической активностью, но данный вопрос в литературе не обсуждается.

Способность кальпаина расщеплять большое количество белков адгезионных комплексов (талин, эзрин, паксиллин, винкулин, α -актинин, ФАК-киназа, интегрин $\beta 1$, $\beta 3$ и $\beta 4$) (для обзора [25]) послужила предпосылкой для исследования кальпаина как фермента, регулирующего **клеточную подвижность**, поскольку расщепление белков адгезионных комплексов необходимо для открепления клетки от субстрата и образования новых фокальных контактов в области формирования и удлинения ламеллоподий. Практически все исследования роли кальпаиновой системы в регуляции клеточной подвижности были проведены на клеточных культурах с использованием синтетических ингибиторов кальпаина и показали, что подавление протеолитической активности кальпаина приводит к снижению миграционной способности клетки. Например, клетки яичников китайского хомячка линии СНО К1 в присутствии ингибитора кальпаина I или II в диапазоне концентраций от 2,6 мкМ до 260 мкМ практически полностью утрачивали способность к бета1- и бета3-интегрин-опосредованной миграции за счет стабилизации фокальных комплексов адгезии [121]. Позже на этих же клетках было показано, что кальпаин расщепляет бета3-интегрин по остатку Tyr759, что является сигналом перехода клетки от состояния распластывания к ретракции по RhoA-зависимому пути; экспрессия в СНО клетках модифицированного устойчивого к расщеплению кальпаином бета3-интегрин вызывает усиление распластывания клеток по подложке [122].

Кальпаины также вовлекаются в процесс регуляции клеточной подвижности через расщепление спектрина. Dourdin с коллегами (2001) от мышей с нокаутом гена малой субъединицы μ -кальпаина получили фибробласты, в которых спектрин и талин не подвергались расщеплению кальпаинами. Для этих клеток была характерна замедленная ретракция мембранных выступов, снижены адгезивные свойства, нарушена архитектура цитоскелета [123]. Схожий результат был получен на клетках крови человека. Например, введение в очищенные тромбоциты человека синтетического пептида, соответствующего В-субдомену кальпастина, подавляло кальпаин-

опосредованное расщепление талина и, как следствие, тормозило тромбин-индуцированную секрецию тромбоцитами альфа гранул, их агрегацию и распластывание по стеклу. Этот эффект наблюдался и при добавлении к тромбоцитам синтетических ингибиторов кальпаина: кальпептина, MDL 28,170 (MDL) и E64d [124]. Кроме этого, было показано, что механизм активации тромбоцитарных кальпаинов зависит от типа стимула. Добавление тромбина вызывает активацию кальпаинов непосредственно, а при применении фактора Виллебранда активация кальпаинов происходит только после Ca^{2+} -индуцированных конформационных изменений гликопротеина IIb/IIIa ($\alpha IIb\beta 3$ интегрин) (для обзора [125]), что указывает на вовлечение кальпаинов в реализацию нескольких сигнальных путей.

В экспериментах на культуре гладкомышечных клеток показано, что введение синтетического ингибитора кальпаинов предотвращает расщепление киназы фокальных контактов, талина и паксиллина, индуцированное фрагментами коллагена [126]. Схожие результаты были получены и на клетках НЕК 293 [127]. Добавление ингибитора кальпаина I и II к первичной культуре дендритных клеток селезенки мыши усиливает образование нитей актина, способствует накоплению бета2-интегрина, талина, паксиллина и винкулина, а также белка синдрома Вискотта-Олдрича в подосомах, способствуя их стабилизации, и, как следствие, уменьшению скорости клеточной миграции. В отсутствие ингибиторов кальпаин расщепляет компоненты подосом, активируя миграционную способность дендритных клеток [128].

Обработка бета клеток поджелудочной железы крысы ингибитором кальпаина I или калпептином приводит к снижению их способности распластываться по подложке, но не влияет на прикрепление к субстрату [129].

Особый интерес вызывает вовлечение кальпаинов в регуляцию формирования нейронных сетей, что требует высокоточной навигации аксонов и дендритов, осуществляющейся с помощью подвижных структур, называемых ростовыми конусами или конусами роста. Одним из сигналов, контролирующих навигацию конусов роста, является локальное увеличение

концентрации ионов Ca^{2+} , вызывающее гиперактивацию кальпаинов, критическим образом сказывающуюся на морфологии конусов роста [130]. Например, на первичной культуре клеток спинного мозга лягушки показали, что вход кальция в клетку через механочувствительные неспецифические ионные каналы TRPC1 вызывает активацию кальпаинов, которые, расщепляя талин, локализованный в области филоподий, нарушают их архитектуру и подавляют Srs-зависимое удлинение конусов роста аксона. Этот эффект отменялся добавлением 10 мкМ ингибитора кальпаина II [131]. Однако какие именно изоформы кальпаинов вовлечены в этот процесс долгое время оставалось неясным. В 2017 г. в удлиняющихся конусах роста нейронов спинного мозга лягушки был обнаружен и μ -, и m -кальпаин, а также продукты протеолитического расщепления талина и киназы фокальных контактов (ФАК). Для выявления дифференциального вклада кальпаин-опосредованного протеолитического расщепления этих белков в регуляцию навигации конусов роста были сконструированы устойчивые к протеолизу кальпаинами молекулы: талин (L432G) и киназа фокальных контактов (V744G). Оказалось, что экспрессия талина L432G на 24% увеличивала число фокальных контактов, а экспрессия ФАК V744G на 30% увеличивала частоту образования контактов и на 40% снижала длительность их существования [132].

Кальпаины также вовлечены в процесс регуляции трансэндотелиальной миграции лимфоцитов. Например, активация форболовым эфиром Т-клеток, выделенных из крови человека, приводит к транслокации кальпаина из цитозоля к клеточной мембране. Там кальпаин накапливается в точках фокальной адгезии, активируется, расщепляет тирозин фосфатазу 1В, что вызывает изменение морфологии клетки и увеличивает ее подвижность [133]. Также кальпаины регулируют процесс миграции Т-клеток в ЦНР. Например, на модели экспериментального аллергического энцефаломиелита у крыс был показан терапевтический эффект введения ингибиторов кальпаина [134], в частности, за счет снижения количества инфильтратов в ЦНР. На клетках Jurkat Е6-1 (Т-клетки) удалось продемонстрировать усиление хемотаксиса в

ответ на хемокин CCL2 путем добавления во внеклеточную среду ионов Ca^{2+} и, как следствие, активации кальпаинов; этот эффект снимается аппликацией ингибитора кальпаина – кальпептина [135]. Данные более поздних исследований показали, что активация кальпаинов необходима не только для миграции активированных Т-клеток, но и непосредственно для их активации. Обработка наивных Т-клеток ингибитором кальпаина II в дальнейшем снижала способность лимфоцитов секретировать цитокины и экспрессировать транскрипционный фактор NFκB [136].

Кальпаины способны подавлять образование мембранных выростов у нейтрофилов. Например, в неподвижных нейтрофилах повышена продукция и активность μ -кальпаина; ингибирование активности μ -кальпаина приводит к поляризации нейтрофилов, образованию мембранных выпячиваний и стимулирует «хаотичную» миграцию, снижая способность нейтрофилов к миграции по градиенту хемоаттрактанта [137]. В нейтрофилах экспрессируется и m -кальпаин, причем в покоящихся клетках оба кальпаина распределены диффузно, а обработка клеток хемоаттрактантом приводит к их ассиметричному распределению: μ -кальпаин остается диффузно распределен в цитоплазме клетки, а m -кальпаин накапливается у переднего края клетки среди нитей F-актина вблизи рафтов. Наличие активированного m -кальпаина в этой области является необходимым для направленной миграции нейтрофилов по градиенту хемоаттрактанта [138]. Нейтрофилы, полученные от нокаутных по μ -кальпаину мышей, были меньшего размера, обладали сниженной способностью к распластыванию и к миграции через активированный FНО- α эндотелиальный монослой [139]. Таким образом, присутствие μ - и m -кальпаина в нейтрофилах необходимо не только для их прохождения через эндотелий в ткани, но и для их адгезии к участкам эндотелия.

Кальпаины регулируют подвижность фибробластов. Например, Potter с коллегами на культуре NIH-3T3 фибробластов с повышенной продукцией кальпаина показали, что такие клетки не способны удлинять

ламеллоподии и имеют дефектные филоподии [140]. Оказалось, что этот эффект, по крайней мере частично, опосредован способностью кальпаинов расщеплять актин-связывающий белок кортактин [141]. Есть единичные данные о том, что скорость миграции и количество фокальных точек адгезии у фибробластов, полученных от *Capn4*^{-/-} мышей, было значительно меньше по сравнению с *Capn4*^{+/+} клетками, причем этот эффект не был связан с протеолитической активностью кальпаинов [142].

Таким образом, и μ -, и m -кальпаин участвуют в регуляции архитектуры цитоскелета различных типов клеток (нейронов, Т-клеток, фибробластов, нейтрофилов и пр.), что сказывается на клеточной подвижности; аппликация ингибиторов кальпаина или генетические модификации, препятствующие протеолитическому расщеплению кальпаинами их субстратов, как правило, вызывают снижение миграционной способности клеток.

В ряде исследований на культуре клеток с использованием синтетических ингибиторов кальпаина показано вовлечение кальпаинов в регуляцию **клеточного цикла**. Первые работы в этой области появились в начале 1990-х годов XX века, когда было обнаружено изменение локализации кальпаина и кальпастина во время пролиферации клеток карциномы человека A431. Оказалось, что в интерфазной клетке кальпастин визуализируется непосредственно вокруг ядра, а обе формы кальпаина распределены диффузно по всей цитоплазме. Во время митотического деления m -кальпаин концентрируется у веретена деления в области центромеры, а μ -кальпаин накапливается у клеточной мембраны вблизи основания веретена деления [143]. В дальнейшем исследования проводились на СНО клетках, которые инкубировали в среде с ингибитором кальпаинов (ZLLY-CHN2). Часть клеток обладала пониженной чувствительностью к данному ингибитору, поскольку содержала меньшее количество μ -кальпаина при неизменном содержании и активности m -кальпаина и кальпастина. Количество таких клеток удваивалось за 29 часов, в то время как «нормальным» СНО клеткам требуется всего 19 часов; снижение скорости

роста этих клеток, как оказалось, было вызвано удлинением G1 фазы [144]. Следовательно, для прохождения через G1 фазу клеткам СНО необходим кальпаин. В подтверждение этой гипотезы был проведен следующий эксперимент. К культуре клеток фибробластов человека линии WI-38 добавляли этот же ингибитор (ZLLY-CHN2) и он полностью блокировал пролиферацию фибробластов в поздней G1 фазе; это приводило к двукратному увеличению содержания общего белка без изменения содержания мРНК p53 (полифункциональный белок, основная функция которого состоит в негативной регуляции клеточного цикла), который является субстратом кальпаина. Авторы этого исследования предположили, что протеолитическое расщепление белка p53 кальпаином является необходимым для перехода от G1 к S фазе клеточного цикла, поэтому блокирование протеолиза p53 в этой клеточной системе приводит к остановке клеточного цикла в G1 фазе [145]. Кроме белка p53 прохождению клетки через G1 фазу митоза способствует циклин D1, который, как полагают, также является субстратом кальпаина. Ниже перечислены экспериментальные данные, подтверждающие этот тезис. Быстрая потеря циклина D1 при сывороточном голодании клеток линии NIH3T3 подавляется действием синтетических ингибиторов кальпаина и повышенной продукцией кальпастатина [146]; повышенная продукция кальпастатина замедляет прохождение эмбриональных фибробластов цыпленка через фазу G1 [147]; молекула циклина D1 содержит PEST области, характерные для субстратов кальпаина [148]. Позже было обнаружено, что субстратами кальпаина является белок p21, а также ингибитор циклин-зависимой киназы p19 [149]. Совокупность данных позволяет предположить, что кальпаин принимает участие в регуляции клеточного цикла, модулируя активность не только белка p53, циклина D1, а также белков p21 и p19.

В последних исследованиях появляется все больше информации о том, что кальпаины регулируют клеточный цикл в большем количестве точек. Например, добавление ингибитора кальпаина PD 150606 к клеткам линии TF-

1 (получены от пациента с эритролейкозом) нарушало переход G2/M, а также препятствовало прохождению клеток через S-фазу [150]. Однако есть работы, напротив, свидетельствующие в пользу того, что для прохождения клеток через S-фазу необходим m-кальпаин. Например, к клеткам линии U-2 OS (остеосаркома человека) добавляли водный экстракт *Rheum palmatum* (ревень пальчатый). Это приводило к усилению продукции Bax, Bak, Bad, cyclin B, AIF, p21, p27 и m-кальпаина и вызывало замедление прохождения клеточного цикла через S-фазу [151]. Вероятно, в данном случае m-кальпаин является одним из индукторов апоптоза, а регуляторная роль принадлежит μ -кальпаину или другим изоформам данного семейства.

На клетках немелкоклеточного рака легкого человека, по сравнению с клетками эпителия бронхов, показано 2-х кратное увеличение уровня мРНК и белка m-кальпаина, что приводит к интенсификации пролиферации этих клеток через активацию EGFR-pAKT сигнального пути [152]. Схожие данные получены на клетках рака предстательной железы (DU145 и PC3): содержание мРНК m-кальпаина в них было повышено, а выключение экспрессии CAPN2 ингибировало пролиферацию этих клеток путем остановки клеточного цикла в фазе G1, подавляло их способность к миграции и инвазии за счет снижения активации матриксной металлопротеиназы-2 (MMP-2) и MMP-9, а также за счет подавления экспрессии и фосфорилирования АКТ /mTOR [153].

Кальпаины также являются «регуляторами» мейоза. Представители кальпаиновой системы обнаруживаются в яйцеклетках и сперматозоидах млекопитающих [154, 155]; экспрессия μ - и m-кальпаина наблюдается на всех стадиях сперматогенеза, но при переходе к мейозу повышается только экспрессия μ -кальпаина [156]. С помощью методов иммуногистохимии и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии была показана локализация изоформы кальпастина с молекулярной массой 110 кДа непосредственно у мембраны и, в особенности, в области мейотического веретена деления яйцеклетки мейоза I и мейоза II. Изоформа кальпастина с молекулярной массой 77 кДа оказалась локализованной вблизи

поверхностного слоя ооплазмы с кортикальными гранулами. Активация яйцеклетки вызывала перемещение «мембранного» кальпастина с молекулярной массой 110 кДа в кортикальный слой, а кортикальный т-кальпаин, напротив, смещался к мембране [157]. Вероятнее всего, в регуляцию мейоза вовлекается μ -кальпаин, а т-кальпаин является участником процесса активации яйцеклетки при оплодотворении. Таким образом, несмотря на отсутствие данных о субстратной специфичности по отношению к μ - или т-кальпаину, данные изоформы кальпаинов в одних и тех же клетках могут выполнять различные и даже противоположные функции.

Кальпаиновая система вовлечена в процессы **клеточной дифференцировки**, причем в зависимости от направления дифференцировки имеет место разнонаправленное изменение продукции т- и μ -кальпаина. Например, созревание мегакариоцитов сопровождается снижением содержания т-кальпаина и повышением μ -кальпаина [158]; дифференцировка клеток K562 в направлении макрофагов - повышением уровня обеих протеаз [28]. Обработка PC12 клеток ФРН, приводящая к образованию и удлинению нейритов, вызывает снижение активности обеих протеаз примерно в два раза, при этом аппликация калпептина отменяет этот эффект [159]. Процесс дифференцировки L8 миобластов сопряжен с повышением синтеза обоих кальпаинов, а подавление синтеза μ - и т-кальпаинов вызывает торможение формирования мышечных волокон [160].

Дифференцировка фибробластов в миофибробласты также осуществляется при участии компонентов кальпаиновой системы. Так, на модели осложненного раневого процесса у мышей показано отсутствие кальпастина во вновь образованных подкожных капиллярах, при этом у животных с генетически детерминированным повышением содержания кальпастина раны заживали значительно медленнее, в частности, за счет снижения активности т-кальпаина, подавления продукции тромбоцитарного ростового фактора и его бета рецептора [161].

Особый интерес представляет исследование, посвященное изучению вклада кальпаинов в регуляцию Wnt сигнального пути, обеспечивающего дифференцировку нейральных стволовых клеток. Ранее уже была показана необходимость активации кальпаинов для активации циклинзависимой киназы 5-го типа (CDK5). Именно активированный m-кальпаин (но не μ -кальпаин) обеспечивает расщепление белка p35 до p25, который перемещается от периферии клетки к ядру и/или к околядерным областям, приводя к образованию p25/Cdk5 и активации киназы [162]. В исследовании Shu с коллегами (2018) на клетках нейробластомы SH-SY5Y продемонстрировали, что белок семейства Wnt - Wnt-5a повышает продукцию p25 через активацию m-кальпаина и вызывает активацию Cdk5 при нейрональной дифференцировке SH-SY5Y клеток. Подавление активности Wnt-5a с помощью специфических антител или подавление продукции данного белка с помощью малых интерферирующих РНК отменяет индуцированную BDNF дифференцировку SH-SY5Y клеток [163]. Таким образом, кальпаины вовлекаются в регуляцию клеточной дифференцировки через модуляцию процесса **внутриклеточной сигнализации**. Кальпаины вовлечены в регуляцию активности не только Cdk5 киназы. Например, субстратом кальпаинов является ПКС, причем продукт ее расщепления также обладает киназной активностью, но является специфичным для другого спектра субстратов. В дофаминергических нейронах, в ответ на вход кальция в клетку через VGCCs каналы (voltage-gate calcium channels), m-кальпаин активируется и расщепляет ПКР. Это приводит к разобщению каталитической и регуляторной субъединиц ПКС и образованию короткоживущей конститутивно активной протеинкиназы M (ПКМ). ПКМ, в свою очередь, регулирует функциональное состояние дофаминергической системы, фосфорилируя DAT (транспортер дофамина) и D2 [164].

Src киназа и фосфатаза PTP-1B, регулирующие чувствительность рецептора к инсулину, а также участвующие в процессах эмбрионального развития и клеточного роста, тоже расщепляются кальпаинами [165, 166].

Расщепление кальпаином β -интегрин приводит к утрате его способности взаимодействовать с талином, филамином, L-пластином, модулируя процесс перестройки цитоскелета клетки [167]. В свою очередь, расщепление филамина А кальпаином приводит к образованию пептида с молекулярной массой 90 кДа, который способствует накоплению HIF-1 α в ядре клетки и таким образом индуцирует экспрессию HIF-зависимых генов [168, 169].

В нескольких исследованиях показана способность μ -кальпаина расщеплять белки семейства малых ГТФаз Ras (Rat sarcoma), вовлеченных в регуляцию citoархитектуры клетки [170, 171]. Например, на срезах гиппокампа крысы было выявлено, что аппликация BDNF приводит к перестройке актинового цитоскелета. В первые пять минут после добавления BDNF наблюдается увеличение степени полимеризации актина, с восстановлением исходного состояния к 15-й минуте; к 30-й минуте после добавления ростового фактора степень полимеризации актина опять увеличивается; повторное восстановление состояния наблюдается через 60 минут после воздействия. Содержание RhoA (Ras homology) под действием BDNF изменялось аналогичным образом. Оказалось, что BDNF стимулирует синтез RhoA de novo через mTOR-зависимый (mammalian target of rapamycin) сигнальный путь, при этом обработка срезов ингибитором кальпаинов PD151746, преимущественно подавляющим активность μ -кальпаина, не отражалась на BDNF-индуцированном повышении продукции RhoA, а добавление специфического (относительно!) ингибитора m -кальпаина – блокировало эффект. Авторы данного исследования [171] предложили следующую гипотетическую схему влияния кальпаинов на BDNF-индуцированную продукцию RhoA. Аппликация BDNF вызывает активацию m -кальпаина, который, в свою очередь, по еще неизвестному механизму «стимулирует» фосфорилирование протеинкиназы mTOR, переводя ее в активированное состояние [153]. mTOR интенсифицирует биосинтез белка, в том числе RhoA, за счёт фосфорилирования ключевых регуляторов трансляции мРНК; повышение содержания в клетке RhoA через активацию

ROCK вызывает полимеризацию актина. RhoA, являясь субстратом μ -кальпаина, подвергается протеолитическому расщеплению с утратой своих функций – актин деполимеризуется [171]. Таким образом, архитектура цитоскелета клетки зависит от отношения активности μ - и m -кальпаина.

Кальпаины также вовлечены в регуляцию **апоптоза**. Например, на клеточных линиях MCF-7, HeLa, и SH-SY5Y показано, что протеолитическое расщепление проапоптотических каспаз-7 и -9 кальпаином приводит к их инактивации и предотвращает апоптоз [172], при этом m -кальпаин в клетках ЦНС способен расщеплять прокаспазу-3 и -12 с образованием проапоптотических каспаз и, таким образом, способствует апоптозу [173] (для обзора [174]). Каспазы же могут расщеплять кальпаистатин, вызывая дополнительную активацию кальпаинов, и интенсифицировать процесс апоптотической гибели клетки [175, 176]. Таким образом, каспазы и кальпаины могут работать либо согласованно, либо независимо, а иногда и в противоположных «направлениях» в зависимости от типа клетки или от природы проапоптотического сигнала.

Субстратами кальпаина также являются другие белки-регуляторы апоптоза: p53, Bax, Bcl-xL, Bid, Bak, NF κ B [177, 178]. Например, кальпаины расщепляют белок Bax с образованием фрагмента 18 кДа (Bax/p18), который является мощным проапоптотическим агентом. Более того, в отличие от полноразмерного Bax, Bax/p18 теряет способность взаимодействовать с антиапоптотическими белками Bcl-2 и/или Bcl-xL [179]. Кальпаин расщепляет Bid между Gly70 и Arg71 (для аминокислотной последовательности человека) с образованием активной молекулы, индуцирующей высвобождение цитохрома с изолированными митохондриями; обработка клеток метастазирующей меланомы человека 224 или клеток карциномы легкого а549 цисплатином вызывает подавляемую калпептином активацию проапоптотического пути с образованием аналогичного продукта протеолиза Bid [180, 181], что указывает на возможное вовлечение кальпаинов в реализацию (усиление) индуцируемого цисплатином апоптоза.

Проапоптотическое действие кальпаинов также объясняют его способностью расщеплять X-связанный ингибитор белка апоптоза (XIAP). Предполагается следующая цепь событий: в результате действия проапоптотического фактора активируются кальпаины, в частности, μ -кальпаин, который расщепляет XIAP; расщепление XIAP приводит к активации проапоптотических каспаз, клетка погибает [182]. Данная гипотеза нашла подтверждение в более поздних исследованиях. Huang с коллегами (2017) показали, что снижение активности кальпаина в U937 клетках способствует их устойчивости к апоптозу за счет увеличения содержания полноразмерной молекулы XIAP1 и другого ингибитора апоптоза – сурвивина [183].

Многочисленные исследования показывают, что кальпаины способны, расщепляя белок p53 (например, с образованием фрагмента 26 кДа), модифицировать его функции и таким образом модулировать апоптотический потенциал клетки [184]. Например, флавоноид рутин (витамин Р) предотвращал индуцированную четыреххлористым углеродом гибель клеток почек у мышей. Оказалось, что этот эффект опосредуется через подавление активности кальпаинов и, как следствие, через снижение содержания продуктов протеолитического расщепления белка p53 при одновременном угнетении его продукции [185]. Однако в работе Atencio с коллегами (2000) на различных клеточных линиях опухолей человека оценивали способность ингибитора кальпаина I усиливать p53-зависимый апоптоз и оказалось, что обработка ингибитором кальпаина 1 приводит к повышению уровня активированного p53, увеличению содержания белка p21, активации каспаз, гибели клеток путем апоптоза [186]. Проапоптотический эффект ингибиторов кальпаина был обнаружен еще рядом авторов. Например, сверхэкспрессия кальпастатина в клетках нейробластомы человека линии SH-SY5Y вызывала увеличение активности каспазы-3 и, тем самым, стимулировала апоптоз [187]. Можно предположить, что направленность действия кальпаинов зависит от типа клеток, однако исследование СНО клеток со сверхэкспрессией кальпастатина показало, что повышенный уровень кальпастатина

предотвращает апоптоз, индуцированный тапсигаргином, сывороточным голоданием или Ca^{2+} ионофором A23187, в то время как сверхэкспрессия μ -кальпаина в этих же клетках также защищает их от апоптотической гибели, индуцированной ФНО- α (обобщено в [188]). Таким образом, участие кальпаинов в регуляции апоптоза определяется типом клетки и природой апоптотического стимула.

Особого рассмотрения требует участие кальпаинов в регуляции выживаемости/гибели нейронов (для обзора [189, 190]). На сегодняшний день уже общепризнано, что нейроны, как и большинство других клеток, могут «погибать» тремя путями: путем апоптоза (под действием внешних или внутренних факторов), путем аутофагии, путем некроза (регулируемого или нерегулируемого) [191]. Кальпаины вовлечены в регуляцию всех вышеперечисленных путей. Например, для клеток нервной системы показано, что активация каспазы 12 является кальпаин-зависимым процессом [192]. Апликация ионофорного полиэфирного антибиотика салиномицина к нейронам спинномозговых узлов мыши вызывала активацию μ - и m -кальпаина, индуцируемое ими расщепление и активацию каспазы-3, -9 и -12, и, как следствие, вызывало гибель клеток путем апоптоза [193]. Yamada с коллегами (2012) выявили, что подавление экспрессии гена *capn1* в нейронах приводит к снижению активности каспазы-3, увеличению активности XIAP (ингибитор каспазы-3) и подавлению апоптоза [194]. Как уже было сказано выше, кальпаины могут опосредовать не только про-, но и противоапоптотические сигналы, и в этом отношении клетки нервной системы не являются исключением. Например, в клетках нейробластомы SH-SY5Y активированный m -кальпаин расщепляет каспазу-9, лишая ее способности активировать каспазу-3, блокируя митохондриальный путь апоптоза [195]. AIF (apoptosis-inducing factor) - фактор инициации апоптоза, также является субстратом кальпаинов. Его укороченная форма (tAIF) образуется на внутренней мембране митохондрий и, проникая в цитоплазму, способствует активации каспазы-9, конденсации хроматина и фрагментации ДНК [196].

Yamada с коллегами (2012) сообщает, что гибель нейронов путем апоптоза, вызванного ишемией, сопровождается перемещением AIF из митохондрий в цитоплазму, и этот процесс блокируется подавлением экспрессии гена *capn1* [194]. Еще одна мишень кальпаина, вовлекаемая в AIF-индуцируемый апоптоз нейронов, - белок теплового шока 70 (БТШ70). БТШ70 связывается с AIF и поддерживает его стабильность для предотвращения апоптоза, однако μ -кальпаин разрушает БТШ70, инициируя транспорт AIF из митохондрий в цитоплазму [197].

Как уже было сказано выше, кальпаины участвуют в модуляции активности Cdk5. Для активации данной киназы необходимо ее взаимодействие с белком p35, однако кальпаины могут расщеплять его с образованием p25 или p10. P25 активирует Cdk5, образуя комплекс Cdk5-p25, который инактивирует белок MEF (myocyte enhancer factor), важнейший для выживаемости дофаминергических нейронов фактор [198]. Кроме этого, комплекс Cdk5-p25 способен усиливать продукцию белка p53, способствуя активации каспазы-3 [199]. Еще один эффект от образования данного комплекса - фосфорилирование NR2A субъединицы NMDAR глутамата, приводящее к повышенной продукции функциональных NMDAR, перегрузке клетки кальцием, дополнительной активации кальпаинов и, в итоге, к гибели клеток ЦНС [200].

В клетках нервной системы кальпаины также вовлекаются в процесс регуляции аутофагии [190, 201]. Белок атаксин-3, мутация в гене которого связана с развитием болезни Мачадо-Джозефа (генетически обусловленная спиноцеребеллярная атаксия, клинически представленная полиморфными сочетаниями мозжечкового синдрома с проявлениями вторичного паркинсонизма, гиперкинезами, пирамидными расстройствами в виде спастических параличей и офтальмоплегии, амиотрофиями), расщепляется μ - и m -кальпаинами в двух сайтах с образованием токсических фрагментов, вызывающих индукцию аутофагии [202]. Однако при ишемическом повреждении клеток сетчатки кальпаины могут ингибировать аутофагию,

расщепляя белок беклин-1 [203]. Кальпаины также расщепляют белок LAMP2 (lysosomal membrane permeabilization protein 2), вызывая пермеабиллизацию лизосомальной мембраны и подавление аутофагии [204]. В серии исследований показано участие кальпаинов в переключении процесса аутофагии на апоптоз. Например, в нейрональных стволовых клетках гиппокампа (NSC) крысы содержание m-кальпаина было примерно таким же как в клетках HEK293 (не нейронального происхождения) и клетках SH-SY5Y (нейронального происхождения); μ -кальпаин в NSC клетках, в отличие от клеток сравнения, не выявлялся. При инкубации этих клеток в безинсулиновой среде наблюдались следующие изменения: уровень мРНК m-кальпаина повышался, а белка – падал; содержание мРНК и белка μ -кальпаина, как и при инкубации клеток в присутствии инсулина, было крайне низким. Подавление продукции m-кальпаина или его ингибирование приводило к увеличению доли клеток, погибающих путем аутофагии, при этом сверхэкспрессия μ -кальпаина приводила к увеличению доли клеток, погибающих путем апоптоза [205]. Кроме этого, в исследовании Machado VM с коллегами (2015) подавление экспрессии кальпастина в NSC клетках нарушало их пролиферацию и снижало миграционную способность нейробластов, при этом аппликация кальпептина вызывала противоположный эффект, стимулируя нейрогенез в субвентрикулярной зоне гиппокампа [206]. Таким образом, на HCN клетках показано, что в ответ на один и тот же стимул активация μ -/ m -кальпаина приводит к различным последствиям.

Кальпаины также вовлечены в регуляцию партанатоза нервных клеток (форма программируемой гибели клеток из-за накопления в клетке поли (АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP)). При повреждении ДНК PARP активируется и транслоцируется из ядра к митохондриальной мембране, где по неизвестному механизму облегчает активацию μ -кальпаина, который расщепляет AIF до tAIF, способствуя перемещению последнего в ядро [207]. Аналогичная цепь событий была показана для N-ацетилсфингозин (С2-церамид)-индуцированной гибели путем партанатоза первичной культуры

клеток нейронов сетчатки [208]. Любопытно, что PARP является субстратом кальпаинов, а активация PARP требует активации кальпаинов [209]. Следовательно, PARP-1 и μ -кальпаин действуют сонаправленно, вызывая AIF-опосредованный некроз.

Некроптоз, RIP (receptor-interacting protein)-опосредованная запрограммированная форма некроза, также регулируется кальпаином. Например, белок JIP1 (JNK interacting protein 1) является субстратом кальпаинов. Его деградация под действием кальпаинов в PC12 клетках, обработанных вальпроевой кислотой, приводит к активации JNK-1 (с-Jun N-terminal kinases), которая стимулирует продукцию RIP-1. RIP-1 связывается с белком RIP-3, они фосфорилируют друг друга и собираются в структуры, называемые «некрсомы» [210]. Однако, с одной стороны, JNK (а значит и кальпаин) участвует в запуске ФНО- α -индуцированной гибели клеток, а с другой - способствует выживанию клетки и подавляет апоптоз, индуцируемый ФНО- α . Таким образом, и в этом случае кальпаины участвуют в переключении некроптоза на апоптоз.

Кальпаины также вовлечены в процесс регуляции **синаптической пластичности и нейромедиаторного обмена**. Идентификация спектрина как субстрата кальпаина стала первым весомым аргументом в пользу предположения о вовлечении кальпаиновой системы в регуляцию долговременной потенциации (LTP – long-temp potentiation) синаптической передачи. Действительно, LTP проявляется в функциональной и морфологической реорганизации синаптических межнейрональных связей, которые невозможны без перестройки цитоскелета клетки. Подавление активности кальпаина с помощью специфических ингибиторов или же путем введения соответствующей миРНК приводит к нарушению LTP, а нокаут гена μ -кальпаина у мышей вызывает существенное снижение гиппокамп-зависимой пространственной памяти [211, 212]. Напротив, у мышей, дефицитных по кальпастатину, наблюдается усиление эффективности долговременной потенциации [213]. Дополнительным фактом в пользу

гипотезы об участии кальпаинов в регуляции LTP послужили данные о способности кальпаинов модулировать эффективность связывания глутамата с его рецепторами [214]. Кроме этого, оказалось, что агонисты рецепторов глутамата могут активировать кальпаин. В частности, системное или интрацеребровентрикулярное введение агонистов рецепторов глутамата (кайнат, NMDA) индуцирует кальпаин-зависимое расщепление спектрина и MAP2 (microtubule-associated protein-2) [215]. Добавление NMDA к культуре гранулярных клеток мозжечка приводит к накоплению 150 кДа фрагмента α II-спектрина, причем данный эффект критическим образом зависит от концентрации Ca^{2+} и подавляется ингибитором кальпаина I [216]. На переживающей культуре клеток гиппокампа показано, что аппликация NMDA вызывает активацию m-кальпаина, который, в свою очередь, расщепляет спектрин [217]. Таким образом, стимуляция рецепторов глутамата, вызванная аппликацией различных агонистов, приводит к активации кальпаина, расщеплению кальпаин-чувствительных белков цитоскелета, и, как следствие, к изменению citoархитектуры клетки и структурно-функциональной реорганизации синапса.

Кальпаины также способны модулировать синаптическую передачу за счет расщепления белков, входящих в состав рецепторов к нейромедиаторам. Например, NR2 (NR2A-C) субъединицы NMDA рецепторов глутамата являются субстратами кальпаина. Сайт расщепления находится в C-концевом домене молекулы, например, субъединицу NR2A кальпаин расщепляет между 1279 и 1330 аминокислотой. После протеолиза N-концевой фрагмент NR2 субъединицы остается в связанной с NR1 форме, и они формируют функционально-активный рецептор, который отличается от исходного по многим электрофизиологическим характеристикам [218]. По другим данным, сайт расщепления NR2A кальпаином находится вблизи 1051 аминокислоты, такой N-концевой фрагмент является нестабильным и не способен обеспечивать нормальное функционирование рецептора [219].

Кальпаин расщепляет GluR1 субъединицу AMPA рецепторов глутамата, причем преинкубация выделенных синаптических мембран с ингибитором фосфатаз препятствует протеолизу, но никак не сказывается на способности кальпаина расщеплять спектрин [220]. Это означает, что способность кальпаина расщеплять субъединицы рецепторов глутамата дополнительно регулируется соотношением в клетке активированных киназ/фосфатаз.

Субстратом кальпаина также является белок постсинаптических уплотнений PSD-95 (postsynaptic density protein of 95 kDa), связывание которого с NR2A субъединицей NMDA рецептора глутамата необходимо для заякоривания рецептора в мембране [221]. Причем совместная экспрессия PSD-95 и NR2A в эмбриональных клетках почек человека линии HEK293 блокирует расщепление кальпаином субъединиц рецептора глутамата. Данный эффект не связан со снижением активности кальпаина, изменением уровня внутриклеточного кальция или нарушением процесса интернализации лиганд-рецепторного комплекса, но полностью снимается при введении делеции в С-концевом мотиве NR2A и при экспрессии модифицированного белка PSD-95, который не способен образовывать кластеры и взаимодействовать с NMDA рецептором [218]. Таким образом, кластеризация белка PSD-95 и его прямое взаимодействие с NR2A предотвращают протеолитическое расщепление NR2A и NR2B кальпаином. Напротив, расщепление PSD-95 кальпаином препятствует его кластеризации и приводит к изменению субклеточной локализации NMDA рецептора и, следовательно, сказывается на синаптической активности.

Еще один субстрат кальпаина – белок GRIP (glutamate receptor-interacting protein). Поскольку GRIP является одним из белков, стабилизирующих синаптические окончания, его протеолиз под действием кальпаина приводит к структурной и функциональной реорганизации синапса, в частности, нарушает связь между GRIP и GluR2 субъединицей AMPA рецептора, ослабляя заякоривание рецептора в синаптической мембране [222]. Некоторые субъединицы метаботропных рецепторов глутамата также являются

субстратами кальпаина. Например, С-концевой внутриклеточный домен mGluR1- α может быть расщеплен кальпаином, в результате чего становится невозможной активация PI3K-Akt сигнального пути, что лишает клетку способности к передаче сигналов на выживание [223]. Однако помимо повреждающего действия кальпаины через NMDAR могут оказывать и нейропротективный эффект. Например, расщепляя NR2A субъединицу, кальпаины могут «вывести из строя» NMDA-рецептор глутамата и, тем самым, предотвратить развитие эксайтотоксичности [219]. Также результатом активации синаптических NMDA рецепторов глутамата является гиперактивация μ -кальпаина, который, в свою очередь, расщепляет PHLPP1 фосфатазу (leucine-rich repeat Protein Phosphatase 1) и снимает блок с Akt- и ERK1/2-зависимых сигнальных путей, определяющих выживание клетки. Однако активация внесинаптических NMDA рецепторов приводит к активации m-кальпаина, расщеплению им STEP-фосфатазы (striatal-enriched protein tyrosine phosphatase) и, как следствие, к смерти нервной клетки [224].

Двойственная роль кальпаинов в регуляции синаптической пластичности подтверждена еще в нескольких исследованиях [20, 225]. Например, на срезах мозжечка, полученных от мышей с нокаутом гена μ -кальпаина, при низкочастотной стимуляции параллельных волокон показано нарушение синаптической передачи к клеткам Пуркинье, однако аппликация ингибитора m-кальпаина приводила к ее усилению вне зависимости от уровня экспрессии гена CAPN1 [226]. Можно заключить, что μ -кальпаин усиливает, а m-кальпаин подавляет синаптическую передачу. Этими примерами мы еще раз подтверждаем двойственную роль кальпаинов, причем не только в регуляции выживаемости/гибели нервных клеток, но и в модуляции синаптической передачи.

Помимо всего вышесказанного, кальпаин еще расщепляет синаптосомальный белок SNAP-25 (synaptosomal-associated protein of 25 kDa), что приводит к нарушению экзоцитоза синаптических везикул и препятствует высвобождению нейромедиаторов [227]. Везикулярный транспортер ГАМК

(VGAT) также является субстратом кальпаина. При расщеплении VGAT кальпаином образуется стабильный белковый фрагмент tVGAT, лишенный пятидесяти N-концевых аминокислот. Такой усеченный белок не способен «закачивать» ГАМК в синаптические везикулы, что приводит к ослаблению или полному подавлению ГАМК-ергической трансмиссии [228]. Кроме этого, существуют данные о непосредственном участии кальпаинов в регуляции образования ГАМК: кальпаин может расщеплять глутаматдекарбоксилазу (GAD) — фермент, катализирующий преобразование глутамата в ГАМК посредством декарбоксилирования, - нарушая ее нормальное функционирование [229]. В 2005г. было показано, что субстратом кальпаина является белок синаптических окончаний – GAP-43 (growth associated protein) [230], участие которого в регуляции освобождения нейромедиаторов было продемонстрировано в ряде работ [231]. Так, введение антител к этому белку в синаптосомы, пермеабелизированные стрептолизин-О, нарушает освобождение норадреналина, холецистокинина-8 и дофамина. Функционально-важным доменом белка GAP-43, стимулирующим нейросекрецию, является N-концевой участок, содержащий кальмодулин-связывающий домен и остаток серина-41. Именно этот домен и разрушается кальпаином, следовательно, присутствие в синаптических окончаниях активированного кальпаина может привести к нарушению норадреналинергической, дофаминергической и пептидергической передачи. Кроме этого, в дофаминергических нейронах в ответ на вход кальция в клетку через VGCCs каналы (voltage-gate calcium channels) кальпаин активируется и расщепляет ПКР. Это приводит к разобщению каталитической и регуляторной субъединиц ПКС и образованию короткоживущей конститутивно активной протеинкиназы М (ПКМ). ПКМ, в свою очередь, регулирует состояние дофаминергической системы, фосфорилируя DAT (транспортер дофамина) и D2 рецептор [164]. Кроме этого, сам DAT является субстратом кальпаина. Протеолитическое расщепление DAT кальпаином происходит между лейцином-71 и серином-72 (для DAT человека) и лишает транспортер

активности [232]. Таким образом, кальпаин нарушает регуляцию обратного захвата нейромедиатора. Однако и дофамин сам по себе способен модулировать активность кальпаинов. Например, при инкубации переживающих срезов мозга крысы с 1нМ дофамина содержание автолизированного m-кальпаина увеличивается в два раза. Этот эффект подавляется: ингибитором кальпаина I, EGTA, антагонистом рецептора дофамина типа D1 [233]. Однако обработка эндотелиальных клеток человека 25 мкМ дофамина приводит к подавлению активности m- и μ -кальпаина, индуцированной холодным стрессом. При этом преинкубация клеток с дофамином предотвращает еще и автолитическое расщепление μ -кальпаина. Сходный эффект наблюдается при добавлении в среду EDTA. Авторы полагают, что в этом случае дофамин выступает в роли хелатора ионов кальция и таким образом препятствует активации кальпаина [234]. Однако в многочисленных *in vivo* исследованиях показано, что только подавление чрезмерной активности кальпаинов с помощью синтетических ингибиторов предотвращает дегенерацию дофаминергических нейронов (для примера [235, 236]).

Любопытно, что клетки линии N27 (дофаминергические нейроны), обработанные нейротоксином MPTP, высвобождают во внеклеточную жидкость μ -кальпаин. При добавлении μ -кальпаина в межклеточную жидкость смешанной глиально-нейрональной культуры происходит активация микроглии, развитие реактивного микроглиозиса, клетки микроглии начинают выделять в межклеточную жидкость активные формы кислорода и другие провоспалительные вещества, приводящие к повреждению нейронов [114]. Этот факт служит подтверждением гипотезы о способности кальпаинов высвободиться/секретироваться во внеклеточную среду. Поскольку в условиях описанного выше эксперимента происходит активация микроглиальных клеток, нельзя исключить, что среди рецепторов на поверхности микроглиальных клеток есть субстраты кальпаина, или же,

попадая в межклеточную среду, кальпаины приобретают новые, не связанные с протеолизом функции.

Таким образом, активация кальпаинов играет критическую роль в процессах синтеза некоторых нейромедиаторов, их упаковки в синаптические пузырьки, регуляции везикулярного транспорта, высвобождения нейромедиаторов, модуляции их рецепторов и процесса обратного захвата, а также в стабилизации/дестабилизации структуры синапса. При этом повышенная активация μ - или m -кальпаина может приводить как к гибели нервной клетки, так и к ее выживанию; кальпаины даже способны активировать нейрогенез во взрослом мозге.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

Все реагенты для приготовления буферных растворов были приобретены в АО «ВЕКТОН» или Sigma Aldrich (США). Все общелабораторные реактивы (акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, глицин, трис, сахароза, HEPES и пр.) приобретались в VWR Life Science AMRESCO (США). В работе использовались антитела производства Abcam (UK): № ab28258, ab39165, ab28253, ab112, ab 34731; нитроцеллюлозная мембрана ReliaDisc Membrane Filters, Ahlstrom (Германия); система детекции ECL - ab133409 Optiblot ECL Ultra Detect Kit.

В работе использовали 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (Sigma Aldrich, США, № M103); MnCl₂ (Sigma Aldrich, США, № 450995); 3-нитропропионовая кислота (Sigma Aldrich, США, № N5636); липополисахарид (Sigma Aldrich, США, № L2880 (выделенный из *Escherichia coli* O55:B5)).

2.2. Лабораторные животные

Все описываемые в работе исследования проводились на самцах крыс Вистар, всего 310 особей. Такое количество животных достаточно для полной регистрации исследуемых эффектов и статистической обработки полученных данных. Крысы поступали из питомника Федерального государственного унитарного предприятия «Питомник лабораторных животных «РАППОЛОВО», Ленинградская область. На момент начала эксперимента возраст животных составил 12 недель, а вес – 180 - 230 г. Все запланированные в исследовании процедуры с животными рассмотрены Локальным этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ», который пришел к заключению, что планируемое исследование соответствует принципам гуманного обращения с животными; количество запрашиваемых животных соответствует планируемым исследованиям; имеющаяся материальная база соответствует планируемым исследованиям, и запланированные манипуляции, согласно классификации, предложенной в директиве 2010/63/EU, относятся к категории легкой степени

тяжести (Электронный ресурс. Directive 2010/63/eu of The European Parliament And Of The Council of 22 September 2010. Режим доступа: <https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:EN:PDF> (Дата обращения 07.12.2019)).

Перед началом каждого эксперимента животные акклиматизировались к условиям содержания в течение 10 дней, находясь на карантине в отдельном помещении вивария Физиологического отдела им. И.П. Павлова Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины». В течение этого периода времени состояние животных ежедневно контролировалось при общем осмотре в клетке. Животные в неудовлетворительном состоянии отбраковывались, в исследование не включались.

При проведении всех экспериментов осуществлялся контроль параметров окружающей среды. Световой режим: 12 часов ночь – 12 часов день при искусственном освещении. Уход и содержание животных осуществлялось в соответствии со стандартами ФГБНУ «ИЭМ». Животные содержались по 8 особей в клетке, тип клетки IV (площадь пола клетки – 1815 см²); клетки со стальными решетчатыми крышками с кормовым углублением, стальным разделителем для корма и воды. В качестве подстилочного материала использовали наполнитель растительного происхождения – древесную стружку.

На протяжении всего исследования использовали корм для лабораторных животных: «Комбикорм полнорационный экструдированный для лабораторных животных (мышей, крыс, хомяков) для содержания», Декларация о соответствии № РОСС RU. ПТ 62. Д 00511 до 04.04.2021 г. НД ТУ 9296-002-70941247-2005 ОК 005-93929619 (ООО «Лабораторкорм», Москва, Россия). Корм давался животным без ограничения. Вода в поилках использовалась бутилированная.

Во всех случаях для формирования экспериментальных групп использовали метод блочной рандомизации.

2.3. Общая характеристика пациентов

Все описываемые в данной части работы исследования построены на анализе вторичных данных. Первичные данные собирались врачами-неврологами при проведении собственных исследований, одобренных Локальным этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ».

В исследование вошли данные, полученные при проведении неврологического осмотра 12 пациентов с диагнозом «эссенциальный тремор», которые проходили обследование на базе Общеполиклинического отделения СПб ГБУЗ «Городская поликлиника №120» за период с 2015 года по 2017 год. Диагноз ЭТ устанавливался врачами-неврологами в соответствии с критериями Общества «Movement Disorder Society on tremor» от 1998 г. [237]. Критериями включения в исследование были: установленный диагноз «эссенциальный тремор»; подписанное больным информированное согласие на участие в исследовании, проводимого в рамках диссертационной работы по теме: «Нейробиологические основы гетерогенности эссенциального тремора», руководитель - Зав. Физиологическим отделом им. И.П. Павлова, д.м.н., профессор В.М. Клименко, соискатель – научный сотрудник Физиологического отдела им. И.П. Павлова, врач-невролог Муружева З.М. (Протокол ЛЭК №3/16 от 20.10.2016 г.). Пациенты исключались из исследования при наличии заболевания, которое могло повлиять на оценку выраженности симптомов ЭТ. Всего в исследовании вошло 6 мужчин и 6 женщин в возрасте 55-65 лет. Оценка степени выраженности заболевания проводилась по Шкале оценки тяжести тремора Fahn-Tolosa-Marin (FTM), валидизированной для эссенциального тремора [238]. В зависимости от степени выраженности тремора, пациенты были разделены врачами-неврологами на две равные по численности и гендерному составу подгруппы – с легким и умеренным тремором (амплитуда < 2 см) и с выраженным тремором (амплитуда ≥ 2 см).

В исследование вошли данные, полученные при проведении неврологического осмотра 12 пациентов с диагнозом «болезнь Паркинсона»,

которые проходили обследование на базе Клиники ФГБУ «НИИЭМ» СЗО РАМН за период с 2010 года по 2016 год. Критериями включения в исследование были: установленный диагноз «болезнь Паркинсона»; подписанное больным информированное согласие на участие в исследовании, проводимого в рамках разработки Медицинской технологии персонафицированной диагностики форм болезни Паркинсона (БП) на основе биомеханических, биохимических, генетических, клинических показателей, руководитель - Зав. Физиологическим отделом им. И.П. Павлова, д.м.н., профессор В.М. Клименко (Протокол ЛЭК № 2/16 от 12.05.2016 г.). Пациенты исключались из исследования при наличии заболевания, которое могло повлиять на оценку выраженности симптомов БП. Всего в исследование вошло 6 мужчин и 6 женщин в возрасте 59 - 67 лет. Диагноз БП устанавливался в соответствии с критериями Британского банка мозга [239]. Стадия БП определялась в соответствии с классификацией Хен и Яра в модификации Lindvall [240]. В зависимости от стадии заболевания пациенты были разделены на две подгруппы – в первую подгруппу вошли 6 пациентов (3 мужчины и 3 женщины) на стадиях 1,0 – 2,0 по шкале Хен и Яра, вторую подгруппу составили 6 пациентов (3 мужчины и 3 женщины) на стадиях 2,5 – 3,0 по шкале Хен и Яра.

В качестве контроля использовались данные, полученные врачами-неврологами при обследовании 12 относительно здоровых добровольцев – 6 мужчин и 6 женщин, которые входили в состав контрольной группы при проведении работ в рамках диссертационного исследования по теме: «Нейробиологические основы гетерогенности эссенциального тремора» (Протокол ЛЭК №3/1); размах выборки по возрасту в этой группе составил от 52 до 67 лет.

Кроме данных о тяжести или стадии заболевания в исследование были включены данные о содержании в периферической крови основных провоспалительных цитокинов и активности кальпаинов. Определение этих параметров было предусмотрено дизайном соответствующих исследований.

2.4. Дизайн исследований, проводимых с использованием лабораторных животных

2.4.1. Проведение экспериментов на образцах, полученных от интактных крыс

Для выполнения данного исследования среди животных, прошедших акклиматизацию, случайным образом отбиралось десять самцов. Животных декапитировали, из черепной коробки извлекали головной мозг. Из головного мозга согласно данным «Атласа мозга крысы в стереотаксических координатах» [241] иссекали стриатум. Из ткани стриатумов выделялись синапсомы согласно п. 2.6.2. Все эксперименты на синапсомах повторялись не менее трех раз.

2.4.2. Схема экспериментов с введением животным субсептической дозы ЛПС

Ввиду большого объема материала исследование проводилось в два равнозначных этапа. В общей сложности в исследование вошло 180 животных, которые случайным образом разделялись на две группы. Первой, контрольной группе (n=60), внутрибрюшинно вводили 1 мл апиrogenного физиологического раствора, второй, экспериментальной группе (n=120), однократно внутрибрюшинно вводили ЛПС (*Escherichia coli* O55:B5) в дозе 1 мг/кг веса животного в 1 мл апиrogenного физиологического раствора. Далее группы условно обозначали: контрольная группа – контроль; экспериментальная группа – ЛПР. У 15 животных из каждой группы в течение суток после введения препаратов измеряли глубокую температуру тела (см. п.2.5.3). Через 4 часа, а также на 7, 14, 30 и 180 дни у 7 животных из каждой группы анализировали общую активность в тесте «Открытое поле» (см. п. 2.5.1), каждый раз для исследования брали наивных животных. Через 4 и 24 часа, также на 7, 14, 30 и 180 день после начала эксперимента декапитировали по 20 животных из экспериментальной группы, через 4 часа, 24 часа и 180 дней – по 20 животных контрольной группы; собирали плазму крови; мозг

извлекали из черепной коробки, из правого и левого полушария иссекали стриатум и гиппокамп. Материал, полученный из правого полушария от 10-ти животных, использовали для проведения ОТ-ПЦР (см. п.п. 2.6.11 – 2.6.13), еще от 10-ти животных - для определения содержания и активности кальпаинов (см. п. 2.6.7). Материал, полученный из левого полушария от 10-ти животных, использовали для определения содержания моноаминов (см. п. 2.6.14), еще от 10-ти животных – замораживали и использовали для увеличения объема выборки при необходимости. Материал от 3-5 животных использовали для исследования гистологическими методами (см. п. 2.6.16). В некоторых случаях перед декапитацией из хвостовой вены животных путем ее иссечения собирали образец венозной крови.

2.4.3. Схема экспериментов с интраназальным введением животным $MnCl_2$

Ввиду большого объема исследования оно проводилось в два этапа.

Этап первый. Животные были случайным образом разделены на 2 группы: первая – контрольная, вторая – опытная, по 20 крыс в каждой. 90 дней животным экспериментальной группы интраназально вводили 1мг/кг $MnCl_2$ в объеме 10-20 мкл в зависимости от веса животного; животные контрольной группы получали физиологический раствор по аналогичной схеме. Далее группы условно обозначали: контрольная группа – контроль; экспериментальная группа – $MnCl_2$. У всех животных ежедневно оценивалась масса тела. У 10-ти животных из каждой группы на 20-й и 60-й день эксперимента оценивалась походка в тесте «Следы» (см. п. 2.5.2) и у 10-ти животных на 30-й и 90-й день эксперимента оценивалась двигательная активность в тесте «Открытое поле» (см. п. 2.5.1). Через 90 дней после начала эксперимента животных декапитировали; собирали плазму крови; мозг извлекали из черепной коробки, из правого и левого полушария иссекали стриатум и гиппокамп. Материал, полученный из правого полушария от 7-ми животных, использовали для определения содержания марганца методом ААС (см. п. 2.6.10), еще от 5-ти животных - для определения содержания и

активности кальпаинов (см. п. 2.6.7). Материал, полученный из левого полушария от 10-ти животных, использовали для определения содержания моноаминов (см. п. 2.6.14), еще от 7-ми животных – для проведения ОТ-ПСП (п.п. 2.6.11 – 2.6.13). От остальных животных материал замораживали и использовали для увеличения объема выборки при необходимости. В некоторых случаях перед декапитацией из хвостовой вены животных путем ее иссечения собирали образец венозной крови.

Этап второй. Животные были случайным образом разделены на три группы, по 20 особей в каждой. 30 дней животным экспериментальной группы интраназально вводили 1 мг/кг $MnCl_2$ в объеме 10-20 мкл в зависимости от веса животного; животные второй экспериментальной группы 30 дней получали интраназально 1 мг/кг $MnCl_2$ в объеме 10-20 мкл в зависимости от веса животного и дополнительно интраназально получали ингибитор кальпаина Cast (184-210) в дозе 50 мкг/кг в объеме 10-20 мкл в зависимости от веса животного; животные контрольной группы получали физиологический раствор по аналогичной схеме. Далее группы условно обозначали: контрольная группа – контроль; экспериментальная группа – $MnCl_2$, вторая экспериментальная группа – $MnCl_2$ + Cast (184-210). У всех животных ежедневно оценивалась масса тела. У всех животных на 20-й и день эксперимента оценивалась походка в тесте «Следы» (см. п. 2.5.2) и на 30-й день - двигательная активность в тесте «Открытое поле» (см. п.2.5.1). На 30-й день эксперимента всех животных декапитировали, собирали плазму крови; мозг извлекали из черепной коробки, из правого и левого полушария иссекали стриатум и гиппокамп. Материал, полученный из правого полушария от 10-ти животных, использовали для определения содержания марганца методом ААС (см. п. 2.6.10), еще от 10-ти животных - для определения содержания и активности кальпаинов (см. п.2.6.7, 2.6.9), а также определения содержания ТН. Материал, полученный из левого полушария от 10-ти животных, использовали для определения содержания моноаминов (см. п.2.6.14), еще от 10-ти животных – для проведения ОТ-ПСП (см. п.2.6.11-2.6.13).

2.5. Методы анализа поведения животных и манипуляции с животными

2.5.1. Тест «Открытое поле»

Использованная экспериментальная установка представляет собой круглую арену диаметром 100 см с бортами высотой 40 см и двойным дном, в котором имеется 16 отверстий – «норок». Тестирование проводилось в течение 3 мин. Животных перемещали в комнату с экспериментальной установкой за 1 ч до начала тестирования. Эксперимент проводили в промежуток времени с 18 до 22 часов при освещённости поля 25 лк. Арену после каждой крысы протирали 0,6% раствором перекиси водорода для удаления запахов, затем водой для удаления перекиси, после чего вытирали насухо. О поведении животных судили по суммарной пройденной дистанции и времени нахождения в неподвижном состоянии.

С помощью видеокамеры (Logitech c525, Швейцария), установленной на высоте 100 см над центром площадки и направленной вниз, производили видеосъёмку поведения крыс с дальнейшей обработкой видеофайлов в режиме off line. Для определения общей пройденной дистанции в качестве показателя локомоторной активности оценивали весь путь, пройденный животным в тесте, используя оригинальную программу «Программа для исследования поведения мелких лабораторных животных» (ПИПМЛЖ-1, Tracking), разработанную сотрудниками ФГБНУ «НИИ медицины труда» в соавторстве с сотрудниками Физиологического отдела им. И.П. Павлова ФГБНУ «ИЭМ», что подтверждается Свидетельством о государственной регистрации в Реестре программ для ЭВМ 01.09.2016. № 2016619940.

2.5.2. Оценка параметров походки в тесте «Следы»

Анализ походки по следам (отпечаткам лап) – тест, используемый для анализа двигательной активности. Установка представляет собой коридор шириной 12 см и длиной 120 см с высотой бортов – 14 см, по которому животное предварительно обучали проходить. По отпечаткам лап оценивали степень координации животного. Так, в случае нормальной локомоции центр

следа задней лапы попадал на центр предшествующего следа передней лапы. При нарушениях походки постановка задней лапы становилась вариабельной, и дистанция между следами передней и задней лап увеличивалась тем больше, чем сильнее были выражены нарушения. Измеряемые параметры: расстояние в миллиметрах между правой передней и левой передней лапами (пп-лп), расстояние между правой передней и правой задней лапами (пп-пз), расстояние между правой передней и правой передней лапами (пп-пп), расстояние между левой задней и левой задней лапами (лз-лз), левой передней и левой передней лапами (лп-лп), правой задней и правой задней (пз-пз), левой задней и правой задней (лз-пз), левой задней и левой передней лапами (лз-лп).

2.5.3. Измерение глубокой температуры тела у крыс

Перед началом эксперимента всех животных в течение недели приучали к рукам экспериментатора. Температуру тела животных измеряли ректально электронным контактным термометром с ценой деления $0,1^{\circ}\text{C}$ (WT-05 ассигасу, производства B.Well, Швейцария). Кончик термометра смазывали вазелином и вводили в анальное отверстие на глубину до 12—13 мм при горизонтальном положении животного. Базальную температуру тела фиксировали в течение 7 дней. Все измерения проводили в помещении с температурой воздуха не ниже 25°P .

2.6. Лабораторные методы исследования

2.6.1. Получение гомогената клеток стриатума (препараты, обогащенные кальпаинами)

У интактного животного после декапитации извлекали головной мозг. С помощью хирургических инструментов из мозга выделяли стриатум как указано в п. 2.4.1; ткань гомогенизировали в 500 мкл лизирующего буфера; центрифугировали при 12000 g в течение 10 минут. Отбирали супернатант, который использовали для дальнейших манипуляций.

Лизирующий буфер:

50 mM Hepes pH 7,6

150 мМ NaCl
10% Глицерол
0,11% Triton X-100
5мМ ЭДТА
10мМ бета-меркаптоэтанол.

2.6.2. Получение синаптосом

Все процедуры проводили на "ледяной бане" при +4⁰P. Ткань мозга крысы измельчали скальпелем, а затем гомогенизировали в ручном гомогенизаторе в 5 объемах буфера А:

20 мМ Tris-HCl pH 7,4
0,32 М сахароза,
0,5 мМ ДТТ.

Полученный гомогенат центрифугировали на 1000 g в течение 10 минут. Надосадочную жидкость отбирали, а осадок гомогенизировали еще в 5 объемах буфера А. Полученный гомогенат снова центрифугировали на 1000 g в течение 10 минут. Осадок (фракцию клеточных ядер, загрязненную крупными обломками клеток) отбрасывали. Надосадочные жидкости, полученные после первого и второго центрифугирований, объединяли и подвергали центрифугированию на 15000 g в течение 30 минут. Надосадок отбрасывали, а осадок, содержащий фракцию синаптосом, загрязненных митохондриями и пузырьками несинаптического происхождения ресуспендировали в 0,5 мл буфера А и наслаивали на градиент плотности, образованный 23%, 10% и 3% раствором перколла (по 1,0 мл каждой концентрации в 4 мл пробирках) и центрифугировали при 25000 g на протяжении 30 мин. Собирали фракцию, обогащенную синаптосомами, с раздела фаз 10% и 23% перколла. Синаптосомальную фракцию ресуспендировали в растворе Рингера-Кребса (124 мМ NaCl, 1мМ CaCl₂, 5 мМ KCl, 1,3 мМ MgCl₂, 1,2 мМ NaH₂PO₄, 26 мМ, NaHCO₃, 10 мМ D(+)-глюкозы, 20 мМ Hepes-NaOH, pH = 7,4) так, чтобы финальная концентрация составила 1мг белка в 1 мл образца. Полученный препарат синаптосом разделяли на

порции и инкубировали при определенных условиях (указаны дополнительно в каждом конкретном случае). После окончания инкубации образец центрифугировали при 15000 g, 10 минут, 4°C; затем отделяли надосадочную жидкость (внесинаптомальная жидкость) и осадок (синапсомы).

2.6.3. Определение активности ЛДГ

Отсутствие ЛДГ, оцененное по ферментативной активности, во внесинаптомальной жидкости после инкубации синапсом при различных условиях принято рассматривать как признак целостности синапсом [242]. Для этих целей при проведении каждого эксперимента измерялась активность ЛДГ во внесинаптомальной среде синапсом до воздействия, после воздействия и в лизате синапсом, полученном путем обработки ультразвуком (Ultrasonic homogenizer HD 4100). Для анализа отбиралось 300 мкл образца в каждом случае. Активность ЛДГ анализировалась с помощью коммерческого набора реактивов Promega (Madison, WI, USA) в полном соответствии с инструкцией. Метод основан на окислении лактата под действием ЛДГ до пирувата и перекиси водорода (H_2O_2), которая под влиянием пероксидазы (ПОД), 4-аминофеназона (4-AP) и 4-хлорфенола образует красный киноновый комплекс.

2.6.4. Денатурирующий электрофорез в ПААГ

Электрофоретическое разделение белковой пробы проводили в вертикальных пластинах 12%-ного разделяющего (12% акриламид, 0,32% бис-акриламид, 37,5 мМ Tris-HCl pH=8,8 и 10 мкл ПСА и 40 мкл TEMED на 10 мл геля для полимеризации) и 4%-ного (4% акриламид, 0,11% бис-акриламид, 37,5 мМ Tris-HCl pH=6,8 и 30 мкл ПСА и 30 мкл TEMED на 10 мл геля для полимеризации) концентрирующего полиакриламидного геля. В качестве электродного буфера использовался буфер следующего состава: 0,025 М Tris, 0,192 М глицин, 0,1%-ный ДСН, pH 8,3. Белковые пробы перед нанесением на гель прогревали 2 минуты при +100°C в буфере для нанесения образцов следующего состава: 0,0625 М Tris-HCl pH 6,8, 2%-ный ДСН, 10%-ный глицерин, 5%-ный бета-меркаптоэтанол, 0,001%-ный бромфеноловый синий.

На дорожку наносили по 70 мкг белковой смеси (если не указано иное). Электрофорез проводили около 3 часов при напряженности электрического поля около 16-18 В/см. Сигналом для окончания электрофореза служило достижение лидирующего красителя (бромфенолового синего) конца геля [243]. В некоторых случаях после электрофореза белковые зоны в геле окрашивали в течение 2-х часов или дольше 0,1%-ным раствором Coomassie Brilliant Blue R-250 (G-250) в 25%-ном растворе изопропанола, приготовленном на 10%-ной уксусной кислоте, и отмывали в 5%-ном изопропаноле, приготовленном на 3%-ной уксусной кислоте или переносили на нитроцеллюлозный фильтр (НЦФ) для последующего иммуноблоттинга.

2.6.5. Иммуноблоттинг

Белки, разделенные электрофоретическим методом в ПААГ, переносили на НЦФ методом полусухого электропереноса с помощью перпендикулярно направленного тока в прерывистой системе рН и концентраций Tris-HCl буфера. Перенос осуществляли при постоянной силе тока 200 мА в течение 1 часа [244]. Качество переноса белков контролировали с помощью окрашивания мембран раствором Понсо С (Ponceau S). После переноса проводили неспецифическую «забивку» НЦФ раствором 5%-ного (w/v) раствора обезжиренного молока, приготовленного на PBS, содержащем 0.1% Tween-20 (PBS-T)) в течение ночи при 4°Р. Затем НЦФ инкубировали в течение суток со специфическими антителами согласно выбранной концентрации. После инкубации фильтр отмывали в 5% растворе обезжиренного молока, приготовленного на PBS-T, по схеме: 1 раз по 1 минуте, 3 раза по 15 минут. Затем НЦФ инкубировали со вторыми антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, в течение часа. После инкубации фильтр отмывали в PBS-T по схеме: 1 раз по 1 минуте, 3 раза по 15 минут, после этого НЦФ выдерживали 5 минут в дистиллированной воде. Иммуные комплексы визуализировали хемилюминесцентным методом, все манипуляции проводили в полном соответствии с инструкцией производителя. Относительное содержание иммунореактивных полипептидов

определяли денситометрически с помощью [245] программы ImageJ относительно зон, окрашенных антителами против бета-актина.

2.6.6. Иммунопреципитация

Иммунопреципитацию m-кальпаина проводили из внесинапсосомальной среды после инкубации синапсом с различными добавками. Для этого к 100 мкл супернатанта добавляли 5 мкл поликлональных антител против m-кальпаина (Abscam №ab 39165) и инкубировали на протяжении ночи при постоянном перемешивании при 4°C. Далее пробы в течение 4 часов инкубировали с 70 мкл 50%-ной сефарозы, конъюгированной с белком А, при постоянном перемешивании и при 4°C. Затем образцы центрифугировали при 3000g 5 минут. Осадок трижды промывали в буфере следующего состава: 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH=7,4), 1 mM ЭДТА, 0,1% Triton X-100, 0,1% бета-меркаптоэтанол. Комплекс разрушали кипячением в течение 5 минут в буфере (но без добавления бета-меркаптоэтанола) для нанесения образцов и затем разделяли в ПААГ согласно п. 2.6.4.

2.6.7. Казеиновая зимография в геле

Для обнаружения ферментативной активности кальпаинов из образцов ткани в неденатурирующих условиях выделяли валовой белок. Для этого образец гомогенизировали в 5-10 объёмах лизирующего буфера (150 mM NaCl, 10% глицин, 0,1% Triton X-100, 5 mM ЭДТА, 20 mM Tris-HCl pH=7,6, 10mM бета-меркаптоэтанол). Далее образцы центрифугировали 10 минут при 12000 g. Надосадок смешивали с буфером для нанесения образцов следующего состава: 0,0625 M Tris-HCl pH 6,8, 10%-ный глицерин, 5%-ный бета-меркаптоэтанол, 0,001%-ный бромфеноловый синий. Аналитическое одномерное разделение белков проводили в ПААГ. Для двухступенчатого электрофореза использовали 9% ПААГ в качестве разделяющего геля (9% акриламид, 0,32% бис-акриламид, 37,5 mM Tris-HCl (pH=8,8) с добавлением 20 мг казеина на 10 мл геля) и 4% ПААГ в качестве концентрирующего геля (4% акриламид, 0,11% бис-акриламид, 37,5 mM Tris-HCl (pH=6,8)). Перед

электрофорезом проводили «префорез» в течение 30-60 мин при напряженности электрического тока 10-15 В/см. После чего на дорожку наносили по 70 мкг суммарного белка. Электрофоретическое разделение вели до выхода из геля лидирующего красителя.

После окончания электрофореза гель переносили в активационный буфер (5 мМ CaCl₂, 10мМ бета-меркаптоэтанол, 20 мМ Tris-HCl (pH=7,0)) на 1 час. Затем гель ополаскивали дистиллированной водой и переносили в активационный буфер аналогичного состава, но с pH=7,2 и оставляли на ночь. На следующий день снова ополаскивали гель в дистиллированной воде и переносили его в активационный буфер аналогичного состава, но с pH=7,4 и выдерживали 1 час. Затем ПААГ окрашивали с помощью красителя Coomassie brilliant blue R-250. Об активности кальпаинов судили по площади непокрашенных красителем зон; изоформу кальпаина устанавливали, исходя из положения зоны относительно стандартного (коммерческого) образца μ - и m -кальпаина [246].

2.6.8. Модифицированный метод казеиновой зимографии в геле

Для выявления способности веществ напрямую активировать кальпаины использовали модифицированный метод казеиновой зимографии в геле. Для этого согласно п. 2.6.1 получали гомогенат мозга крысы; разделяли пробы электрофоретически в неденатурирующих условиях в геле сополимеризованном с казеином согласно п. 2.6.7 при этом на каждую дорожку наносили одинаковый объем из одной и той же пробы. Затем гель разрезали вдоль на три одинаковые части. Одну часть инкубировали в активационном буфере (5 мМ CaCl₂, 10мМ бета-меркаптоэтанол, 20 мМ Tris-HCl (pH=7,0), затем pH=7,2 и pH=7,4). Вторую часть инкубировали в аналогичных условиях, но вместо 5 мМ CaCl₂ добавляли 10 мМ NaCl (отрицательный контроль – в отсутствии кальция в среде кальпаины не активируются). Третью часть геля инкубировали в аналогичных условиях, но 5 мМ CaCl₂ заменяли на вещество интереса. Идентификацию активности кальпаинов проводили как в п.2.6.7

2.6.9. Казеиновая зимография в растворе

Исследуемый образец разбавляли буфером (250 мМ Tris-HCl, 150 мМ KCl, 2 мМ CaCl₂, 0,01% FITC-казеин (pH=7,4)) в отношении 1:1 и инкубировали при 25⁰C в течение необходимого времени, которое указано в каждом случае отдельно. После инкубации образец смешивали с буфером для нанесения образцов следующего состава: 0,0625 М Tris-HCl, 2%-ный ДСН, 10%-ный глицерин, 5%-ный бета-меркаптоэтанол, 0,001%-ный бромфеноловый синий (pH=6,8). Образец подвергали электрофоретическому разделению, зоны FITC-казеина визуализировали с помощью Molecular Imager GelDoc XR+, Bio-Rad при 280 нм.

2.6.10. Атомно-абсорбционная спектрометрия

Образцы ткани взвешивали и гомогенизировали в трех объемах деионизованной воды с сопротивлением не менее 10 МОм/см (воду с данными характеристиками получали с помощью системы очистки воды Milli-Q Direct, картридж Прогард Т3). К гомогенату добавляли концентрированную азотную кислоту (1:1 v/v) и инкубировали ночь при комнатной температуре (до полного растворения материала).

Анализ уровня марганца проводили на спектрофотометре ZEEnit 650 Р производства фирмы Analytik Jena (Германия). Средства поверки прибора: государственные стандартные образцы водных растворов ионов марганца (ГСО 7443-98). Все калибровочные растворы готовили на деионизованной воде с описанными выше характеристиками. Концентрацию марганца в образцах измеряли в двуполовом режиме, который за счет изменения величины напряженности магнитного поля позволяет продолжить калибровочную кривую вплоть до 1000 мкг/мл. Для каждого образца анализ проводили дважды. Результаты измерения нормировали на массу образца и представляли как нг/г ткани.

2.6.11. Выделение тотальной мРНК

Выделение тотальной мРНК производили с помощью метода выделения РНК и ДНК TRI REAGENT™ (Sigma, США). На пробу весом 25-50 мкг

добавляли 500 мкл реагента для выделения. Гомогенизировали при комнатной температуре. Центрифугировали, отбирали водную фракцию, осадок отбрасывали. В отобранную пробу добавляли хлороформ в объёме 100 мкл, центрифугировали, отбирали надосадок, обогащенный РНК. В надосадок добавляли 500 мкл изопропанола, перемешивали, центрифугировали, жидкую фазу убирали. В пробирку с осадком добавляли 500 мкл 75% этанола, центрифугировали, отбирали водную фазу и высушивали пробу с помощью вакуумного насоса. После чего добавляли RNA's Free воду в объёме 20 мкл. Пробы хранили в холодильнике при - 70°C до дальнейшего их использования.

Определение концентрации общей РНК в образцах проводили на спектрофотометре (Eppendorf BioPhotometer, Германия). Выравнивание концентраций РНК проводили с учетом данных фотометрирования. Целостность РНК анализировали методом электрофореза в 1% агарозном геле.

2.6.12. Обратная транскрипция

Синтез кДНК с помощью обратной транскрипции проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 1 мкг тотальной РНК, 200 единиц M-MLV обратной транскриптазы, однократный буфер для обратной транскриптазы, эквимольную смесь четырёх dNTP по 500 мкМ каждого, 1 мкМ смеси случайных праймеров и 25 единиц ингибитора РНКаз. Перед добавлением в инкубационную смесь РНК со случайными праймерами (фирмы «Syntol», Москва) отжигали в течение 5 мин при 70°C на амплификаторе CFX96 Real-TimeSystem BioRad (США). Реакцию проводили в течение 1 часа при 37°C.

2.6.13. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени

ПЦР проводили по инструкции для проведения ПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX96 Real-TimeSystem производства BioRad.

Для проведения ПЦР использовался коммерческий набор реактивов qPCRmix-HSSYBR-5x, содержащий Taq полимеразу, dNTP, буферный раствор и краситель Syber Green в оптимальных для проведения ПЦР концентрациях.

Подбор и проверка специфичности систем праймеров осуществляли с использованием онлайн-сервиса Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

tools/ primer-blast/), сочетающего в себе алгоритмы подбора/проверки праймеров с помощью Primer3 [247] и BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [248]. Для каждого праймера предварительно подбирали оптимальные условия, при которых реакции шли успешно. Последовательность праймеров и условия реакций представлены в таблице 1.

Таблица 2.1. – Последовательности используемых праймеров.

Название	Последовательность праймеров 5'→3'	Температура отжига °С	Длина продукта
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
GAPDH		60	198
Сусr	F GATTTGGCTATAAGGGTTC R GTTGTCCACAGTCGGAGA	60	357
ИЛ-1β		60	80
ФНОα		60	85
IBA-1		58	79
		60	91
		60	75
μ-кальпаин		57	144
m-кальпаин		60	195
кальпастатин		60	81

Во всех случаях ПЦР проводили в трёх параллелях в конечном объеме 10 мкл по следующей программе: «горячий старт» – 95°C 15 мин (активация полимеразы, согласно рекомендациям производителя); далее 50 циклов: 5 с при 95°C (денатурация ДНК-матрицы) и 10с при температуре отжига праймеров и элонгации с регистрацией флюоресценции.

Эффективность ПЦР проверяли в отдельном эксперименте методом серийных разведений. Во всех случаях эффективность была близка к 100%, на основании чего относительное содержание целевых мРНК рассчитывали с использованием $2^{\Delta\Delta Ct}$ метода [249]. Данные нормировали относительно среднего геометрического Ct, определенных для генов домашнего хозяйства. После проведения всех вычислений данные дополнительно нормировали на показатели контрольной группы с пересчетом ошибки как ошибки частного.

2.6.14. Высокоточная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

Образцы ткани гомогенизировали в 0,1М хлорной кислоте и центрифугировали при 10000g и +4°C в течение 30 минут. Супернатант отбирали и фильтровали через шприцевой фильтр с размером пор 0,2 мкм (Whatman, США). На анализ брали 20 мкл образца. ВЭЖХ проводили в изократических условиях с использованием обращённо-фазовой колонки (длина алкильной цепи C18) с последующей электрохимической детекцией. Количественное определение уровня моноаминов проводили с применением метода внешнего стандарта. Состав подвижной фазы: 75мМ фосфатный буфер, содержащий 2мМ лимонной кислоты (рН 4,6); 0,1 мМ октансульфоновой кислоты и 15%-ного ацетонитрила (V/V). Электрохимическая детекция осуществлялась стеклоуглеродным электродом при +700 мВ. Количество моноаминов в образце выражали в нг/мг белка, затем нормировали на контрольную группу и выражали в % относительно контрольной группы; ошибку пересчитывали как ошибку частного. Ниже представлены хроматограммы смеси внешних стандартов в концентрации 5 нг/мл (рис.2.1) и пример хроматограммы, полученной при анализе содержания

моноаминов в гомогенате клеток стриатума крысы контрольной группы (рис.2.2).



Рисунок 2.1 – Хроматограмма смеси внешних стандартов в концентрации 5нг/мл. Порядок выхода стандартов после пика ввода, заканчивающегося на 5-ой минуте: норадреналин, дофамин, 3,4-диоксифенилуксусная кислота, 5-оксииндолилуксусная кислота, серотонин, гомованилиновая кислота.



Рисунок 2.2 – Пример хроматограммы, полученной при анализе содержания моноаминов в гомогенате клеток стриатума крысы контрольной группы. Порядок выхода аналитов сохраняется.

2.6.15. Определение содержания ИЛ-1 β , ФНО-альфа в плазме крови крыс

Содержания ИЛ-1 β , ФНО-альфа в плазме крови крыс определяли методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческого набора реактивов: для определения уровня ИЛ-1бета использовали кит №

ab100767, Abscam; для определения ФНОальфа - № ab46070, Abscam в полном соответствии с инструкцией. В обоих случаях значение R^2 при построение калибровочной кривой составляло не менее 0,95. Диапазон обнаружения для ИЛ-1 β составил (68,59 – 50000) пг/мл, чувствительность < 80 пг/мл; ФНОальфа – (31,25 – 1000,00) пг/мл, чувствительность < 15 пг/мл.

2.6.16. Гистологические методы исследования

Головной мозг животных помещали в 10% раствор нейтрального формалина на 2 суток (в объеме, превышающем объем мозга в 30-40 раз). После фиксатора мозг промывали в проточной воде в течение суток, обезвоживали в спиртах восходящей крепости (сутки в 70 %, сутки в 90%, сутки в первой смене 96%, сутки во второй смене 96%), проводили через 2 смены абсолютного спирта (1 сутки в каждой смене), пропитывали ткань смесью петролейного эфира и абсолютного спирта 45 минут, держали в двух сменах петролейного эфира по 60 минут и, наконец, оставляли в смеси петролейного эфира и парафина на ночь в термостате при 37⁰Р. На следующий день мозг животных проводили через 2 смены расплавленного парафина при 57⁰С и заливали в парафиновые блоки.

Парафиновые срезы толщиной 7 мкм изготавливали на ротационном микротоме (Leica RM 2125RT, Германия). Для проведения гистологических и иммуногистохимических реакций предметные стекла обрабатывали запатентованным составом на основе бычьего сывороточного альбумина (BSA) (патент RU 2 386 137 С1) или использовали предметные стекла с поли-L-лизиновым покрытием. На каждом предметном стекле располагалось по 4 - 8 фронтальных срезов головного мозга. Для каждой реакции брали по два предметных стекла со срезами анализируемых областей мозга: черной субстанции или гиппокампа. Идентификацию структур мозга проводили по атласу Паксиноса и Уотсона [241].

Для проведения иммуногистохимической реакции на тирозингидроксилазу использовался протокол, указанный в Руководстве Д.Э. Коржевского [250]. Для окрашивания нервной ткани по методу Ниссля

толуидиновым синим, использовался следующий протокол. Проводили депарафинирование срезов в ксилоле и проведение через спирты с нисходящей крепостью до дистиллированной воды; окрашивание срезов в растворе 0,1 % толуидинового синего, 15-30 мин; промывку в дистиллированной воде; дифференцировку под микроскопом в 96%-ном этаноле с добавлением ледяной уксусной кислоты до исчезновения фоновой окраски нейропиля; промывку в 96% -ном этаноле; обезвоживание в абсолютном этаноле; просветление препаратов в ксилоле; заключение препаратов в синтетическую среду Cytoseal (ThermoScientific, США).

Анализ гистологических препаратов проводили на микроскопе Leica DM750 (Германия) с помощью фотокамеры ICC50 и программы обработки изображений LASEZ (Leica, Германия).

2.7. Компьютерные программы и базы данных, использованные в работе

Поиск сигнальных пептидов, определяющих способность кальпаинов секретироваться клетками по классическому пути, проводился с помощью инструмента PrediSi [251] (<http://www.predisi.de>). Вероятность секреции кальпаинов клетками по неклассическому пути рассчитывалась с помощью сервиса SecretomeP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP2.0> согласно рекомендациям, указанным в [252]).

Поиск потенциальных субстратов кальпаина среди внеклеточных белков проводили с помощью базы данных CaMPDB, Calpain for Modulatory Proteolysis Database [253] (<http://www.calpain.org/predict.rb?cls=substrate>).

Выравнивание аминокислотных последовательностей осуществляли в MultAlin [254] (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>).

2.8. Методы математической статистики

Обработка данных производилась с использованием пакета статистических программ «Statistica 10.0» (StatSoft, США). Нормальность распределения проверяли критерием Шапиро-Уилка. Для регистрируемых количественных переменных, в случае подтверждения гипотезы о нормальности распределения, рассчитывались среднее значение параметра в

группе (Mean) и ошибка среднего (\pm SEM); в противном случае - медиана (нижняя квантиль; верхняя квантиль). Данные для контрольных и экспериментальных групп подвергались статистической обработке с использованием параметрических критериев (тест Стьюдента - в случае двух групп; дисперсионный анализ с последующим применением post hoc критерия Тьюки – в случае трех или более групп) или непараметрических критериев (Краскела-Уоллиса и Ньюмана-Кейлса). Для сравнения долей использовался точный критерий Фишера с поправкой на множественные сравнения.; для выявления статистических зависимостей рассчитывали коэффициент корреляции Кендалла. Значимыми считались различия при $p < 0,05$.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Влияние различных биологически активных веществ на активность кальпаинов *in vitro*

Обоснование выбора биологически активных веществ. Для проверки возможности регуляции активности кальпаинов с помощью биологически активных веществ (БАВ) нами были выбраны следующие препараты.

МФТП (МРТР) — 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин — органическое соединение, проникает через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), метаболизируется до токсичного катиона 1-метил-4-фенилпиридиния (МФП+) под действием моноаминоксидазы типа В (МАО-В) и блокирует комплекс I в цепи переноса электронов, что приводит к гибели клеток (преимущественно, ДА-нейронов). Соединение используется в промышленности, применяется для моделирования БП на лабораторных животных [255].

$MnCl_2$ — неорганическое соединение, проникает через ГЭБ, используя транспортеры двухвалентных металлов и/или транспортер дофамина; накапливается преимущественно астроцитами, токсичен для ДА-, ГАМК-, АцХ-ергических нейронов. Соединение широко используется в промышленности, применяется для моделирования марганцевой энцефалопатии на лабораторных животных [256].

3-НПК — 3-нитропропионовая кислота — органическое соединение, проникает через ГЭБ, ингибирует сукцинатдегидрогеназу в митохондриальной цепи переноса электронов (комплекс II), что приводит к нарушению метаболизма глюкозы, снижению синтеза АТФ, образованию АФК, преимущественно страдают ДА-нейроны. Является микотоксином, используется для моделирования БП и болезни Гентингтона [257].

ЛПС — липополисахарид, эндотоксин, основной компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Макромолекула, состоящая из полисахарида, ковалентно соединённого с липидом, предположительно

проникает через ГЭБ, инициируя нейровоспаление; в субсептических дозах используется для моделирования БП [258, 259].

Для проверки способности выбранных соединений напрямую активировать кальпаины был применён модифицированный метод казеиновой зимографии в геле (см. п. 2.6.8). Оказалось, что из всех тестируемых соединений только хлорид марганца вызывает активацию μ -кальпаина, при этом m -кальпаин в этих условиях не активируется (рис. 3.1.1.).

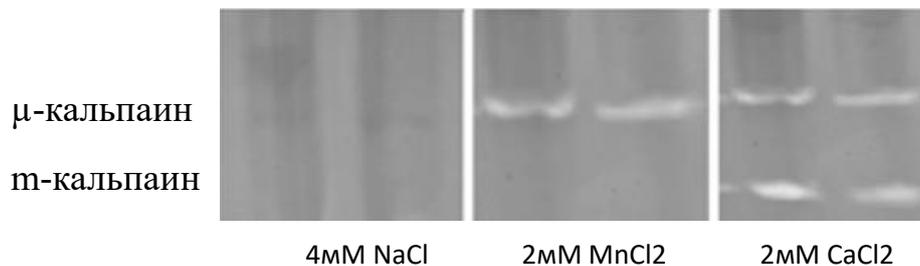


Рисунок 3.1.1 - Влияние хлорида марганца на активность кальпаинов в системе *in vitro*. Казеиновая зимограмма: светлые полосы свидетельствуют об активации кальпаинов.

Инкубация гелей в растворе для активации кальпаинов, содержащем 0,1 и 0,5 мМ МФТП (концентрация токсина выбрана, исходя из данных литературы [260]), не привела к активации кальпаинов (рис. 3.1.2.).

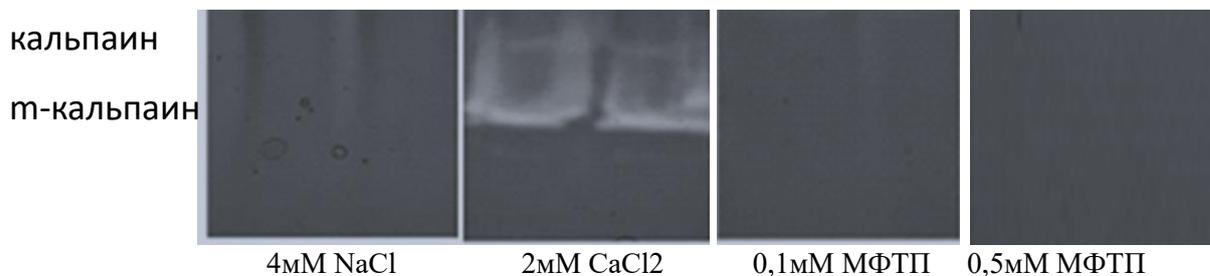


Рисунок 3.1.2 - Влияние МФТП на активность кальпаинов в системе *in vitro*. Казеиновая зимограмма: светлые полосы свидетельствуют об активации кальпаинов.

При добавлении в раствор для активации кальпаинов 1мМ или 10 мМ 3-НПК (концентрация 3-НПК подобрана, исходя из данных [261]), а также ЛПС (5 мкг/мл активационного раствора) активации кальпаинов также не наблюдалось (данные не показаны).

Таким образом, из всех тестируемых соединений способностью напрямую активировать μ -кальпаин обладает только хлорид марганца (при

концентрации в растворе для активации от 2 мМ). Исходя из этого, можно однозначно заключить, что μ -кальпаин активируется в присутствии ионов марганца, однако в отношении m -кальпаина такого вывода сделать нельзя. В литературе существуют примеры, демонстрирующие активацию кальций-связывающих белков (к которым относятся кальпаины) в присутствии марганца, например, установлен факт активации кальмодулина (СМ). СМ - член EF-hand семейства, который регулирует многие функции клеток и активируется в присутствии Ca^{2+} . С помощью метода рентгеноструктурного анализа было показано, что кроме Ca^{2+} с N-концевым доменом кальмодулина могут связываться и другие металлы: Mg^{2+} , Mn^{2+} и Zn^{2+} . Причем марганец связывался с N-концевым доменом кальмодулина гораздо сильнее, чем магний и цинк, и был способен его активировать [262].

Подобные исследования в отношении кальпаинов тоже проводились, но для анализа их активности был использован метод казеиновой зимографии в растворе [263]. Авторы работали на выделенных препаратах кальпаинов рыб. Была исследована способность некоторых ионов двух- и трехвалентных металлов (Ca^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+}) активировать кальпаины (катионы были добавлены в концентрации 2,5 мМ в составе солей хлора). Как и следовало ожидать, Ca^{2+} оказался самым эффективным активатором кальпаинов. Аппликация других солей давала различные результаты: от неполной активации до ингибирования. Слабая (около 10% от Ca^{2+} -индуцированной) активация кальпаинов была обнаружена при добавлении Mn^{2+} , а также Co^{2+} , Ba^{2+} и Cu^{2+} . Однако следует обратить внимание на то, что авторы в своём исследовании не разделяли μ - и m -кальпаин. В данной работе установлено, что *в присутствии хлорида марганца активируется исключительно μ -кальпаин*.

Далее была определена активность кальпаинов в выделенных нервных окончаниях – синапсосомах, являющихся наилучшей моделью для изучения синаптической передачи [264], – после их инкубации с тестируемыми БАВ (отметим, что в нервных окончаниях присутствует исключительно m -

кальпаин [265, 266]). Для этого в пилотном эксперименте методом центрифугирования в градиенте сахарозы получили препараты синапсом. Затем инкубировали их в растворе Рингера-Кребса (без добавления кальция) в присутствии различных добавок, после чего «остаточная» активность *m*-кальпаина анализировалась с помощью казеиновой зимографии в геле. Отрицательным контролем служил образец, к которому добавляли ЭДТА, а положительным – 1мМ CaCl₂. Для подтверждения того, что казеин расщепляется именно кальпаином в инкубационную среду были добавлены синтетические ингибиторы кальпаина – ингибитор кальпаина I и ингибитор кальпаина II. Результаты представлены на рис. 3.1.3.

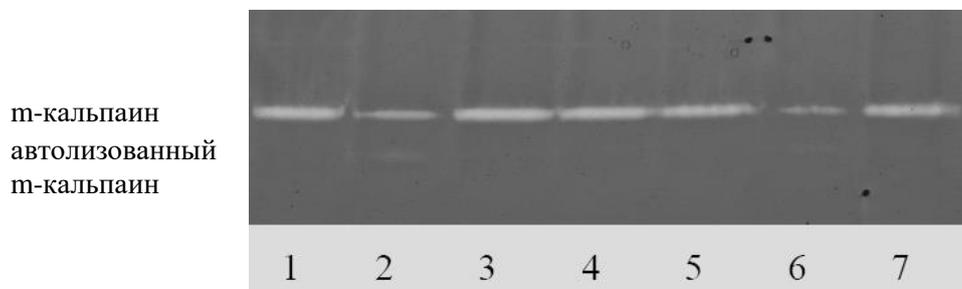


Рисунок 3.1.3 - Казеиновая зимограмма, отражающая «остаточную» активность *m*-кальпаина после инкубации синапсом с различными добавками:

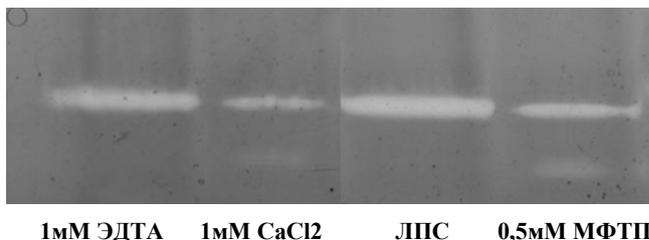
1. 1мМ ЭДТА
2. 100 мкМ CaCl₂
3. 50 мкМ ингибитора кальпаина I + 50 мкМ ингибитора кальпаина II
4. 50 мкМ ингибитора кальпаина I + 50 мкМ ингибитора кальпаина II, 100 мкМ CaCl₂
5. без добавок
6. 1мМ CaCl₂
7. 50 мкМ ингибитора кальпаина I + 50 мкМ ингибитора кальпаина II, 1 мМ CaCl₂

Оказалось, что инкубация выделенных нервных окончаний (синапсом) в течение 30 мин при 37⁰С в безкальциевом растворе Рингера-Кребса никак не сказывается на активности кальпаина. Инкубация синапсом в присутствии 1 мМ ЭДТА, 50 мкМ ингибитора кальпаина I (N-Ас-Leu-Leu-porleucinal) и 50 мкМ ингибитора кальпаина II (N-Ас-Leu-Leu-methioninal) не вызывала изменения активности синапсомального *m*-кальпаина (во время инкубации синапсом *m*-кальпаин находился в неактивном состоянии, поэтому «остаточная активность» - максимальная), а аппликация 1мМ CaCl₂ вызвала активацию *m*-кальпаина (это отражается в уменьшении площади

зоны, соответствующей *m*-кальпаину и в появлении прозрачной зоны ниже основной). При этом добавление ингибиторов кальпаина совместно с 1мМ CaCl₂ приводило к снижению активности кальпаина. Таким образом, с помощью данного метода можно определить зависимость активности кальпаинов от содержания различных добавок в среде для инкубации синапсом. Затем, сохраняя дизайн эксперимента, мы проверили способность МФТП, MnCl₂, 3-НПК и ЛПС регулировать активность *m*-кальпаина. Для этого синапсомы в течение 30 минут инкубировали в присутствии 0,5 мМ МФТП, 2мМ MnCl₂, 1мМ 3-НПК и ЛПС (5 мкг/мл образца), данные представлены на рис. 3.1.4 (А и Б).

А.

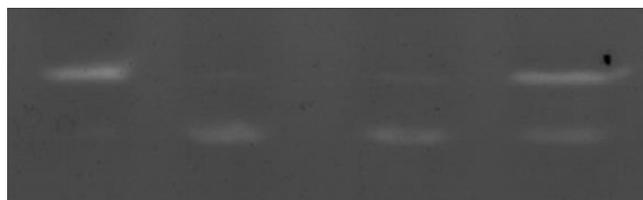
***m*-кальпаин
автолизированный
m-кальпаин**



1мМ ЭДТА 1мМ CaCl₂ ЛПС 0,5мМ МФТП

Б.

***m*-кальпаин
автолизированный
m-кальпаин**



1мМ ЭДТА 1мМ CaCl₂ 2мМ MnCl₂ 1мМ 3-НПК

Рисунок 3.1.4 - Казеиновая зимограмма, отражающая «остаточную» активность *m*-кальпаина после инкубации синапсом с ЛПС (5 мкг/мл образца), 0,5 мМ МФТП (А) и с 2мМ MnCl₂, 10мМ 3-НПК (Б). Отрицательным контролем служил образец, к которому добавляли 1мМ ЭДТА, а положительным – 1мМ CaCl₂.

Как видно из данных, представленных на рис. 3.1.4, добавление в среду для инкубации синапсом 0,5 мМ МФТП или 1мМ 3-НПК приводило к активации синапсомального *m*-кальпаина, но его активность была ниже, чем при добавлении 1 мМ CaCl₂. В случае же с инкубацией синапсом в присутствии 2мМ MnCl₂ активность *m*-кальпаина была сопоставима с таковой

при аппликации 1 мМ CaCl_2 . Добавление ЛПС никак не сказалось на активности m-кальпаина.

Действие различных БАВ на модели синапсом изучалось и ранее, в том числе на исследуемых нами соединениях. Например, было показано, что аппликация 0,5 мМ МФТП к синапсосомам, выделенным из стриатума крыс Спрег-Доули, вызывает подавление продукции АТФ синапсосомальными митохондриями и, как следствие, приводит к 2-х кратному, по сравнению с контролем, снижению способности синапсом поглощать дофамин (энергозависимый процесс), однако генерации свободных радикалов при этом не происходит. Авторы считают, что обнаруженный эффект вызван ингибирующим действием МФТП на продукцию АТФ в синапсосомах [260]. Принимая во внимание наши данные, весьма вероятно следующая цепь событий: аппликация МФТП к синапсосомам вызывает активацию m-кальпаина по пока еще нераскрытому механизму; активированный кальпаин, согласно данным [267], расщепляет АТР5А1 субъединицу АТФ-синтазы, что и вызывает снижение продукции АТФ.

В ранних работах Egecińska M. (1994) было показано, что добавление к синапсосомам 3-НПК вызывает дозозависимое снижение потребления кислорода: на 11% при аппликации 1 мМ 3-НПК и на 27% - 2 мМ 3-НПК, при этом продукция лактата увеличивается в 2 и 3 раза соответственно, возрастает также отношение лактат/пируват. Кроме этого, на 14% снижается содержание АТФ [261]. Оказалось, что в синапсосомах, выделенных из стриатумов крыс, получивших внутрибрюшинную инъекцию 3-НПК в дозе 20 мг/кг, наблюдается снижение активности сукцинатдегидрогеназы в три раза, увеличение активности СОД в 1,8 раза [268]. Все эти данные в совокупности свидетельствуют о нарушении энергетических процессов. В дополнение, на выделенных нервных окончаниях показано ингибирующее действие 3-НПК в отношении MAO-A, приводящее к накоплению в синапсе дофамина и, в условиях недостатка АТФ (нарушается упаковка дофамина в везикулы), увеличению содержания ДА-хинона в синаптическом окончании [269]. В

связи с этими данными мы проверили влияние активации синаптосомального m-кальпаина на содержание дофамина в инкубационной среде синаптосом. Оказалось, что добавление 1мМ ЭДТА приводило к снижению ($p=0,001$), а 1мМ CaCl_2 – к увеличению ($p=0,002$) уровня дофамина в инкубационной среде по сравнению с образцом без добавок, что свидетельствует об адекватности проведения эксперимента. Добавление же синтетических ингибиторов кальпаина вызывало повышение уровня внесинаптосомального дофамина по сравнению с инкубированным без добавок контролем ($p=0,001$ и $p=0,02$ для ингибитора кальпаина I и II соответственно), но не достигало уровня положительного контроля ($p=0,02$ для обоих ингибиторов по сравнению с добавлением 1мМ CaCl_2). Данные представлены на рис. 3.1.5.

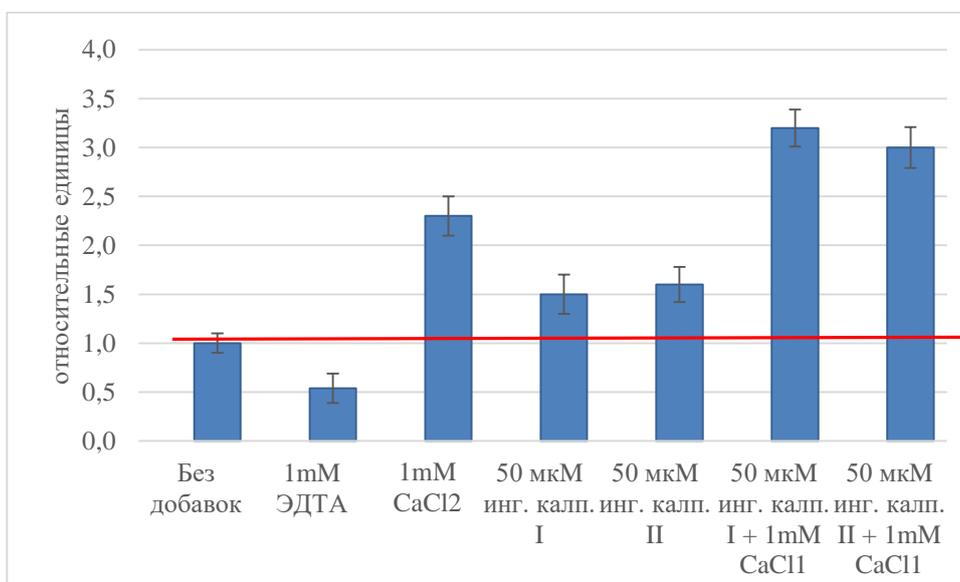


Рисунок 3.1.5 - Уровень дофамина в среде после инкубации синаптосом с различными добавками. Данные представлены как среднее \pm СКО, дисперсионный анализ с последующим применением критерия Тьюки (три независимых опыта).

Уровни значимости указаны в тексте. Красной линией указан уровень контрольных значений.

Эффект ингибиторов в присутствии ионов кальция был аналогичным: одновременное добавление к синаптосомам 1мМ CaCl_2 и 50мкМ соответствующего ингибитора приводило к увеличению уровня дофамина в среде по сравнению с образцом, к которому добавляли только 1мМ CaCl_2 ($p=0,02$ и $p=0,03$ для ингибитора кальпаина I и II соответственно). Таким

образом, на модели синаптосом, нами было показано, что *подавление активности кальпаинов вызывает увеличение уровня внесинаптосомального дофамина как в присутствии ионов кальция, так и без добавления CaCl_2 , следовательно, изменение активности т-кальпаина сказывается на функциональной активности дофаминергического синапса.*

Возможны три механизма повышения уровня внеклеточного дофамина при воздействии ингибиторами кальпаина: во-первых, «обращение» работы обратного транспортера дофамина – DAT; во-вторых, стимулирование перехода дофамина из везикулярного пула в цитоплазматический с пополнением пула дофамина, доступного для высвобождения; в-третьих, может иметь место ингибирующий эффект в отношении MAO A или B.

Выявленный нами факт и выдвинутые предположения частично находят подтверждение в данных литературы. Однако в работах по этому направлению обычно анализируется только способность кальпаина расщеплять белки, принимающие участие в секреции, рецепции и рециклинге дофамина, а связь между степенью активации кальпаинов и уровнем секреции дофамина никак не обсуждается. Например, было показано, что кальпаин расщепляет синаптосомальный белок SNAP-25 (synaptosomal-associated protein of 25 kDa), приводя тем самым к нарушению экзоцитоза синаптических везикул [227]. Исходя из полученных нами данных, можно предположить, что, ингибируя кальпаин, мы предотвращаем расщепление белка SNAP-25 и тем самым снимаем один из факторов, подавляющих секрецию дофамина. Еще одна из наиболее вероятных причин повышения уровня внесинаптосомального дофамина в условиях подавления активности кальпаинов связана с его способностью расщеплять белок DAT (dopamine transporter). Протеолиз происходит между лейцином⁷¹ и серином⁷² (для DAT человека) и лишает транспортер способности высвобождать дофамин во внеклеточную среду, не нарушая процесс обратного захвата [232]. На основании этого наблюдения становится понятной причина повышения концентрации дофамина в безкальциевой инкубационной среде с добавлением ингибиторов кальпаина:

подавляется расщепление кальпаином протеинкиназы С; не образуется протеинкиназа М (ПКМ); DAT не фосфорилируется и выход дофамина не блокируется [164]. Таким образом, активация m-кальпаина, наблюдаемая нами при добавлении к синапсосомам 1мМ 3-НПК, может приводить к расщеплению DAT и, как следствие, к снижению содержания внесинапсосомального дофамина.

Как уже было описано выше, наиболее близкой к кальций-индуцированной активации m-кальпаина удалось добиться при добавлении в среду для инкубации синапсосом 2мМ $MnCl_2$ (рис. 3.1.4 Б). Способность марганца *in vivo* активировать кальпаины ранее уже была показана. Например, в работе Wang et al. (2017) было обнаружено, что внутрибрюшинное введение мышам $MnCl_2$ в дозе 100 мкмоль/кг приводит к 3-х кратному увеличению содержания внутриклеточного кальция в стриатуме и повышению активности кальпаинов почти в 4 раза относительно контроля. При этом синапсосомы, выделенные из стриатумов экспериментальных животных, обладали сниженной способностью к секреции нейромедиаторов, причем этот эффект был связан с вызванной активацией кальпаина нарушением формирования комплекса SNARE и блокировался калпептином [270]. Поскольку в наших экспериментах $MnCl_2$ добавлялся непосредственно к синапсосомам и вызывал активацию m-кальпаина, можно предположить, что выявленная коллегами цепь событий происходит именно в нервных окончаниях, хотя исключить опосредованного влияния, например, через вызванную накоплением марганца в ЦНС активацию микроглиальных клеток, секрецию ими провоспалительных факторов и уже затем активацию кальпаинов в нейронах, нельзя. Кроме этого, нельзя исключить и то, что в условиях *in vivo* и в выделенных нервных окончаниях, в отличие от экспериментов в системе *in vitro*, возможна прямая активация m-кальпаина ионами марганца.

Добавление ЛПС к синапсосомам никак не сказалось на активности m-кальпаина. Идея данной части эксперимента была основана на данных, демонстрирующих ответ первичной нейрональной культуры на аппликацию

ЛПС [271]. Авторы данного исследования показали, что TLR4 рецептор, с которым взаимодействует ЛПС, продуцируется нейронами, а добавление ЛПС к культуральной среде приводит к секреции нейронами ФНО α , ИЛ-6, хемокина CXCL1. Мы полагали, что ЛПС при добавлении к синапсосомам свяжется со своим рецептором, инициируя продукцию провоспалительных агентов, и, как следствие, произойдет активация m-кальпаина. Однако этого не произошло. Вероятно, TLR4 не представлены в области синаптических окончаний (данные за и против этого предположения в литературе отсутствуют), или же силы оказываемого воздействия недостаточно для активации m-кальпаина.

Таким образом, хлорид марганца in vitro в концентрации 2мМ и выше вызывает активацию μ -кальпаина, активации m-кальпаина не происходит; хлорид марганца (2мМ), МФТП (0,5 мМ), 3-НПК (1мМ) вызывают активацию m-кальпаина в выделенных нервных окончаниях (синапсосомах), ЛПС (5 мкг/мл) такого эффекта не оказывает. Подавление активности синапсосомального m-кальпаина вызывает увеличение уровня внесинапсосомального дофамина вне зависимости от присутствия CaCl₂ в среде.

Резюмируя, можно заключить: тропные к ДА-нейронам токсины (MnCl₂, МФТП, 3-НПК) вызывают активацию m-кальпаина в нервных окончаниях, что приводит к снижению содержания дофамина во внеклеточном пространстве, т.е. сказывается на функционировании дофаминергической нейромедиаторной системы. Однако вопрос о способности нервных окончаний высвободить/секретировать m-кальпаин во внеклеточное пространство остается открытым.

3.2. Влияние биологически активных веществ на способность т-кальпаина высвободиться из синапсом

Общепризнано, что кальпаины локализуются исключительно внутриклеточно [25], но их субклеточная локализация различна и зависит от типа клетки и ее функционального состояния, например, она меняется в зависимости от уровня внутриклеточного кальция. Так, на клетках COS7 показано, что в отсутствие каких-либо внешних воздействий кальпаины диффузно распределены в цитоплазме; после обработки клеток ионофором кальция кальпаин обнаруживается уже вблизи плазматической мембраны [99]. Немногочисленные экспериментальные исследования свидетельствуют о внеклеточной локализации кальпаинов. В частности, кальпаины найдены в различных биологических жидкостях человека (сыворотка крови, ликвор, синовиальная жидкость). Например, кальпаин находили в синовиальной жидкости пациентов с ревматоидным артритом или остеоартритом, но кальпаин не обнаруживался в биологической жидкости волонтеров из контрольной группы [272]; кальпаины находили в сыворотке крови пациентов с нарушениями свертываемости крови [119], в ликворе пациентов с болезнью Альцгеймера [120]. Причем уровень т-кальпаина в ликворе этих пациентов был в среднем в 2,5 раза выше, чем в контроле, и увеличивался по мере снижения их когнитивных способностей. Этот факт объясняли пассивным высвобождением кальпаина из поврежденных клеток. Однако в исследовании Laske с соавторами (2015) было показано наличие около 100 пМ/л т-кальпаина в СМЖ относительно здоровых доноров. Этот факт уже тяжело объяснить высвобождением кальпаина поврежденными клетками.

В связи с этим мы проверили наличие т-кальпаина в среде после инкубации синапсом. Для этого синапсомы 30 мин инкубировали в присутствии 1мМ CaCl₂ (кальпаин активен). После инкубации образцы центрифугировали, а в надосадочной жидкости методом иммунопреципитации идентифицировали т-кальпаин. Результаты приведены на рис. 3.2.1.

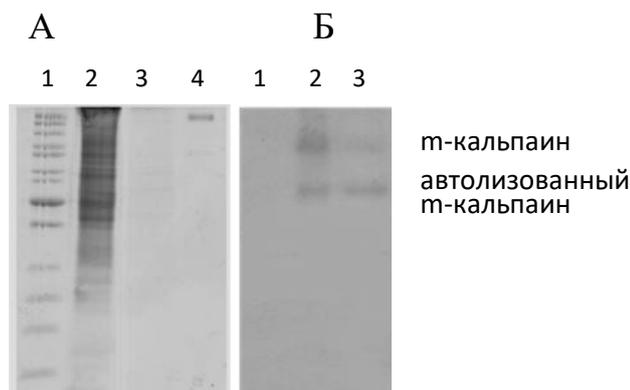


Рисунок 3.2.1 – Обнаружение кальпаина в среде после инкубации синаптосом. А. Электрофореграмма (с целью недопущения совпадения электрофоретической подвижности кальпаина с антителами к нему во всех растворах отсутствует β -меркаптоэтанол): 1. Маркеры молекулярного веса 2. Гомогенат синаптосомальной фракции 3. Преципитат из инкубационной среды 4. Антитела к m-кальпаину. Б. Иммуноблотт, проявленный антителами против m-кальпаина, дорожки соответствуют 1-3 на электрофореграмме. Верхняя зона соответствует m-кальпаину, нижняя – его автолизированной форме.

Оказалось, что после инкубации синаптосом в присутствии 1мМ CaCl_2 в среде присутствует как полноразмерная (в меньшем количестве), так и автолизированная (преобладает) форма m-кальпаина. Однако существует вероятность, что m-кальпаин автолизует уже после высвобождения в инкубационную среду, в которой присутствует достаточное для активации кальпаина количество ионов кальция. Для проверки этой гипотезы мы инкубировали синаптосомы в безкальциевом растворе Рингера-Кребса, а также в присутствии 10 мкМ и 100 мкМ CaCl_2 . Иммуноблотт преципитатов из инкубационной среды синаптосом, проявленный антителами против m-кальпаина, приведен на рис. 3.2.2.

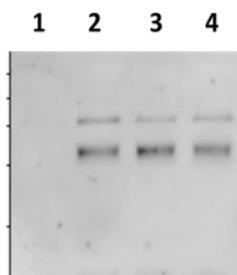


Рисунок 3.2.2 – Обнаружение кальпаина в среде после инкубации синаптосом в присутствии различных концентраций CaCl_2 . 1. Преципитат из инкубационной среды без добавления CaCl_2 2. 10мкМ CaCl_2 3. 100мкМ CaCl_2 4. 1мМ CaCl_2 .

Как видно из рис. 3.2.2, в отсутствие кальция кальпаин в инкубационной среде не обнаруживается, а при добавлении кальция, вне

зависимости от используемых концентраций, визуализируются обе зоны (соответствующие полноразмерной и автолизованной молекуле m-кальпаина). Однако стоит отметить, что с увеличением концентрации кальция в растворе Рингера-Кребса доля полноразмерной молекулы кальпаина снижается. Таким образом, вероятны, как минимум, два сценария: из синапсом в присутствии ионов кальция высвобождается m-кальпаин, в инкубационной среде кальпаин подвергается автолизу; или же синаптосомальный кальпаин активируется, в инкубационную среду высвобождается m-кальпаин и его автолизованная форма. Однако нельзя исключить, что во время инкубации синаптосомы потеряли свою целостность и их содержимое (в том числе и m-кальпаин) оказалось в инкубационной среде. Для исключения последнего варианта мы проанализировали содержание в инкубационной среде цитоплазматического фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Этот метод обычно используют для контроля целостности клеток, но он применим и при работе с синаптосомами [242]. Оказалось, что при инкубации синаптосом как в отсутствие каких-либо добавок, так и в растворе Рингера-Кребса, содержащем 10мкМ CaCl₂, 100мкМ CaCl₂, 1мМ CaCl₂, 1мМ ЭДТА, активность ЛДГ в инкубационной среде не меняется и составляет около 3% от общей активности (активность ЛДГ в гомогенате синаптосом, обработанных ультразвуком – полное нарушение целостности) (рис. 3.2.3), поэтому обнаружение m-кальпаина в инкубационной среде синаптосом не может быть вызвано их разрушением.

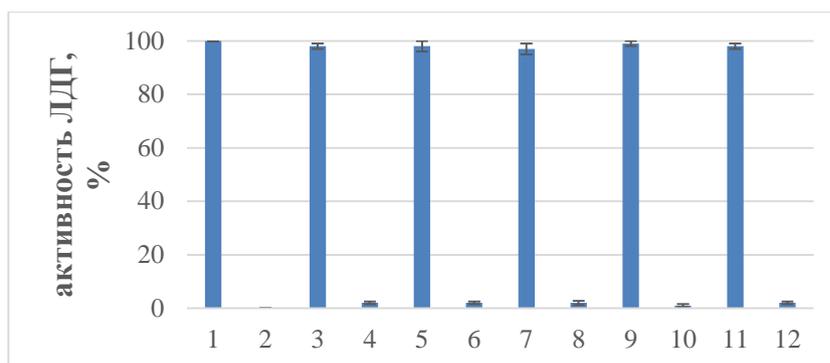


Рисунок 3.2.3 – Активность ЛДГ в синапсах и в инкубационной среде после аппликации к синапсам различных добавок. За 100 % принята активность ЛДГ в гомогенате синапсом, обработанных ультразвуком (полное нарушение целостности синапсом).

1. Гомогенат синапсом после обработки ультразвуком; 2. Буфер Рингера-Кребса; 3. Синапсомы, инкубация 30 мин без добавок; 4. Инкубационная среда от синапсом, инкубированных без добавок; 5, 7, 9, 11 – синапсомы, инкубация 30 мин при добавлении 1мМ ЭДТА, 10 мкМ CaCl₂, 100 мкМ CaCl₂, 1мМ CaCl₂ соответственно; 6, 8, 10, 12 - Инкубационная среда от синапсом, инкубированных при добавлении 1мМ ЭДТА, 10 мкМ CaCl₂, 100 мкМ CaCl₂, 1мМ CaCl₂ соответственно.

Вне зависимости от того, какая именно из двух «оставшихся» цепочек событий имеет место, нельзя отрицать, что возможно высвобождение или даже секреция кальпаинов из клетки.

Выявленный нами факт находит подтверждение в работах других научных групп. Так, Deshpande R.V. с коллегами (1995) выявили, что стимуляция лимфоидных клеток линии U-937, ТНР-1 фторболовым эфиром совместно с Ca²⁺ ионофором, приводит к появлению кальпаина в культуральной среде [273]. Исследования клеток карциномы человека NCI-N69 показали, что основной компонент сигаретного дыма нитрозамин стимулирует «секрецию» μ - и m -кальпаина во внеклеточный матрикс [113]. Однако в литературе никак не обсуждается вопрос о сохранении кальпаином активности после его высвобождения во внеклеточное пространство. Судя по нашим данным, во внеклеточном матриксе может присутствовать полноразмерная молекула m -кальпаина (способная к активации) и его автолизированная форма (активная), т. е. m -кальпаин должен находиться в активной или способной к активации форме. Для проверки этой гипотезы был проведен следующий эксперимент. Синапсомы инкубировали 30 мин

в растворе Рингера-Кребса, содержащем 10мкМ CaCl_2 , 100мкМ CaCl_2 , 1мМ CaCl_2 , 1мМ ЭДТА; после инкубации собирали надосадочную фракцию, отбирали часть для определения активности ЛДГ, во все пробы добавляли равное количество FITC-казеина, и CaCl_2 до 5 мМ; инкубировали 60 мин; после инкубации пробы разделяли в ПААГ и анализировали степень расщепления казеина. Если во время инкубации синапсом (инкубация 1) кальпаин высвободился в инкубационную среду, то во время инкубации с FITC-казеином (инкубация 2) кальпаин активируется и расщепит казеин. Результаты приведены на рис. 3.2.4.

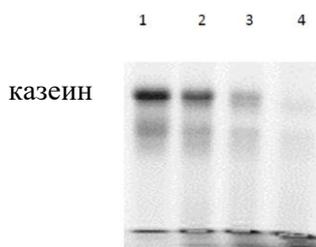


Рисунок 3.2.4 – Казеинограмма, отражающая доза-зависимую (от содержания ионов кальция в среде) способность *m*-кальпаина высвобождаться из синапсом. 1. 1 мМ ЭДТА 2. 10 мкМ CaCl_2 3. 100 мкМ CaCl_2 4. 1 мМ CaCl_2 .

Таким образом, *m*-кальпаин после высвобождения из синапсом сохраняет свою протеолитическую активность, причем, при увеличении содержания ионов кальция в растворе Рингера-Кребса (во время инкубации 1), уровень внесинапсомального кальпаина увеличивается, т. е. наблюдается доза-зависимая (от содержания ионов кальция в среде) способность *m*-кальпаина высвобождаться синапсомами. Полученные нами данные расширяют трактовку результатов наших коллег [274]. В СМЖ пациентов с болезнью Альцгеймера ими был обнаружен белок нейграницин (постсинаптический кальмодулин (CaM)-связывающий белок) и его протеолитические фрагменты. Поскольку другой пресинаптический CaM-связывающий белок GAP-43 является субстратом кальпаина [230], было сделано предположение, что фрагменты нейграницина в СМЖ являются продуктами его протеолиза кальпаином. Эта гипотеза подтвердилась в экспериментах *in vitro*, однако остался нерешенным вопрос как фрагменты

нейрограна оказались в СМЖ. Авторы рассматривали только одну гипотезу: у пациентов с болезнью Альцгеймера наблюдается активация кальпаинов, кальпаины расщепляют нейрогранин, целостность клетки нарушается и в СМЖ оказываются нейрогранин, фрагменты нейрогранаина, кальпаины. В таком случае уровень кальпаина в СМЖ тоже можно было бы рассматривать как диагностический маркер болезни Альцгеймера, или же уровень нейрогранаина был бы связан с выраженностью гибели нейронов при других нейродегенеративных заболеваниях, но в ряде исследований сообщается о специфичности этого показателя для болезни Альцгеймера. Мы полагаем, что нейрогранин по неизвестному, но специфичному для болезни Альцгеймера механизму, оказывается в СМЖ и уже там подвергается расщеплению кальпаином, который высвободился или секретировался синаптическими окончаниями. Далее мы проанализировали зависимость между временем инкубации синапсом в растворе Рингера-Кребса в присутствии CaCl_2 и уровнем m-кальпаина в инкубационной среде (рис. 3.2.5). Для контроля целостности синапсом в надосадочной жидкости, полученной от образцов 1-12, анализировалась активность ЛДГ; во всех пробах активность фермента не превышала 1-2 % от активности ЛДГ в гомогенате соответствующих синапсом, обработанных ультразвуком (данные не показаны). Поэтому кальпаин не мог оказаться в инкубационной среде вследствие нарушения целостности синапсом.

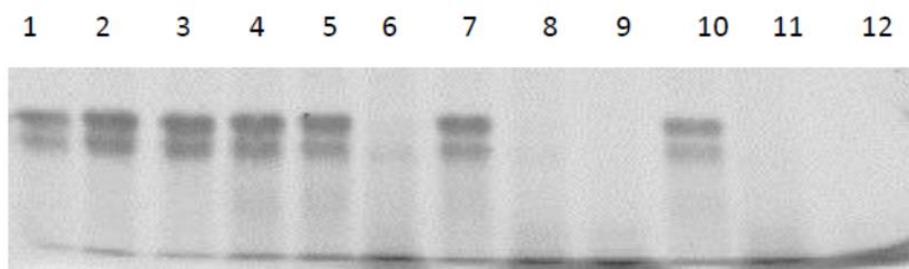


Рисунок 3.2.5 – Казеинограмма, отражающая зависимость между временем инкубации синапсом в растворе Рингера-Кребса в присутствии CaCl_2 и уровнем внесинапсомального кальпаина. 1-3 инкубация в присутствии 1мМ ЭДТА (30, 60 и 90 минут); 4-6 инкубация в присутствии 10 мкМ CaCl_2 (30, 60 и 90 минут); 7-9 инкубация в присутствии 100 мкМ CaCl_2 (30, 60 и 90 минут); 10-12 инкубация в присутствии 1 мМ CaCl_2 (30, 60 и 90 минут).

При увеличении времени инкубации от 30 мин до 90 мин степень расщепления казеина, судя по результатам денситометрирования соответствующих зон, пропорционально увеличивается, $R=0,82$, $p<0,05$ (данные по пяти независимым опытам). В отсутствие ионов кальция в среде (к буферу Рингера-Кребса добавляли 1мМ ЭДТА), как и было показано ранее, высвобождения т-кальпаина из синапсом не происходило.

Для дополнительного подтверждения того, что в ходе инкубации 2 расщепление FITC-казеина происходит именно под действием кальпаинов, нами был проведен дополнительный опыт. В инкубационную среду при проведении казеинолиза добавляли ингибиторы кальпаина. План эксперимента: выделяли синапсомы из клеток стриатума; переводили их в раствор Рингера-Кребса и разделяли на четыре равных порции; пробу №1 инкубировали 120 мин (с избытком) в присутствии 1мМ ЭДТА, пробы № 2, 3 и 4 в присутствии 1мМ $CaCl_2$; отбирали инкубационную среду, в пробу №3 добавляли 50 мкМ ингибитора кальпаина I, в пробу №4 - 50 мкМ ингибитора кальпаина II; затем в инкубационные среды от проб №1-4 добавляли 5мМ $CaCl_2$, FITC казеин, буфер для проведения казеинолиза; пробы инкубировали 12 часов. Данные представлены на рис. 3.2.6.

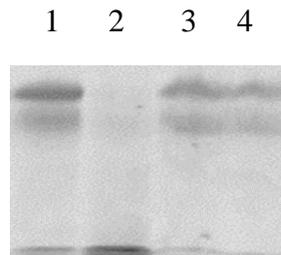


Рисунок 3.2.6 – Казеинограмма, отражающая подавляющее влияние ингибиторов кальпаина на расщепление FITC-казеина при проведении казеинолиза в среде после инкубации синапсом. 1. Среда после инкубации синапсом в присутствии 1мМ ЭДТА, при проведении казеинолиза добавлялся стандартный раствор; 2. Среда после инкубации синапсом в присутствии 1мМ $CaCl_2$, при проведении казеинолиза добавлялся стандартный раствор; 3. Среда после инкубации синапсом в присутствии 1мМ $CaCl_2$, при проведении казеинолиза в стандартный раствор добавлялось 50 мкМ ингибиторов кальпаина I; 4. Среда после инкубации синапсом в присутствии 1мМ $CaCl_2$, при проведении казеинолиза в стандартный раствор добавлялось 50 мкМ ингибиторов кальпаина II.

Таким образом мы дополнительно подтвердили, что расщепление FITC-казеина действительно происходит под действием кальпаина.

В ряде экспериментов после инкубации синапсом в присутствии 1мМ ЭДТА или 1мМ CaCl₂, отделив инкубационную среду, мы переводили синапсомы в раствор Рингера-Кребса, содержащий 150 мМ KCl (далее раствор D-Рингера-Кребса - модель деполяризации). В ответ на такое воздействие синапсомы отвечали выбросом во внесинапсомальную среду нейромедиаторов (в наших экспериментах анализировалось содержание дофамина, поскольку синапсомы выделяли из ткани стриатума), кроме этого, в инкубационной среде наблюдалось увеличение активности m-кальпаина (рис. 3.2.7). Таким образом, такой физиологический стимул как деполяризация, по-видимому, вызывает высвобождение/секрецию m-кальпаина из синапсом, что в совокупности с данными о зависимости этого процесса от содержания ионов кальция в среде позволяет предположить, что секреция происходит путем экзоцитоза.

1 2 3 4 5

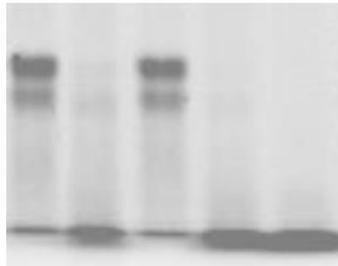


Рисунок 3.2.7 – Казеинограмма, отражающая влияние деполяризации синапсом на уровень кальпаина в инкубационной среде. 1. Инкубация синапсом в растворе Рингера-Кребса, содержащем 1мМ ЭДТА; 2. Инкубация синапсом в растворе Рингера-Кребса, содержащем 1мМ CaCl₂; 3. Проба № 1 после смены инкубационной среды на «свежий» раствор Рингера-Кребса; 4. Проба №1 после смены инкубационной среды на раствор D-Рингера-Кребса; 5. Проба №2 после смены инкубационной среды на раствор D-Рингера-Кребса.

Далее мы анализировали влияние выбранных ранее БАВ на высвобождение/секрецию *m*-кальпаина из синапсом. Для этого добавляли в инкубационную среду синапсом ЛПС (5 мкг/мл образца), 0,5 мМ МФТП, 2 мМ $MnCl_2$, 10 мМ 3-НПК. Как и ранее, отрицательным контролем служил образец, к которому добавляли 1мМ ЭДТА, а положительным – 1мМ $CaCl_2$ (рис. 3.2.8). Во всех экспериментах содержание ЛДГ в инкубационной среде не превышало 3% от суммарного.

1 2 3 4 5

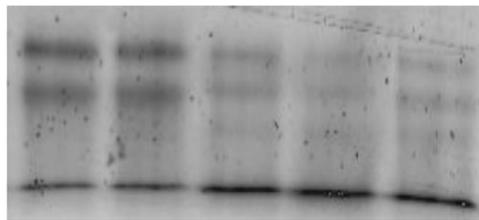


Рисунок 3.2.8 – Казеинограмма, отражающая влияние БАВ на содержание/активность кальпаина в инкубационной среде. Инкубация синапсом (30 мин) в растворе Рингера-Кребса, содержащем: 1. 1мМ ЭДТА; 2. ЛПС (5 мкг/мл образца); 3. 0,5 мМ МФТП; 4. 2мМ $MnCl_2$; 5. 1мМ $CaCl_2$.

Как видно из казеинограммы, представленной на рис. 3.2.8, инкубация синапсом в присутствии 2 мМ $MnCl_2$, 0,5 мМ МФТП привела к высвобождению *m*-кальпаина в инкубационную среду, причем эффект был сопоставим с действием 1 мМ $CaCl_2$. Как мы и предполагали, при аппликации ЛПС такого эффекта не наблюдалось, что можно объяснить вероятным отсутствием рецепторов к ЛПС на синапсомальной мембране. При инкубации синапсом с 10 мМ 3-НПК в течение 30 минут мы не обнаружили активности *m*-кальпаина в среде (данные не показаны), поэтому, чтобы удостовериться в отсутствии эффекта, в следующей серии опытов мы увеличили время инкубации с этой добавкой до 60 мин. Результаты приведены на рис. 3.2.9.

1 2 3

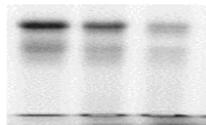


Рисунок 3.2.9 – Казеинограмма, отражающая влияние 3-НПК на содержание кальпаина в инкубационной среде. Инкубация синапсом (60 мин.) в растворе Рингера-Кребса, содержащем: 1. 1мМ ЭДТА; 2. 0,5 мМ МФТП; 3. 1мМ CaCl₂.

Как видно из данных, представленных на рис. 3.2.9, даже увеличение времени инкубации в два раза не привело к значимому расщеплению FITC-казеина.

Таким образом, в выбранных нами условиях из всех анализируемых БАВ только аппликация 2мМ MnCl₂ и 0,5 мМ МФТП приводит к высвобождению/секреции т-кальпаина из синапсом.

Наши результаты согласуются с некоторыми данными литературы. Например, на клетках линии N27 (линия дофаминергических нейронов) было показано, что их обработка МФТП вызывает высвобождение ими μ -кальпаина. При добавлении внеклеточной жидкости, содержащей μ -кальпаин, к культуре глиальных клеток наблюдается активация последних, что, в свою очередь, оказывает токсическое действие на дофаминергические нейроны [114]. Стимуляция клеток хрящевой ткани с помощью ФНО- α (10 нг/мл) приводила к высвобождению т-кальпаина в межклеточную среду, что сопровождалось увеличением активности внутриклеточного т-кальпаина, эффект подавлялся нестероидными противовоспалительными препаратами [115]. Кроме этого, на клетках предшественниках остеобластов мыши линии MC3T3-E1 было показано наличие т-кальпаина в среде, причем его высвобождение не блокировалось добавлением брефельдина А и моненсином, что указывает на неклассический путь секреции т-кальпаина из клетки. Однако этими же авторами было показано, что высвобождение т-кальпаинов было нехарактерно для клеток HeLa [116].

Таким образом, т-кальпаин высвобождается из выделенных нервных окончаний (синапсом) в активной или в способной к активации форме;

данный процесс является кальций-зависимым; KCl-индуцируемая деполяризация стимулирует высвобождение т-кальпаина из синапсом; хлорид марганца (2мМ), МФТП (0,5 мМ) способствуют высвобождению т-кальпаина из синапсом, ЛПС (5 мкг/мл) и 3-НПК (1мМ) такого эффекта не оказывают.

Обобщая вышеизложенное, можно предположить, что в физиологических условиях кальпаины локализируются внутриклеточно в свободной и/или мембрансвязанной форме; при развитии определенных форм патологии или при действии некоторых экологических факторов определенные клетки приобретают способность секретировать или высвобождать кальпаин. Однако описанные выше эксперименты не позволяют выявить механизм высвобождения/секреции т-кальпаина нервными окончаниями.

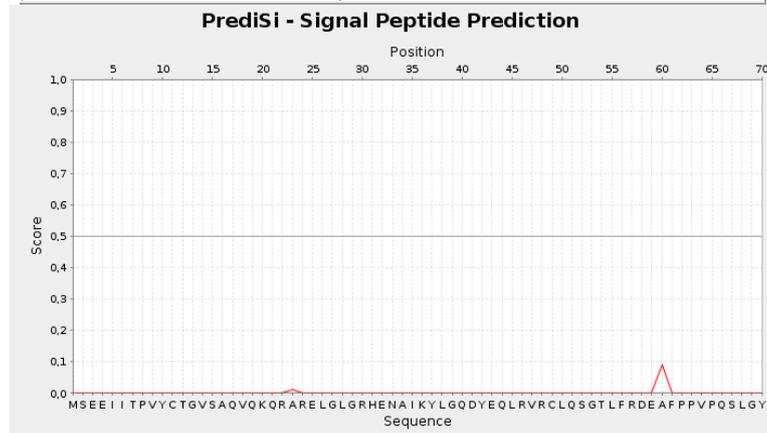
3.3. Выявление механизма высвобождения/секреции т-кальпаина из синапсом

Ранее считалось, что для любого белка характерен только один клеточный компартмент: белок синтезируется, модифицируется в эндоплазматическом ретикулуме, транспортируется к месту своего функционирования, выполняет свои функцию/функции и затем утилизируется. Место локализации белка определяется наличием в его структуре специфической сигнальной последовательности (гидрофобного участка, обычно находящегося вблизи N-конца молекулы) [275]. Эти сигнальные последовательности, как показали эксперименты с химерными объектами (белками, к которым пришивали различные сигнальные пептиды), содержат всю информацию, необходимую для транспортировки белков к месту выполнения их функции. На сегодняшний день определены последовательности для удержания белков в ЭР, последовательность для доставки в ядро, митохондрии, пароксизмы, а также последовательность, определяющая секрецию белка из клетки. С целью выявления в

аминокислотной последовательности μ - и m -кальпаинов (для человека и крысы) сигнальных пептидов, определяющих секрецию белка из клетки, нами был проведен их поиск с помощью ресурса PrediSi [251] (<http://www.predisi.de>). Результаты поиска в графическом виде представлены на рис. 3.3.1 (А-В) и рис. 3.3.2.

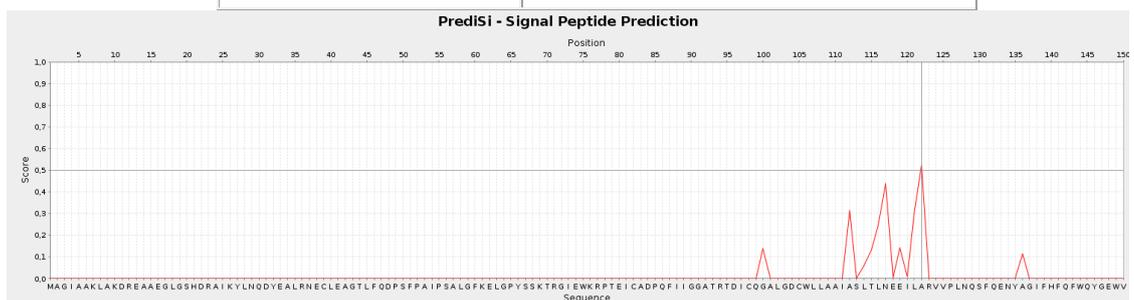
А. NP_001185797.1 calpain-1 (μ) catalytic subunit [Homo sapiens]:

Cleavage position:	60 (?)
Score:	0.0875
Secreted protein:	not predicted for secretion



Б. NP_001739.3 calpain-2 (m) catalytic subunit isoform 1 [Homo sapiens]:

Cleavage position:	122
Score:	0.5228
Secreted protein:	predicted for secretion



B. NP_001139540.1 calpain-2 (m) catalytic subunit isoform 2 [Homo sapiens]:

Cleavage position:	44
Score:	0.5228
Secreted protein:	predicted for secretion

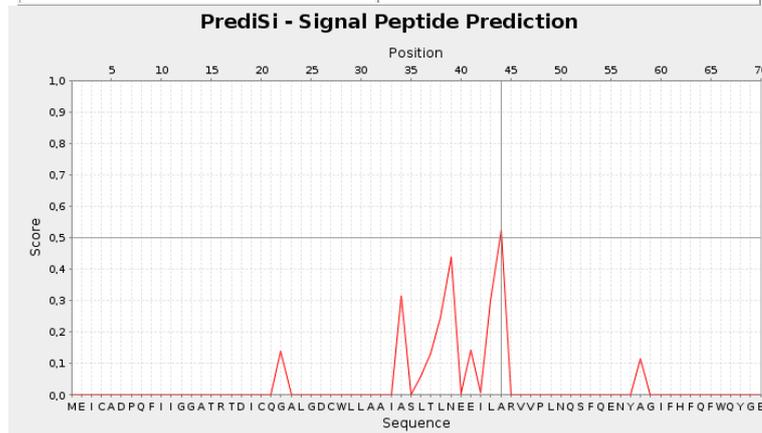
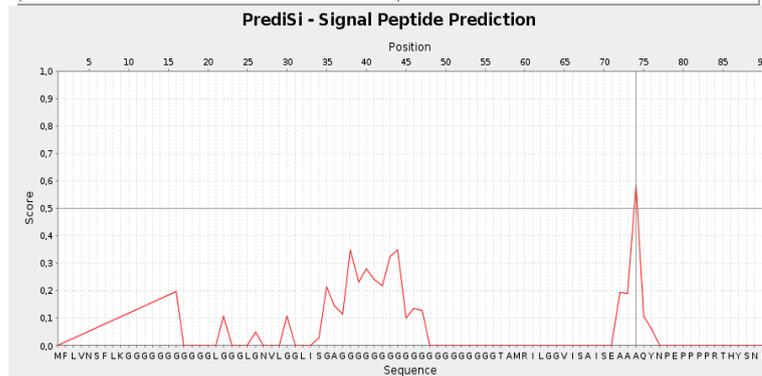


Рисунок 3.3.1 – Результаты поиска в аминокислотной последовательности каталитических субъединиц кальпаинов человека сигнальных пептидов, определяющих секрецию белка из клетки
 А: для μ -кальпаина; Б: для изоформы 1 m -кальпаина; В: для изоформы 2 m -кальпаина.

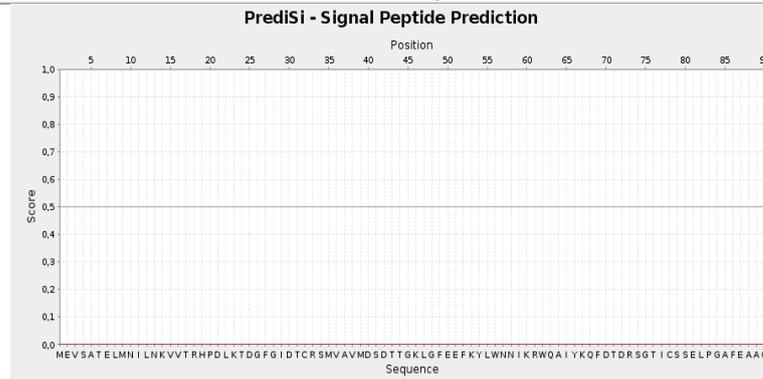
A. NP_001740.1 calpain small subunit 1 isoform 1 [Homo sapiens]:

Cleavage position:	74
Score:	0.5842
Secreted protein:	predicted for secretion



Б. NP_001289562.1 calpain small subunit 1 isoform 2 [Homo sapiens]:

Cleavage position:	48 (?)
Score:	0.0000
Secreted protein:	not predicted for secretion



В. EAW82830.1 calpain, small subunit 2 [Homo sapiens]:

Cleavage position:	53 (?)
Score:	0.2589
Secreted protein:	not predicted for secretion

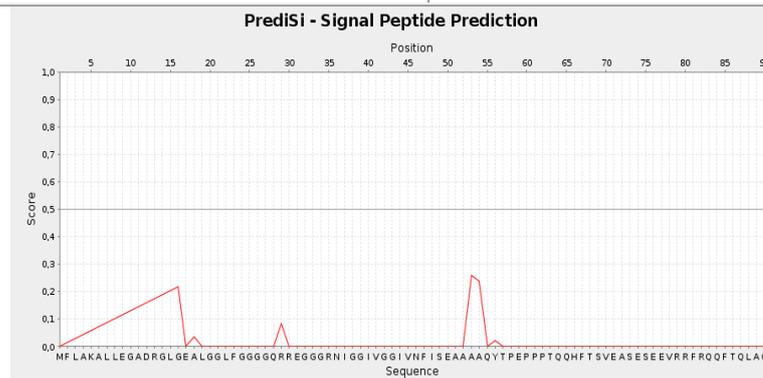


Рисунок 3.3.2 – Результаты поиска в аминокислотной последовательности малых субъединиц кальпаинов человека сигнальных пептидов, определяющих секрецию белка из клетки
 А: для субъединицы 1 изоформы 1; Б: для субъединицы 1 изоформы 2; В: для субъединицы 2.

Как видно из данных, представленных на рис. 3.3.1 и 3.3.2, существуют варианты, при которых есть основания полагать, что обе субъединицы т-кальпаина человека могут «секретироваться» из клетки по классическому

пути; для μ -кальпаина такого вывода сделать нельзя. Кроме этого, приведенные данные вступают в противоречие с описанными выше результатами, согласно которым m -кальпаин не высвобождается из клеток HeLa и, напротив, высвобождается из мышечных клеток MC3T3-E1, причем ингибиторы классического пути секреции не отменяют этот эффект [116]. Проведя поиск сигнальных пептидов, определяющих секрецию белка из клетки, в аминокислотной последовательности каталитической субъединицы m -кальпаина мыши, мы обнаружили такой пептид, но, как и в случае изоформы 2 человека, «далеко» от N-конца молекулы (рис. 3.3.3).

NP_033924.2 calpain-2 catalytic subunit [Mus musculus]:

Cleavage position:	122
Score:	0.5228
Secreted protein:	not predicted for secretion

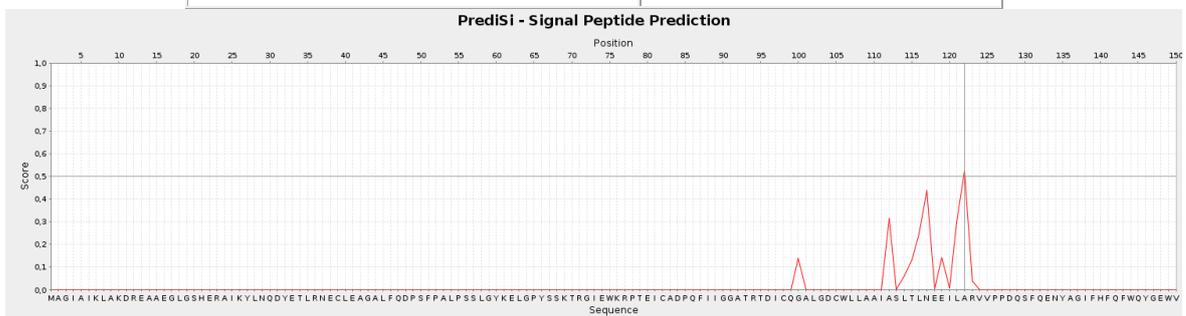
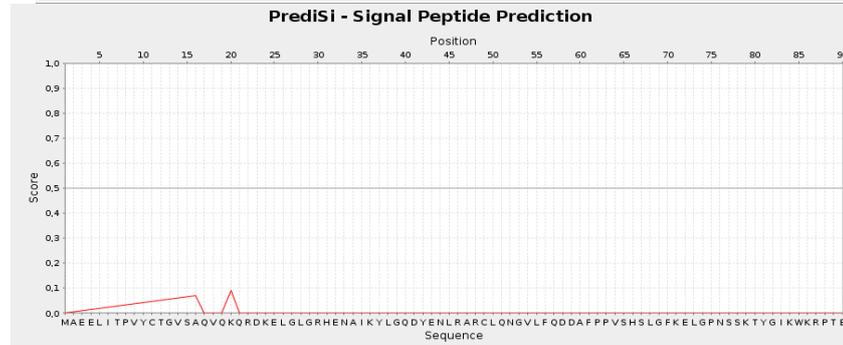


Рисунок 3.3.3 – Результаты поиска в аминокислотной последовательности каталитической субъединицы m -кальпаина мыши сигнальных пептидов, определяющих секрецию белка из клетки.

Поскольку данное исследование выполнено на синапсоммах, выделенных из мозга крысы, поиск сигнальных пептидов был проведен и для каталитических субъединиц кальпаинов крысы. Данные представлены на рис. 3.3.4.

A. NP_062025.1 calpain-1 catalytic subunit [Rattus norvegicus]:

Cleavage position:	122
Score:	0.5228
Secreted protein:	predicted for secretion



Б. EDL94875.1 calpain 2 catalytic subunit [Rattus norvegicus]:

Cleavage position:	122
Score:	0.5228
Secreted protein:	predicted for secretion

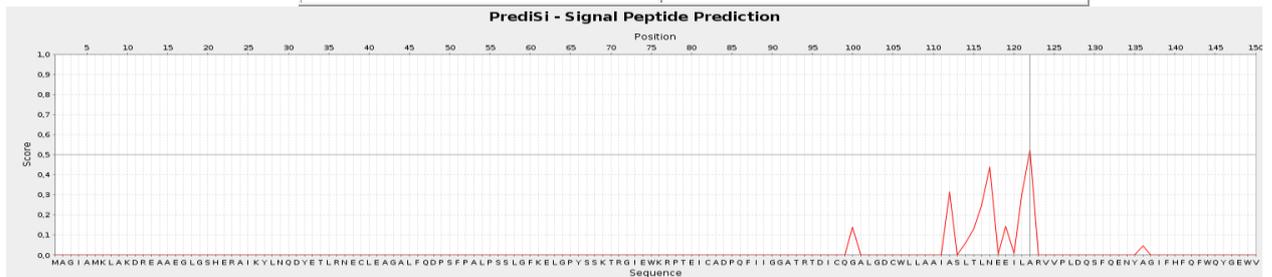


Рисунок 3.3.4 – Результаты поиска в аминокислотной последовательности каталитических субъединиц кальпаинов крысы сигнальных пептидов, определяющих секрецию белка из клетки А: для μ -кальпаина; Б: для m -кальпаина.

При сопоставлении данных, отображенных на рис. 3.3.1, 3.3.3 и 3.3.4, видно, что для каталитической субъединицы m -кальпаина крысы и мыши, как и для изоформы 1 каталитической субъединицы m -кальпаина человека, вероятно наличие «сигнального пептида». Однако во всех случаях сайт протеолитического расщепления находится между аланином в 122-м

положении и аргинином в 123-м, что достаточно далеко от N-конца молекулы. Затем мы провели выравнивание N-концевых участков каталитических субъединиц m-кальпаина млекопитающих. Данные представлены на рис. 3.3.5.

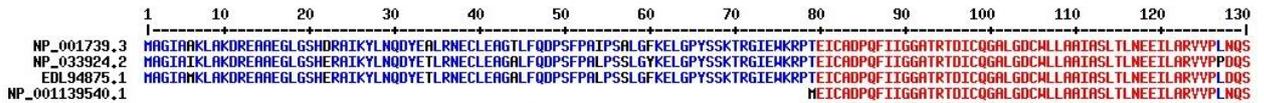


Рисунок 3.3.4 – Результат выравнивания аминокислотной последовательности, соответствующей N-концевому участку каталитической субъединицы m-кальпаина человека, изоформа 1 и 2 (NP_001739.3 и NP_001139540.1); мыши (NP_033924.2); крысы (EDL94875.1). Красным цветом выделены совпадающие аминокислоты.

Оказалось, что вблизи места отщепления предполагаемого сигнального пептида (A122–R123, нумерация для изоформы 1 человека) аминокислотная последовательность обеих изоформ каталитической субъединицы m-кальпаина человека и крысы полностью совпадают; для соответствующей последовательности у мыши характерна замена L на P в 127 положении, в непосредственной близости от сайта протеолитического расщепления. Наличие пролина в этом положении может существенно сказаться на третичной структуре молекулы, сделать невозможным отщепление N-концевого пептида и, как следствие, m-кальпаин не будет «секретироваться» из клетки по классическому пути.

Однако все приведенные выше результаты в совокупности с данными о доменной структуре кальпаина позволяют отказаться от предположения о секреции m-кальпаина по классическому пути, поскольку отщепление описываемого выше пептида (1-122) привело бы к нарушению формирования каталитической триады m-кальпаина, а мы обнаруживаем в инкубационной среде активный m-кальпаин.

Далее мы провели анализ аминокислотной последовательности кальпаинов с помощью сервиса SecretomeP 2.0 Serverc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) с целью вычисления вероятности секреции кальпаинов по неклассическому пути. Данные представлены на рис. 3.3.5.

# Name	NN-score	Odds
NP_00118579	0.554	1.188
NP_001739.3	0.506	1.008
NP_00113954	0.488	0.952
#		
NP_033924.2	0.478	0.926
#		
EDL94875.1	0.477	0.922
#		
NP_001740.1	0.825	4.249
#		
NP_00128956	0.567	1.347
#		
EAW82830.1	0.839	4.296
#		
NP_00110397	0.566	1.233
#		
NP_062025.1	0.572	1.251
#		
NP_058814.1	0.858	4.793
#		
NP_001102850.1	0.858	4.686
#		
EDM07788.1	0.904	5.901
#		
NP_081388.1	0.806	3.609
#		
NP_033925.2	0.868	4.941
#		

Рисунок 3.3.5 – Прогноз неклассического пути секреции малой и каталитической субъединиц μ - и m -кальпаина человека, мыши и крысы. NN-score – индекс прогнозирования неклассической секреции белка (при NN-score больше 0,6 считается, что белок может секретироваться по неклассическому пути); Odd – отношение шансов. Красным цветом выделены субъединицы, для которых прогноз положителен.

Как видно из данных, приведенных на рис. 3.3.5, выявлен положительный прогноз неклассического пути секреции для семи субъединиц: NP_001740.1, EAW82830.1, NP_058814.1, NP_001102850.1, EDM07788.1, NP_081388.1, NP_033925.2 (calpain small subunit 1 isoform 1 [Homo sapiens], calpain small subunit 2 [Homo sapiens], calpain small subunit 1 [Rattus norvegicus], calpain small subunit 1 isoform CRA_b [Rattus norvegicus], calpain small subunit 2 [Mus musculus], calpain small subunit 1 [Mus musculus]). Важно отметить, что наибольшее отношение шансов было характерно для

CRA_b изоформы 1 малой субъединицы кальпаинов крысы. Таким образом, нельзя исключить, что малая субъединица кальпаинов может секретироваться из клетки по неклассическому механизму.

На сегодняшний день известно несколько механизмов неклассической секреции белков, ниже приведено краткое описание некоторых из них по [276].

1. Механизм Membrane flip-flop. Для реализации этого механизма белок должен заякориться на внутренней стороне мембраны и путем flip-flop переворота оказаться на внешней стороне клеточной мембраны. Примером белка, секретирующего по данному механизму, является белок жгутиконосных паразитических протистов рода *Leishmania*, возбудителей зоонозного кожного лейшманиоза - Hydrophilic acylated surface protein B (HASPВ).

2. Plasma membrane transporter. В этом случае белок транспортируется из цитоплазмы во внеклеточное пространство сквозь поры плазматической мембраны. Такой путь характерен для факторов роста фибробластов ФРФ-1 и ФРФ-2.

3. Membrane blebbing. Реализация данного механизма заключается в формировании экзосом, везикул диаметром около 100 нанометров, выделяемых в межклеточное пространство путем образования впячиваний внутрь мембраны. Таким образом, полость экзосом имеет цитоплазматическое происхождение. По такому пути высвобождается из клетки белок теплового шока HSP90.

4. Endosomal recycling. Данный механизм осуществляется следующим образом: белок импортируется в специальные везикулы, являющиеся субкомпарментом эндосом; при взаимодействии с мембраной везикулы высвобождают содержимое во внеклеточное пространство. Такой способ секреции характерен, например, для ИЛ-1 β .

5. Plasma Membrane Pore Formation. В плазматической мембране формируется пора, через которую цитоплазматические белки проникают в

межклеточное пространство. Такой тип секреции почти всегда сопряжен с развитием воспалительного процесса, для которого характерна повышенная проницаемость мембран. По такому пути, например, ИЛ-1 β высвобождается из макрофагов.

Некоторые белки высвобождаются во внеклеточное пространство, используя разные механизмы, в зависимости от функционального состояния клетки. Поскольку при деполяризации синапсом хлоридом калия мы наблюдали вторую «волну» выброса кальпаина во внесинапсосомальную среду, то одним из возможных путей секреции кальпаина может быть экзоцитоз синаптических везикул. Чем обусловлено высвобождение кальпаина во внеклеточную среду в отсутствие деполяризации – не ясно. В работе Perez с коллегами [117] удалось показать, что ядерные клетки крови человека и лимфоциты, выделенные из селезенки мыши, секретируют кальпаин по ABCA1-зависимому пути в составе микровезикул, которые во внеклеточной среде быстро разрушаются и высвобождают свое содержимое. Их гипотеза строится на том, что добавление в культуральную среду 100 мкМ глибенкламида (ингибитор ABCA1-транспортера) отменяло секрецию кальпаинов (μ - и m -кальпаина). В связи с этими данными мы провели опыт с добавлением глибенкламида в раствор Рингера-Кребса для инкубации синапсом. Результаты представлены на рис. 3.3.6

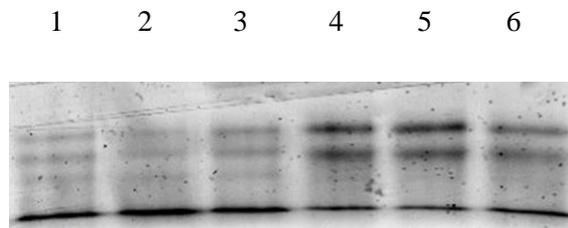


Рисунок 3.3.6 – Казеинограмма, отражающая влияние глибенкламида на активность (содержание) кальпаина в инкубационной среде. Инкубация синапсом (30 мин) в растворе Рингера-Кребса, содержащем: 1. 1мМ CaCl₂; 2. 2мМ CaCl₂; 3. 2 мМ MnCl₂; 4. 1мМ CaCl₂ + 100 мкМ глибенкламида; 5. 2мМ CaCl₂ + 100 мкМ глибенкламида; 6. 2 мМ MnCl₂ + 100 мкМ глибенкламида.

Как видно из казеинограммы (рис. 3.3.6), добавление в инкубационную среду глибенкламида подавляло CaCl_2 - и MnCl_2 -индуцированное высвобождение кальпаина из синапсом. Однако глибенкламид не подавлял МФТП-индуцированное и вызванное деполяризацией синапсом высвобождение кальпаина. Таким образом, полученные нами данные позволяют выдвинуть гипотезу о существовании, как минимум, двух путей высвобождения/секреции кальпаина нервными окончаниями.

ABCA1 относится к суперсемейству АТФ-связывающих кассетных транспортеров, экспрессируется во всех типах нервных клеток и осуществляет, в первую очередь, регуляцию уровня холестерина в мозге, в том числе осуществляет транспорт холестерина от астроцитов к нейронам [277]. Холестерин критически необходим нейронам для удлинения нейритов, формирования синаптических везикул и реализации регенеративных процессов [278]. Инактивация ABCA1 в клетках ЦНС приводит к развитию астроглиоза, усилению продукции медиаторов воспаления и нарушению синаптической передачи [279]. Усиление же экспрессии гена ABCA1 сопровождается повышением скорости транспорта холестерина, способствует секреции IL-10 [280]. На модели болезни Альцгеймера у мышей показано, что инактивация ABCA1 приводит к увеличению уровня растворимой и нерастворимой формы амилоида, способствует образованию амилоидных бляшек и телец Леви, приводит к нарушению транспорта липидов между нейронами и клетками глиии [277, 281]; напротив, повышенная экспрессия гена ABCA1 вызывает ослабление агрегатообразования. Если предположить, что кальпаины секретируются нейронами или клетками глиии по аналогичному/схожему механизму, то описанные выше эффекты подавления или сверхэкспрессии ABCA1 могут быть опосредованы способностью кальпаинов расщеплять бета-амилоид и синуклеин, а также вовлечением кальпаинов в регуляцию секреции цитокинов.

Необходимо отметить, что наши предположения, и гипотеза, выдвинутая нашими коллегами, относительно высвобождения кальпаина из

клетки с помощью ABCA1 основывается исключительно на применении глибенкламида. Глибенкламид – представитель второго поколения производных сульфонилмочевины, применяемый как сахароснижающий препарат. Основным механизмом его действия – блокирование КАТФ (АТФ-зависимых калиевых каналов, членов ABC-семейства) на бета-клетках поджелудочной железы путем связывания с SUR (sulfonylurea receptors) субъединицей канала. Это вызывает приток кальция через потенциалзависимые кальциевые каналы, стимулируя экзоцитоз секреторных гранул, содержащих инсулин [282]. Глибенкламид также ингибирует активность и других ABC-транспортеров, включая ABCA1, причем для подавления активности последнего оптимальным является диапазон концентраций глибенкламида от 1 до 100 мкМ [283]. Кроме этого, существуют данные об ингибировании глибенкламидом скавенджер рецепторов SR-B1 [284]. Таким образом, глибенкламид является полифункциональным соединением и, основываясь только на его применении, нельзя сделать вывод о секреции кальпаина именно через ABCA1-транспортер.

Далее, с целью выявления функций «внеклеточных» кальпаинов в ЦНС, мы провели поиск потенциальных субстратов кальпаина среди внеклеточных и трансмембранных белков. Оказалось, что матриксная металлопротеаза 2 (MMP2) имеет три потенциальных сайта расщепления кальпаином: Pos. 551 - Score: 0.56 (p-val: < 9.3e-5); Pos. 426 - Score: 0.41 (p-val: < 1.3e-4); Pos. 55 - Score: 0.40 (p-val: < 1.3e-4). Матриксная металлопротеаза 9 (MMP9) – два: Pos. 641 - Score: 0.46 (p-val: < 1.3e-4) и Pos. 156 - Score: 0.45 (p-val: < 1.3e-4). Внеклеточный домен D(1A) рецептора дофамина - Pos. 164 - Score: 0.38 (p-val: < 1,3e-4) и один потенциальный сайт на внеклеточном домене D(4) - Pos. 13 - Score: 0.36 (p-val: < 6.2e-4). Кроме этого, мы обнаружили три потенциальных сайта расщепления кальпаином у альфа-синуклеина: 1.Pos. 73 - Score: 0.90 (p-val: < 4.1e-5); 2.Pos. 74 - Score: 0.74 (p-val: < 9.3e-5); 3.Pos. 83 - Score: 0.49 (p-val: < 1.3e-4). Также потенциальным субстратом кальпаинов может быть КОМТ (Pos. 108 - Score: 0.92 (p-val: < 4.1e-5)). Принимая во внимание

возможную внеклеточную локализацию кальпаинов, список потенциальных субстратов кальпаинов может быть существенно расширен за счет поиска субстратов среди внеклеточных и трансмембранных белков.

Таким образом, в аминокислотной последовательности μ - и m -кальпаина человека и крысы отсутствуют сигнальные пептиды, определяющие способность к секреции по классическому пути; прогноз неклассического пути секреции для малой субъединицы кальпаинов человека и крысы является положительным (отношение шансов 4,2-5,9). Глибенкламид (100 мкМ) подавляет CaCl_2 - и MnCl_2 -индуцированное высвобождение m -кальпаина из синапсом, что указывает на возможность секреции m -кальпаина из нервных окончаний по ABCA1-зависимому пути. Среди внеклеточных и трансмембранных белков есть потенциальные субстраты кальпаинов.

Подводя итог, можно заключить, что обнаруживаемый нами в крови пациентов с БП активированный m -кальпаин может иметь церебральное происхождение. Действительно, мы показали, что токсины, действующие преимущественно на ДА-нейроны, индуцируют активацию синаптосомального кальпаина; активированный внутриклеточный m -кальпаин, расщепляя свои субстраты, нарушает, в частности, формирование комплекса SNARE, что приводит к снижению вероятности высвобождения нейромедиатора (дофамина) синаптическими окончаниями. Частично m -кальпаин под действием этих же токсинов (или других этиологических факторов БП (?)) по неклассическому пути секретруется во внеклеточное пространство. В интерстициальном пространстве m -кальпаину становятся доступны «новые» субстраты, например, внеклеточные домены рецепторов дофамина. Таким образом, активация m -кальпаина в синаптических окончаниях способна привести не только к снижению содержания внеклеточного дофамина, но и подавить ДА-передачу за счет нарушения функционирования рецепторов дофамина. Внеклеточный m -кальпаин через ослабленный ГЭБ может попадать в общий кровоток.

Поскольку μ -кальпаин в синаптических окончаниях не выявляется, вовлечение этой изоформы кальпаина в описываемую выше гипотетическую цепь событий невозможно. Однако положительный прогноз неклассического пути секреции для малой субъединицы кальпаинов, которая для μ - и m -кальпаина является общей, позволяет заключить, что μ -кальпаин может секретировать другими клетками ЦНС, например, астроцитами или микроглиоцитами, где он наиболее представлен.

Особого интереса заслуживает тот факт, что высвобождение m -кальпаина из нервных окончаний подавляется глибенкламидом, следовательно данный препарат, исходя из наших теоретических построений, должен обладать нейропротективным действием. К такому выводу пришли не только мы. В последнее десятилетие стало известно, что субъединица SUR1 (мишень глибенкламида) может взаимодействовать с каналами TRPM4 (transient receptor potential channel melastatin 4) - кальций-активируемыми неспецифическими катионными каналами. В ЦНС SUR1-Kir6.2 каналы и SUR1-TRPM4 каналы экспрессируются в нейронах, астроцитах, олигодендроцитах, клетках эндотелия и микроглиальных клетках [285]; активация последних – неотъемлемый этап развития воспалительного процесса в ЦНС, который может стать причиной развития нейродегенеративного процесса [286, 287]. Оказалось, что глибенкламид ингибирует SUR1-TRPM4 канал путем прямого связывания с SUR1 субъединицей и предотвращает гибель клетки, в том числе и в ЦНС [288]. Ингибирование данных каналов глибенкламидом подавляло активацию микроглиальных клеток и снижало содержание в ЦНС провоспалительных цитокинов – ФНО α и ИЛ-6, а также подавляло продукцию транскрипционного фактора NF κ B [289]. На модели субарахноидального кровоизлияния у крыс было показано, что глибенкламид эффективно ингибирует миграцию воспалительных клеток в ЦНС путем ингибирования сборки инфламмосомы NLRP3, тем самым предотвращая развитие нейровоспаления [290]. Поэтому неудивительно, что профилактическое введение глибенкламида крысам

приводило к снижению выраженности когнитивных нарушений и подавляло активацию глиальных клеток после умеренной черепно-мозговой травмы [291]. Таким образом, глибенкламид обладает выраженным противовоспалительным действием в ЦНР. Существует несколько экспериментальных исследований, свидетельствующих в пользу того, что глибенкламид может быть использован при лечении пациентов с болезнью Паркинсона (БП) [292, 293]. Показано, что КАТР экспрессируются в клетках базальных ганглиев, включая ЧС и стриатум [294]. Причем активация этих каналов перекисью водорода приводит к D2R независимому (ауторецептор дофамина) ингибированию высвобождения дофамина из нервных окончаний в стриатуме [295] (и, вероятно, к высвобождению m-кальпаина), но не к общему снижению содержания дофамина в этой области ЦНС [296]. В последующих исследованиях было продемонстрировано присутствие Kir6.2 субъединицы КАТР канала на аксональной мембране нейронов, имеющих свои окончания в дорзальном стриатуме [297]. Таким образом, регулируя активность КАТР глибенкламидом, можно ингибировать высвобождение m-кальпаина из нервных окончаний, предотвратить развитие нейровоспаления и регулировать высвобождение дофамина, в том числе, за счет модуляции соотношения внеклеточный/внутриклеточный m-кальпаин. Выдвинутые нами предположения можно частично проверить в экспериментах на лабораторных животных. В частности, можно сопоставить выраженность нейровоспаления, а также содержание дофамина и его метаболитов с уровнем продукции/активности кальпаинов.

3.4. Содержание и активность кальпаинов в мозге крыс после действия биологически активных веществ

Из четырех тестируемых в системе *in vitro* БАВ для выявления их влияния на продукцию и активность кальпаинов *in vivo* было выбрано два – ЛПС и $MnCl_2$. Действие МФТП не исследовалось по нескольким причинам. Во-первых, МФТП преимущественно используют для моделирования болезни Паркинсона на мышах. При введении МФТП крысам наблюдается не столь выраженный нейродеструктивный эффект, поэтому данный препарат используют для моделирования доклинической стадии БП, когда двигательные нарушения еще скомпенсированы, и, следовательно, на молекулярном уровне изменения не столь значительны [298]. Во-вторых, существует довольно много исследований, демонстрирующих активацию кальпаинов при введении МФТП мышам [299, 300]. Результаты этих исследований будут обсуждены ниже. В-третьих, по исследуемым показателям (активность синаптосомального кальпаина и высвобождение кальпаина из синаптосом) МФТП оказывал сходное действие с $MnCl_2$, вероятно из-за того, что оба агента преимущественно накапливаются в митохондриях и нарушают их функционирование. Введение 3-НПК, напротив, приводит к быстрому (3-5 дней после первого введения) развитию тяжелых неврологических нарушений с высокой летальностью и высокой вариабельностью различных физиологических параметров, что не дало бы нам возможности выделить «начальную» и «развернутую» стадии нейродегенеративного процесса. Однократное введение субсептических доз ЛПС или хроническое введение $MnCl_2$ деструктивно действуют на клетки ЦНС, но для таких воздействий характерен длительный латентный период с неизбежным развитием нейродегенерации, что дает возможность проследить за компенсаторными реакциями мозга и их переходом в патологические.

3.4.1. Содержание и активность кальпаинов в ЦНС крыс после введения субсептической дозы ЛПС

Уже довольно давно высказывается предположение о том, что периферическое воспаление, развивающееся в ответ на бактериальное инфицирование, может служить этиологическим фактором нейродегенеративного процесса, в частности, при БП (для обзора [301]). Однако следует признать, что до сих пор не выявлены условия, при которых периферическое воспаление может инициировать деструкцию нейронов мозга. В эксперименте на лабораторных грызунах можно инициировать развитие нейродегенеративного процесса с помощью интрацеребральной, внутривенной или интраперитонеальной инъекции пирогенных доз ЛПС, однако на сегодняшний день еще не установлено, является ли ЛПС непосредственным индуктором дегенерации нейронов или его действие опосредовано [259]. Например, возможна следующая цепь событий. ЛПС взаимодействует с Toll-подобными рецепторами (TLR) 4-го типа [302], через которые осуществляется трансмембранная передача сигнала, приводящая к активации транскрипционного фактора NF- κ B как на периферии, так и в клетках ЦНР. Как следствие, инициируется продукция провоспалительных цитокинов (ФНО α , ИЛ-1 β , ИЛ-15, ИЛ-6), усиливается генерация свободных радикалов и активируются некоторые протеазы, в том числе кальпаины, модулируя скорость течения нейродегенеративного процесса [303, 304]. Однако механизмы кальпаин-опосредованной модуляции скорости течения нейродегенеративного процесса до сих пор плохо изучены. С целью раскрытия этих механизмов мы однократно интраперитонеально вводили ЛПС крысам в дозе 1 мг/кг веса, отслеживали острые и отсроченные эффекты. Оказалось, что уже через час после инъекции ЛПС у животных наблюдалось повышение глубокой температуры тела в среднем на 2 $^{\circ}$ C; максимальный подъем температуры на 2,4 $^{\circ}$ C был зафиксирован через два часа после введения ЛПС (до 39,8 $^{\circ}$ C). Эффект сохранялся до 4 часов. Данные представлены на рис. 3.4.1.

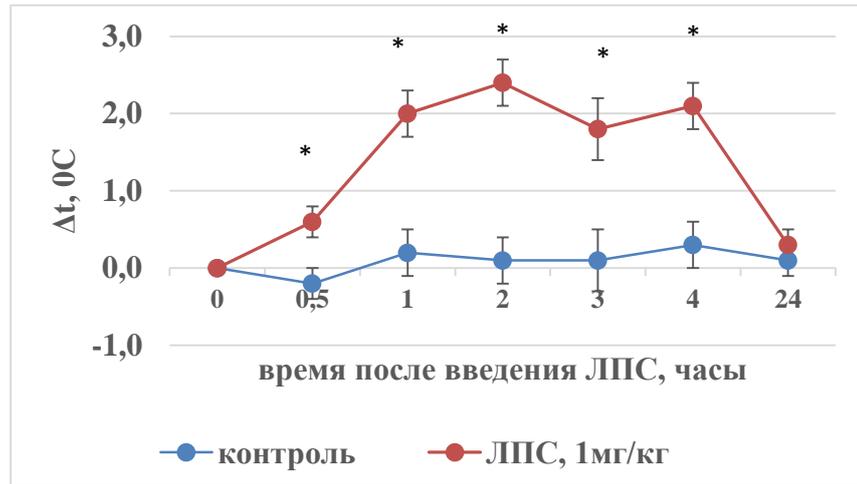


Рисунок 3.4.1 – Динамика изменения глубокой температуры тела крыс после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг веса животного, в обеих группах n=15. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, критерий Стьюдента для несвязанных групп при сравнении показателей в каждой точке, * - $p < 0,03$.

Через 4 часа после инъекции ЛПС в тесте «Открытое поле» у всех экспериментальных животных было отмечено снижение общей активности (рис. 3.4.2). Общее количество актов у животных, получивших инъекцию ЛПС, снизилось на 45% по отношению к контролю. В основном эти изменения были обусловлены снижением количества локомоций и увеличением времени замираний (фризинга).

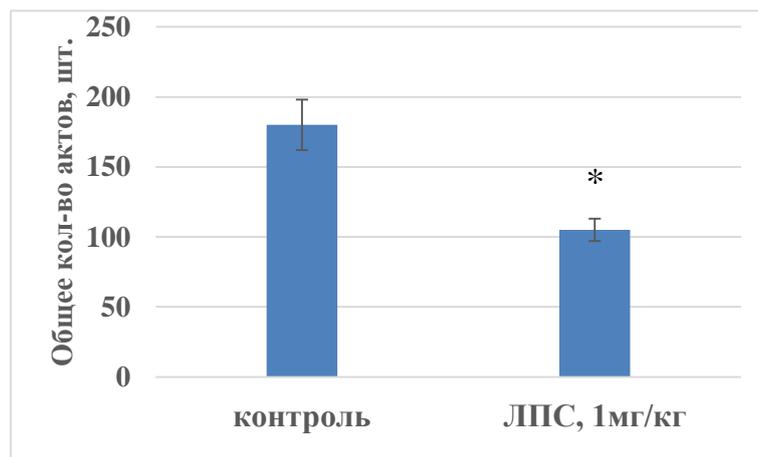


Рисунок 3.4.2 – Общая активность животных в тесте «Открытое поле» через 4 часа после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг веса животного, в обеих группах n=7. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, критерий Стьюдента для несвязанных групп, * - $p = 0,03$.

При тестировании животных через 7 и 14 дней после введения ЛПС межгрупповых различий найдено не было. Через 30 дней у всех животных,

которым вводили ЛПС, наблюдалось увеличение количества актов обнюхивания, груминга, а также увеличение времени замираний, что принято рассматривать как признаки тревожного поведения (данные не показаны).

С целью выявления признаков нейровоспаления в течение месяца после введения ЛПС в клетках гиппокампа и стриатума анализировали содержание мРНК основных провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ФНО α) и маркера активации микроглии - белка IBA-1. Нами были выбраны эти две области мозга, поскольку именно они в первую очередь реагируют на воздействие любого рода; в норме в клетках этих областей мозга μ - и m -кальпаины представлены в сопоставимом количестве; в стриатуме содержатся преимущественно окончания ДА-нейронов, а в гиппокампе – преобладают окончания нейронов другой ергичности.

Выявленные в клетках гиппокампа изменения представлены на рис. 3.4.3.

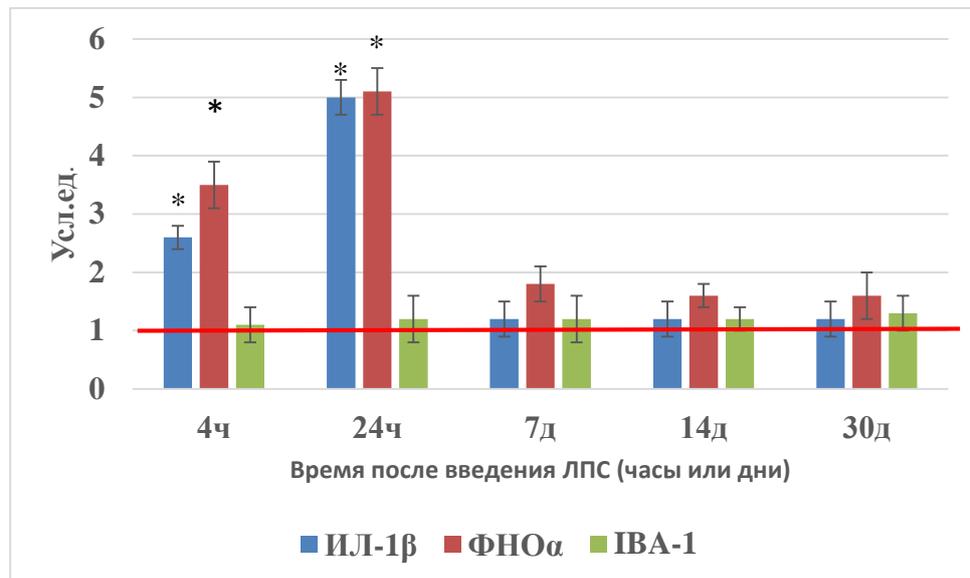


Рисунок 3.4.3 – Уровень мРНК ИЛ-1 β , ФНО α и IBA-1 в гиппокампе крыс на различных сроках после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг; в каждой точке $n=5$. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, красной линией обозначен уровень контрольных значений. Дисперсионный анализ для независимых выборок с *post hoc* критерием Тьюки, * - $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

Как видно из данных, приведенных на рис. 3.4.3, в первые сутки после введения ЛПС в гиппокампе наблюдается усиление продукции основных провоспалительных цитокинов, однако признаки активации микроглии не

выявляются. Поэтому логично предположить, что в ответ на введение эндотоксина провоспалительные цитокины продуцируются астроглиальными клетками. Уже через неделю и до 1 месяца после введения ЛПС признаки воспалительного процесса в клетках гиппокампа не детектируются.

Реакция клеток стриатума на введение субсептической дозы ЛПС была совершенно иной, что отражено на рис. 3.4.4.

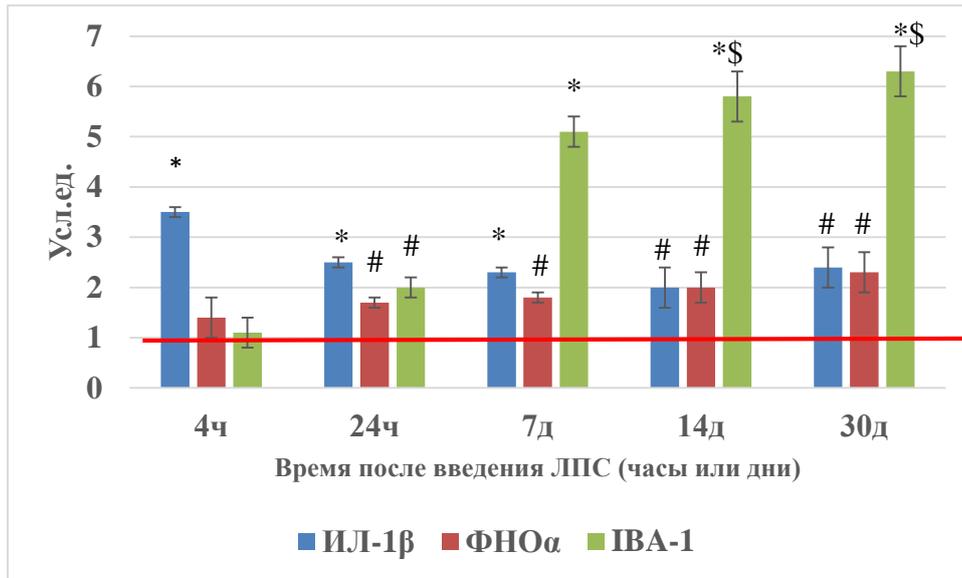


Рисунок 3.4.4 – Уровень мРНК ИЛ-1β, ФНОα и IBA-1 в стриатуме крыс на различных сроках после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг; в каждой точке n=5. Данные представлены как среднее ± ошибка среднего, красной линией обозначен уровень контрольных значений. Дисперсионный анализ для независимых выборок с post hoc критерием Тьюки, #- p < 0,05 по сравнению с контролем, *- p < 0,01 по сравнению с контролем, \$- p < 0,05 по сравнению с 7-м днем.

Как видно из данных, приведенных на рис. 3.4.4, уже через 4 часа после введения ЛПС в клетках стриатума наблюдается более чем 3-х кратное увеличение уровня мРНК ИЛ-1β, а через сутки все три оцениваемых показателя оказались выше контрольных значений. Выявленная тенденция сохранялась вплоть до 30-х суток, причем на фоне 2-х кратного увеличения содержания мРНК обоих провоспалительных цитокинов, уровень мРНК IBA-1 возрастал с течением времени и к 30-м суткам уже в 6 раз превышал показатель контрольной группы. Таким образом, в стриатуме мы наблюдали типичные признаки воспалительного процесса с активацией клеток микроглии.

Поскольку, согласно данным литературы, введение ЛПС приводит к развитию дегенеративных изменений по типу болезни Паркинсона, в этих же структурах нами было проанализировано содержание дофамина и его метаболитов. Результаты, полученные при анализе содержания дофамина и его метаболитов в гомогенате клеток гиппокампа, представлены на рис. 3.4.5.

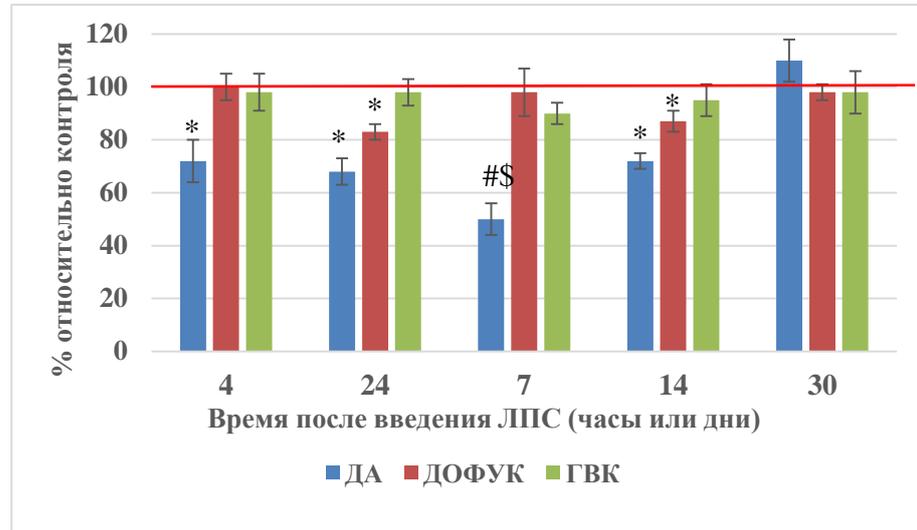


Рисунок 3.4.5 – Содержание ДА, ДОФУК, ГВК в гомогенате клеток гиппокампа крыс на различных сроках после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг; в каждой точке n=5. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, красной линией обозначен уровень контрольных значений. Дисперсионный анализ для независимых выборок с post hoc критерием Тьюки, * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем, # - $p < 0,01$ по сравнению с контролем, \$ - $p < 0,05$ по сравнению с 24-мя часами.

Оказалось, что уже через 4 часа после введения эндотоксина в гиппокампе происходит значительное (на 30%) снижение содержания ДА при неизменном уровне его метаболитов, что говорит о снижении скорости синтеза данного нейромедиатора. Однако уже через сутки выявлялось снижение не только ДА, но и ДОФУК, а через 7 дней уровень ДА составил уже 50% от контрольных значений, при сопоставимом с контролем содержании ДОФУК и ГВК. Эти данные в совокупности свидетельствуют об интенсификации синтеза норадреналина, предшественником которого является дофамин. Кроме этого, оказалось, что у экспериментальных животных на сроках от 4-х часов до 14 дней после воздействия повышено соотношение ДОФУК/ДА (показатель, характеризующий внутриклеточный оборот дофамина). Это признак усиления скорости внутриклеточной

утилизации дофамина. Соотношение ГВК/ДА, определяющее активность внеклеточного метаболизма дофамина, на этих сроках также было повышено, что свидетельствует об усилении высвобождения дофамина. Таким образом, в клетках гиппокампа экспериментальных животных имеет место процесс функциональных перестроек дофаминергической системы, которые, вероятно, завершаются к 30-м суткам после введения ЛПС, поскольку на этом сроке значимых отличий от контроля выявлено не было. При этом наше предположение относительно повышения уровня норадреналина подтвердилось. Данные приведены на рис. 3.4.6.

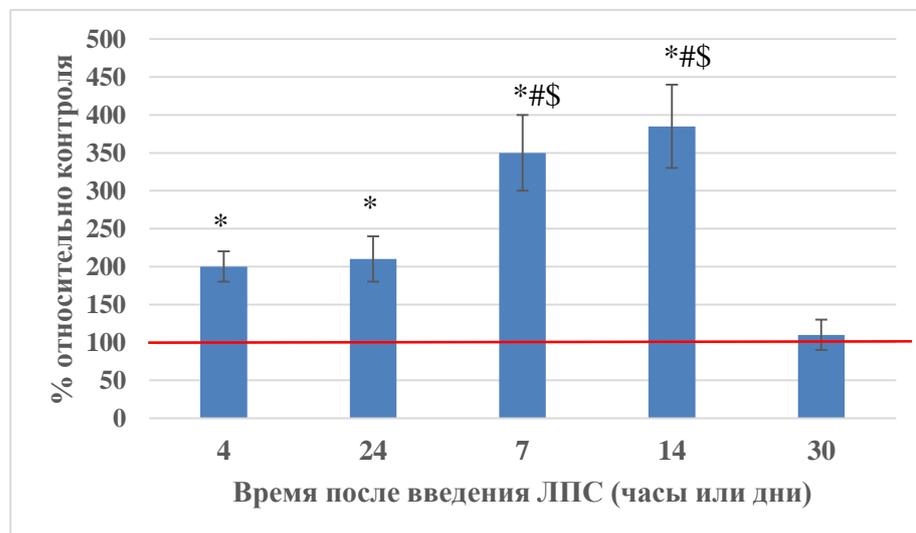


Рисунок 3.4.6 – Содержание норадреналина в гомогенате клеток гиппокампа крыс на различных сроках после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг; в каждой точке n=5. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, красной линией обозначен уровень контрольных значений. Дисперсионный анализ для независимых выборок с post hoc критерием Тьюки, *- $p < 0,01$ по сравнению с контролем, #- $p < 0,05$ по сравнению с точкой 4 часа, \\$- $p < 0,05$ по сравнению с точкой 24 часа.

Действительно, уже через 4 часа после введения препарата мы наблюдаем увеличение содержания норадреналина (в 2 раза), которое со временем продолжает увеличиваться, и на 14-й день уже в 4 раза превышает показатель контрольной группы. Технической возможности проанализировать скорость катаболизма норадреналина мы не имели, поэтому нельзя исключить, что его повышение обусловлено не только усилением синтеза, но и снижением скорости катаболизма.

В гомогенате клеток стриатума наблюдались несколько другие изменения (рис. 3.4.7).

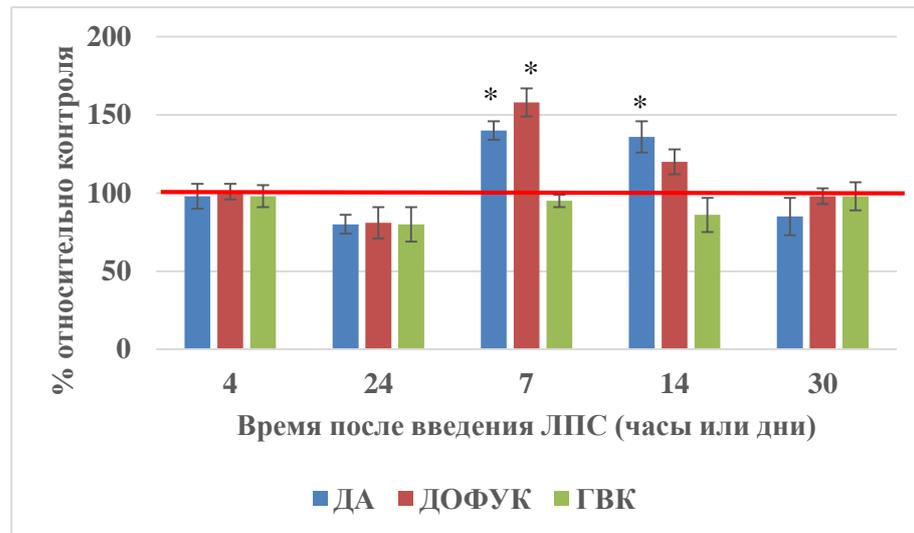


Рисунок 3.4.7 – Содержание ДА, ДОФУК, ГВК в гомогенате клеток стриатума крыс на различных сроках после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг; в каждой точке $n=5$. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, красной линией обозначен уровень контрольных значений. Дисперсионный анализ для независимых выборок с *post hoc* критерием Тьюки, * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Как видно из данных, приведенных рис. 3.4.7, в первые сутки после введения ЛПС уровень дофамина и его метаболитов не отличался от показателей контрольной группы. Однако через семь суток мы детектировали выраженное повышение содержания дофамина и его внутриклеточного метаболита – ДОФУК (на 40% и 52% соответственно), причем к 14-м суткам уровень дофамина был еще значимо выше, а ДОФУК - уже не отличался от контроля. На 30-е сутки все исследуемые показатели не отличались от контроля. Таким образом, в отличие от клеток гиппокампа, где на 7-е сутки мы наблюдали максимальное снижение содержания дофамина, в стриатуме выявляется его повышение при неизменной скорости внутриклеточного метаболизма (т. к. отношение ДА/ДОФУК было сопоставимо с контролем, $p=0,985$). При этом скорость внеклеточного метаболизма дофамина снизилась, поскольку отношение ГВК/ДА оказалось значимо ниже по сравнению с контролем, $p=0,021$. Таким образом, повышение содержания дофамина,

вероятнее всего, вызвано снижением скорости его высвобождения в синаптическую щель. Возможно несколько путей снижения уровня внеклеточного дофамина, например, нарушение работы DAT, подавление перехода дофамина в везикулярный пул, или может иметь место ингибирующий эффект в отношении MAO A или B. Выявленные нами эффекты могут объясняться изменением активности КОМТ, которая, как показывают наши расчеты, является субстратом кальпайнов, поэтому изменение активности данного фермента может быть обусловлено его ограниченным протеолизом.

Кроме этого, поскольку дофамин является предшественником норадреналина, нельзя исключить, что клетки «накапливают» дофамин для синтеза норадреналина. Результаты измерения содержания норадреналина в гомогенате клеток стриатума представлены на рис. 3.4.8.

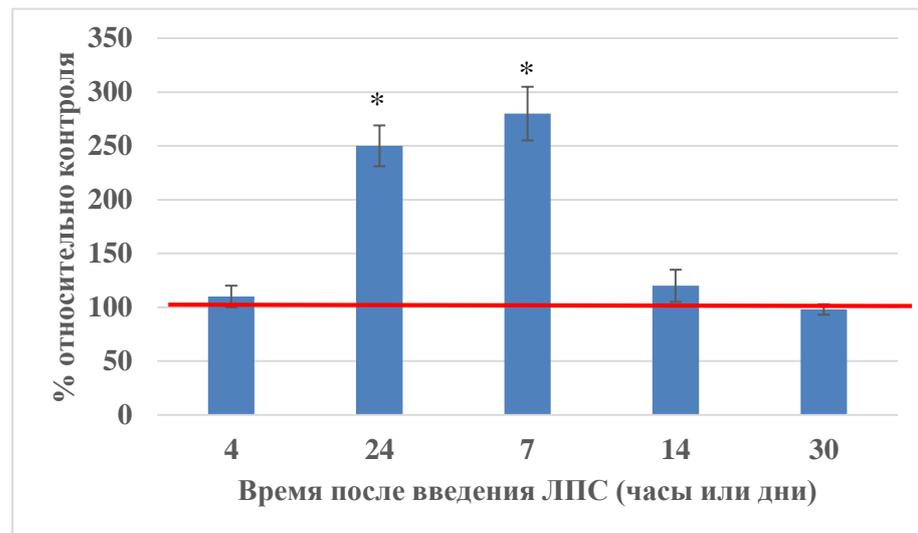


Рисунок 3.4.8 – Содержание норадреналина в гомогенате клеток стриатума крыс на различных сроках после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг; в каждой точке $n=5$. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, красной линией обозначен уровень контрольных значений. Дисперсионный анализ для независимых выборок с *post hoc* критерием Тьюки, * - $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

Оказалось, что в клетках стриатума уровень норадреналина выше показателей контрольной группы примерно в 2,5 раза на первые и седьмые сутки после введения ЛПС (рис. 3.4.8). Таким образом, максимумы содержания дофамина и норадреналина совпадают. На наш взгляд, может

иметь место следующая цепь событий. ЛПС вызывает развитие воспалительного процесса в стриатуме (мы выявили признаки активации микроглии), дофаминергические нейроны исключительно восприимчивы к воспалительным медиаторам, поэтому часть нейронов могла погибнуть, в выживших нейронах содержание дофамина возросло, но адаптационные процессы на 7-е сутки еще не завершились и интенсификации выброса дофамина не произошло, или же «не восстановилась» скорость течения катаболических процессов. Повышение уровня норадреналина, по нашему мнению, тоже следует считать откликом нейромедиаторной системы на развитие воспалительного процесса. Действительно, отростки норадреналинергических нейронов голубого пятна приходят в область стриатума. Высвобождаясь в синаптическую щель, норадреналин связывается со своими рецепторами на нейронах и клетках микроглии, и, согласно данным наших коллег, подавляет или снижает скорость развития нейровоспаления [305], тем самым способствуя выживаемости ДА-нейронов и повышению уровня дофамина. Таким образом, в гиппокампе и стриатуме экспериментальных животных происходят различные адаптационные процессы. В обеих структурах нарушения в обмене нейромедиаторов (по исследуемым показателям) к 30-му дню восстанавливаются, в гиппокампе развитие воспалительного процесса подавляется уже к 7-м суткам, а в стриатуме его интенсивность, судя по продукции мРНК IBA-1, лишь нарастает.

Далее, в гомогенате клеток гиппокампа и стриатума этих же животных был определен уровень мРНК μ - и m -кальпаина. Результаты представлены на рис. 3.4.9 и рис. 3.4.10.

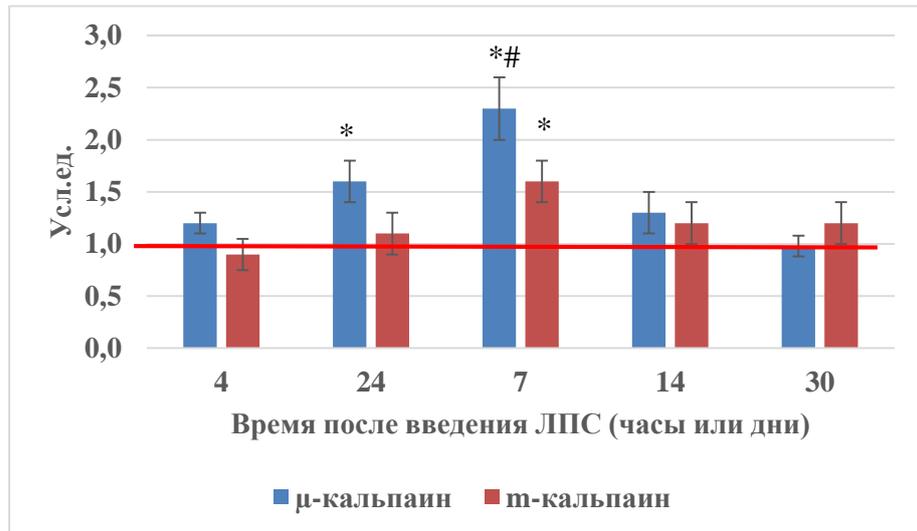


Рисунок 3.4.9 – Уровень мРНК μ - и m-кальпаина в гиппокампе крыс на различных сроках после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг; в каждой точке n=5. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, красной линией обозначен уровень контрольных значений. Дисперсионный анализ для независимых выборок с post hoc критерием Тьюки, * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем; # - $p < 0,05$ по сравнению с точкой 24 часа.

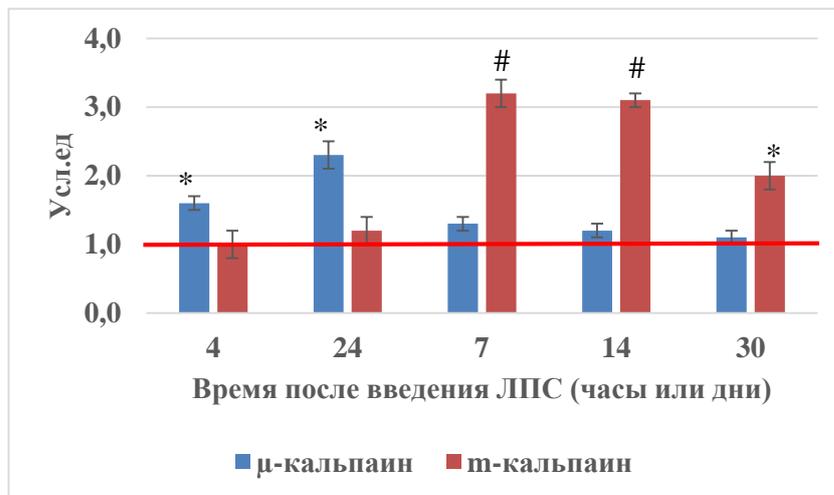
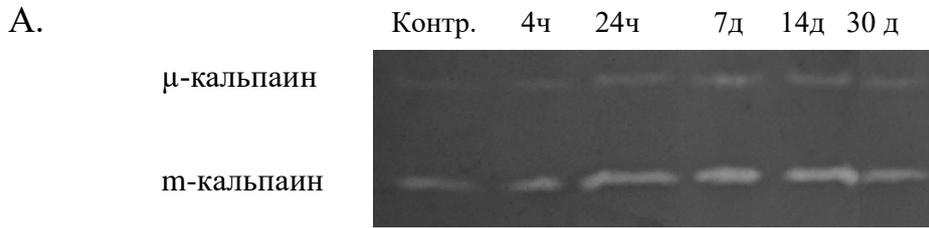


Рисунок 3.4.10 – Уровень мРНК μ - и m-кальпаина в стриатуме крыс на различных сроках после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг; в каждой точке n=5. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, красной линией обозначен уровень контрольных значений. Дисперсионный анализ для независимых выборок с post hoc критерием Тьюки, * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем; # - $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

На рис. 3.4.11 и 3.4.12 приведены данные об активности μ - и m -кальпаина в гиппокампе крыс на различных сроках после введения ЛПС.



Б.

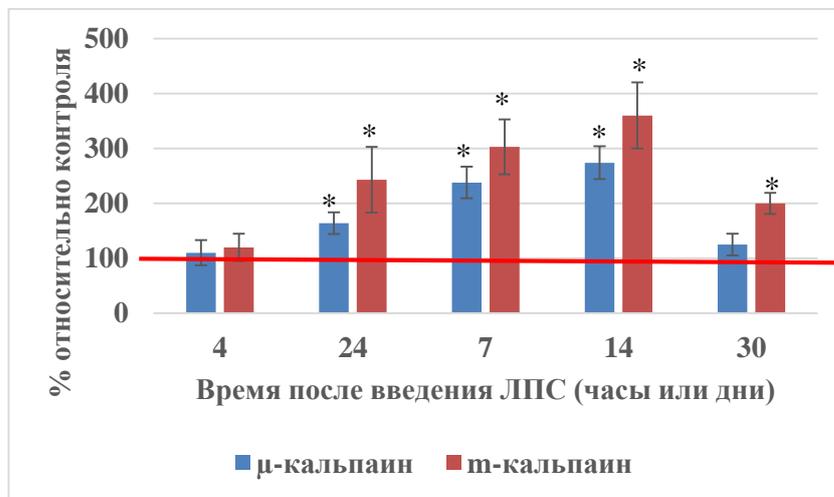
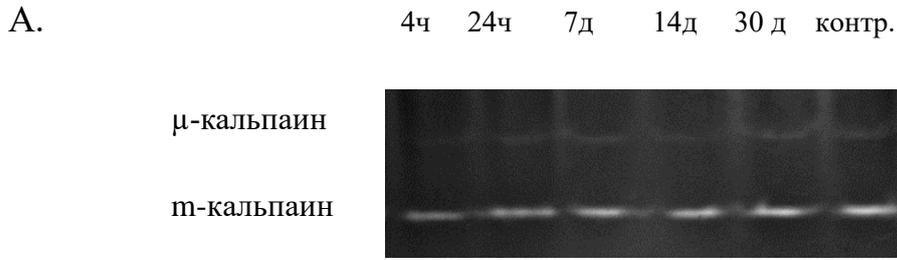


Рисунок 3.4.11 – Активность μ - и m -кальпаина в гиппокампе крыс на различных сроках после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг. А. Типичная казеиновая зимограмма, отражающая активность μ - (верхняя зона) и m -кальпаина (нижняя зона), где «ч» – часы после введения ЛПС, а «д» - дни. Б. Результаты измерения площадей обесцвеченных зон на зимограмме; данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, $n=5$ для каждой временной точки, красной линией обозначен уровень контрольных значений. Дисперсионный анализ для независимых выборок с post hoc критерием Тьюки, *- $p < 0,05$ по сравнению с контролем.



Б.

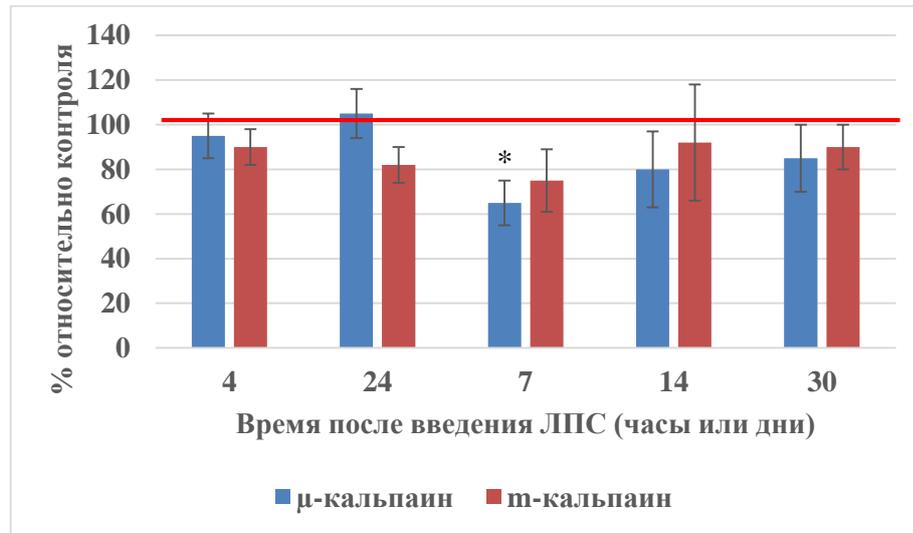


Рисунок 3.4.12 – Активность μ- и m-кальпаина в стриатуме крыс на различных сроках после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг. А. Типичная казеиновая зимограмма, отражающая активность μ- (верхняя зона) и m-кальпаина (нижняя зона), где «ч» – часы после введения ЛПС, а «д» - дни. Б.

Результаты измерения площадей обесцвеченных зон на зимограмме; данные представлены как среднее ± ошибка среднего, n=5 для каждой временной точки, красной линией обозначен уровень контрольных значений. Дисперсионный анализ для независимых выборок с post hoc критерием Тьюки, *- p < 0,05 по сравнению с контролем.

Оказалось, что уже через сутки после введения ЛПС в гиппокампе наблюдается увеличение продукции мРНК μ-кальпаина, причем выявленное повышение сохраняется и на 7-е сутки; уровень мРНК m-кальпаина отличался от контрольных значений только на 7-й день (был повышен в 1,5 раза). При этом повышение активности обеих изоформ кальпаина детектировалось уже через сутки после введения эндотоксина, а на 7-й день их активность уже более чем в 2 и в 3 раза превышала значения контрольной группы для μ- и m-кальпаина соответственно. Выявленные изменения сохранялись вплоть до 14-го дня. Через месяц в клетках гиппокампа мы наблюдали нормализацию всех

исследуемых показателей, кроме активности m-кальпаина, которая была в 2 раза выше, чем в контрольной группе.

Реакция кальпаинов клеток стриатума на введение ЛПС была совершенно иной. Уровень мРНК μ -кальпаина уже через 4 часа после введения ЛПС оказался выше показателя контрольной группы в 1,5 раза, а через сутки – в 2,3 раза; при этом содержание мРНК m-кальпаина в этих временных точках не отличалось от контроля. Начиная с 7-го дня уровень мРНК μ -кальпаина в клетках стриатума экспериментальных животных не отличался от контрольной группы. Несмотря на значимое повышение продукции мРНК μ -кальпаина в первые сутки после введения эндотоксина, активность данной протеазы не изменилась, а на 7-е сутки даже снизилась.

Как видно из полученных данных (рис. 3.4.10), мы наблюдали повышение продукции мРНК m-кальпаина, начиная с 7-го дня эксперимента и до окончания наблюдения (30-й день). Однако активность данной протеазы на всех исследуемых сроках не отличалась от контроля. Вероятно, повышенная продукция мРНК m-кальпаина была компенсирована, например, за счет повышения продукции кальпастатина. Для проверки этой гипотезы мы проанализировали содержание мРНК кальпастатина в гомогенате клеток стриатума. Результаты представлены на рис. 3.4.13.

Таким образом, полученные нами данные подкрепляют выдвинутую гипотезу: повышение продукции мРНК m-кальпаина сопровождается увеличением уровня мРНК кальпастатина, что, вероятнее всего, приводит к предотвращению гиперактивации m-кальпаина в клетках стриатума. В клетках гиппокампа такого повышения мы не наблюдали (рис. 3.4.14).

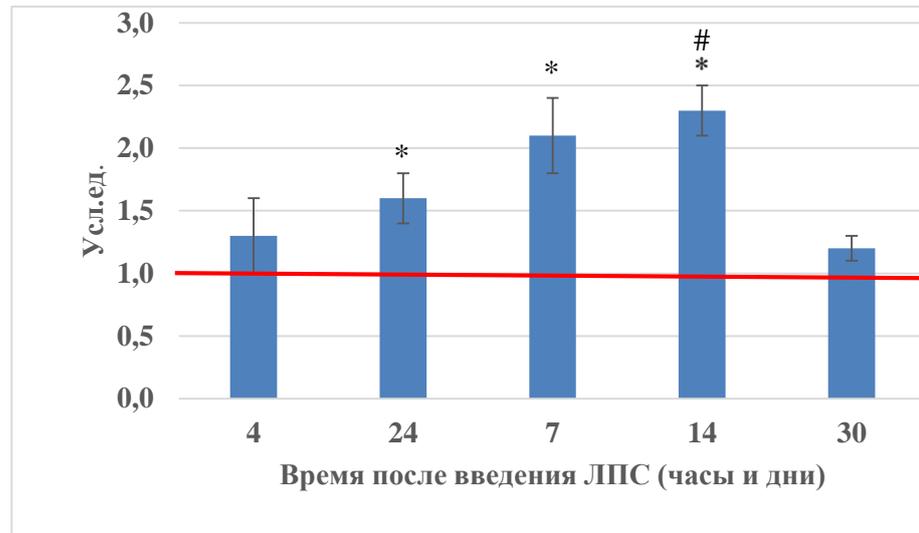


Рисунок 3.4.13 – Уровень мРНК кальпаSTATина в стриатуме крыс на различных сроках после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг; в каждой точке n=5. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, красной линией обозначен уровень контрольных значений. Дисперсионный анализ для независимых выборок с post hoc критерием Тьюки, * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем; # - $p < 0,05$ по сравнению с точкой 24 часа.

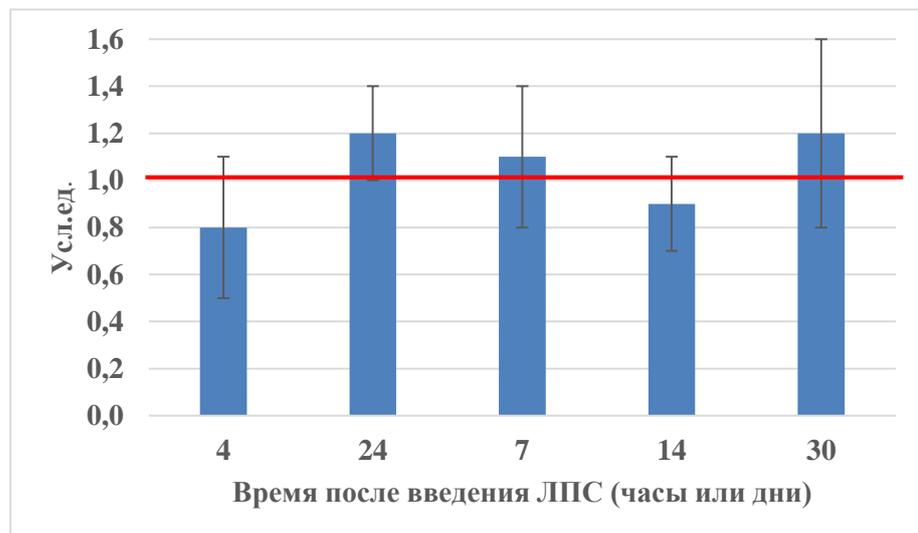


Рисунок 3.4.14 – Уровень мРНК кальпаSTATина в гиппокампе крыс на различных сроках после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг; в каждой точке n=5. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, красной линией обозначен уровень контрольных значений. Дисперсионный анализ для независимых выборок.

Таким образом, *внутрибрюшинное введение субсептической дозы ЛПС крысам в остром периоде вызывает в клетках гиппокампа усиление продукции мРНК основных провоспалительных цитокинов без признаков активации микроглии, снижение содержания дофамина и увеличение содержания норадреналина, сопровождаемое усилением продукции мРНК и активности μ - и m -кальпаина, с последующим восстановлением всех показателей до нормы; в клетках стриатума со временем усиливается продукция мРНК основных провоспалительных цитокинов и маркера активации микроглии IBA-1; наблюдаемое в остром периоде увеличение содержания норадреналина и усиление продукции мРНК μ -кальпаина нивелируется, но со временем усиливается продукция мРНК m -кальпаина.*

Далее мы анализировали последствия введения субсептической дозы ЛПС на отдаленных сроках (180 дней после инъекции). Необходимо обратить внимание, что животные контрольной группы в период с 30-го по 180-й день эксперимента находились в тех же условиях, что и экспериментальные крысы; животные обеих групп содержались в разных клетках, но получали еду и питье из одного источника в одинаковом объеме.

Оказалось, что на 180 день после введения препаратов у 85% животных, получивших инъекцию ЛПС, при визуальном осмотре наблюдалось нарушение позы, тремор головы и передних лап, ригидность мышц передних и задних конечностей. Типичный вид животного через 180 дней после введения ЛПС представлен на рис. 3.4.15. Также у экспериментальных животных мы наблюдали снижение двигательной активности; выявлялись нарушения двигательного поведения, выраженные в появлении «аномальных» траекторий движения в виде спиралевидных треков, визуализировалось нарушение походки. У трети животных отмечались эпизоды замирания. Однако в группе контрольных животных у 2-х крыс также появился тремор головы, и траектория движения в «Открытом поле» приобрела вид спирали. Данные представлены на рис. 3.4.16.

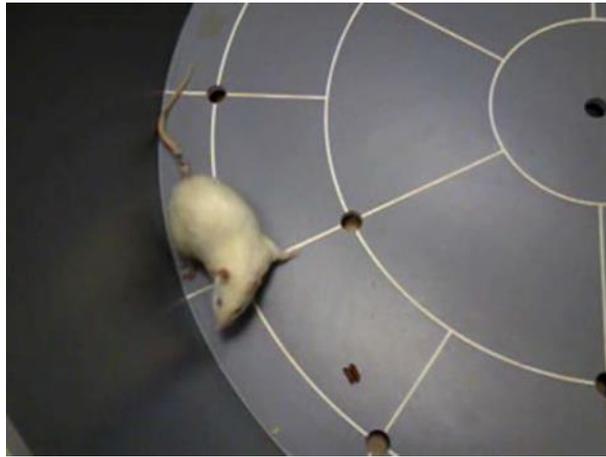
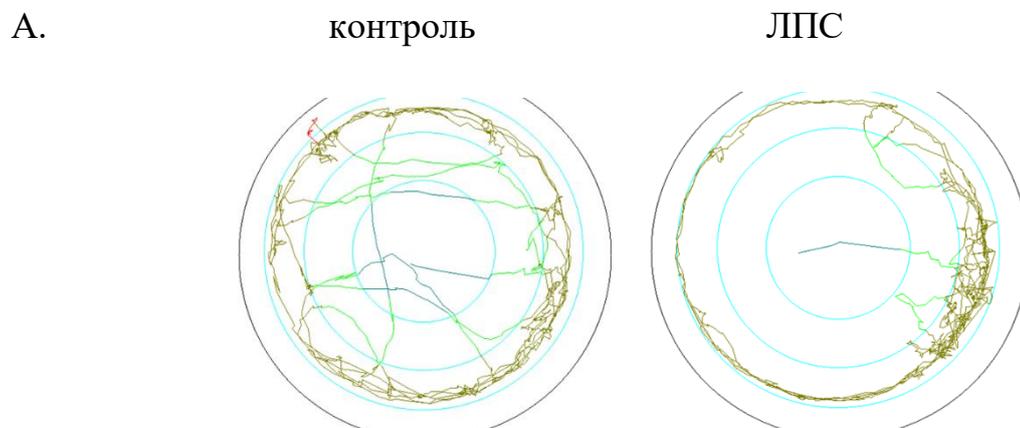


Рисунок 3.4.15 – Типичный вид животного через 180 дней после введения ЛПС.



Б.

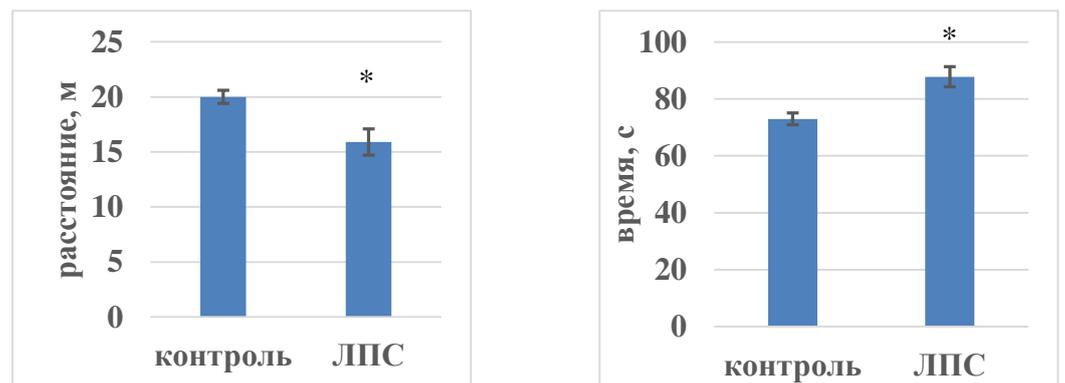


Рисунок 3.4.16 – Активности животных в тесте «Открытое поле» через 180 дней после введения ЛПС в дозе 1мг/кг веса животного, в обеих группах n=7. А. Типичный вид треков. Б. Двигательная активность крыс, оцененная по времени нахождения в неподвижном состоянии и пройденному расстоянию; критерий Стьюдента для независимых выборок. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, критерий Стьюдента для несвязанных групп, * $p < 0,01$.

Полученные нами данные косвенно свидетельствуют о развитии у животных дегенеративных изменений в ЦНР.

С целью выявления причин появления патологической двигательной активности мы проанализировали содержание основных медиаторов воспаления и катехоламинов в гиппокампе и стриатуме животных. Полученные данные представлены на рис. 3.4.17 и 3.4.18.

А.

Б.

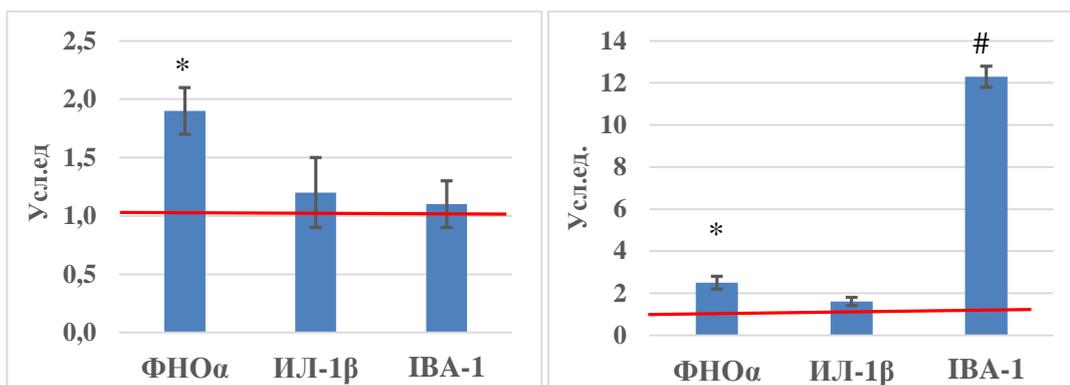
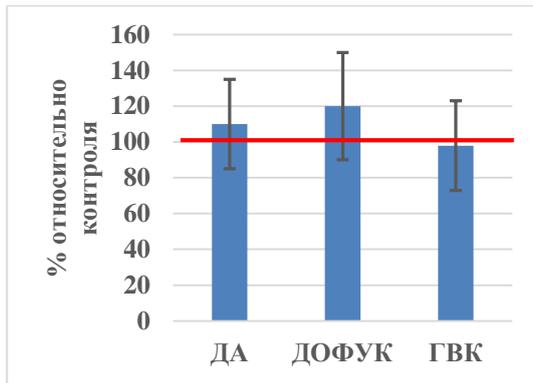
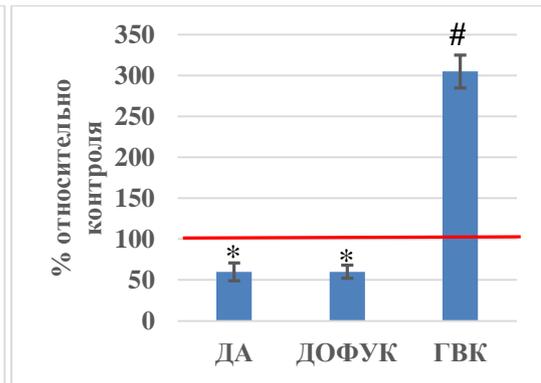


Рисунок 3.4.17 – Уровень мРНК ИЛ-1 β , ФНО α и ИВА-1 в гиппокампе (А) и в стриатуме (Б) крыс через 180 дней после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг; в каждой точке n=5-6. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, красной линией обозначен уровень контрольных значений. Критерий Стьюдента для независимых выборок, *- $p < 0,05$ по сравнению с контролем, # - $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

А.



Б.



В.

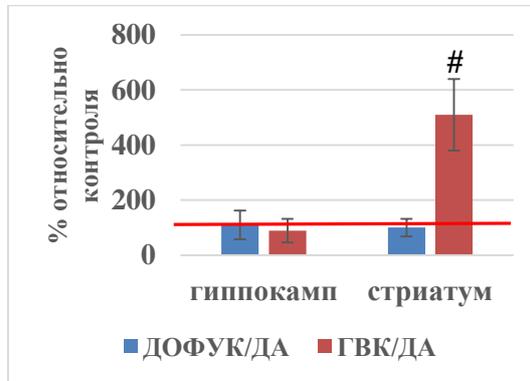


Рисунок 3.4.18 – Содержание ДА, ДОФУК, ГВК в гомогенате клеток гиппокампа (А) и стриатума (Б); отношение ДОФУК/ДА и ГВК/ДА в гиппокампе и стриатуме (В) крыс через 180 дней после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг; в каждой точке n=5-6. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, красной линией обозначен уровень контрольных значений. Критерий Стьюдента для независимых выборок, * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем, # - $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

В клетках гиппокампа экспериментальных животных наблюдается повышение продукции мРНК провоспалительного цитокина ФНО α , но не ИЛ-1 β . При этом содержание дофамина, его метаболитов, а также скорость внутри- и внеклеточного оборота дофамина остаются неизменными (рис. 3.4.17 и 3.4.18). Уровень норадреналина также не изменялся относительно контроля (составил (89 ± 6) % от уровня контрольных значений). Однако описанные выше данные получены в сравнении с соответствующим контролем (стареющие животные), поэтому нельзя исключить, что и у контрольных животных развивается воспалительный процесс в ЦНР.

В клетках стриатума также наблюдалось повышенное содержание ФНО α , но не ИЛ-1 β , в сравнении с контролем, при этом уровень мРНК ИВА-1 был повышен более чем в 12 раз. На основании этих данных можно заключить, что у экспериментальных животных развивается воспалительный процесс в стриатуме.

Содержание дофамина и его внутриклеточного метаболита ДОФУК в гомогенате клеток стриатума через 180 дней после введения ЛПС снизилось более чем в два раза, а внеклеточного метаболита ГВК – возросло в 5 раз. В совокупности эти данные позволяют предположить, что в дофаминергических нейронах черной субстанции, имеющих свои окончания в стриатуме, снижается продукция дофамина, например, вследствие гибели нейронов, а в «уцелевших» нервных окончаниях компенсаторно усиливается выброс дофамина, что приводит к многократному увеличению содержания ГВК. Остается открытым вопрос о механизмах поддержания нейровоспаления в стриатуме в течение 6 месяцев после введения эндотоксина, и о причине гибели дофаминергических нейронов.

Полученные нами данные согласуются с результатами других научных групп. Например, при интраперитонеальном введении ЛПС в дозе 5 мг/кг веса животного (доза в 5 раз превышает используемую нами) наблюдается гибель 23% и 43% ДА-нейронов через 7 и 10 месяцев после инъекции соответственно. При этом через час после введения ЛПС в мозге животных повышается уровень мРНК и белка ИЛ-1 β , ФНО-альфа, и сохраняется на повышенном уровне в течение 10 месяцев [306]. Другим авторам удалось показать, что введение аналогичной дозы ЛПС приводит к быстрому увеличению уровня ФНО-альфа в мозге, сохраняющемуся на протяжении 10 месяцев. При этом уровень ФНО-альфа в крови снижался до контрольного значения уже через 9 часов после инъекции, а в печени – через неделю. У таких животных через 10 месяцев наблюдалась 47%-ая потеря нейронов, содержащих тирозингидроксилазу. Однако у животных, лишённых генов рецепторов ФНО-альфа 1-го и 2-го типов, гибели ДА-нейронов не наблюдалось [307].

О вовлечении кальпаинов в регуляцию описанных выше процессов свидетельствуют следующие факты. Почти двадцать лет назад было показано, что ингибитор кальпаина I эффективно подавляет развитие полиорганной недостаточности, индуцируемой септической дозой ЛПС [308]. Авторы этого исследования делают вывод о вовлечении кальпаинов в регуляцию воспалительного процесса через активацию транскрипционного фактора NF- κ B, который в свою очередь инициирует продукцию провоспалительных агентов. Кроме этого, существуют данные, что гиперактивация m-кальпаина может привести к апоптозу нейрона ([309] и мн.др.). Мы проанализировали уровень мРНК (рис. 3.4.19) и белка кальпаинов (рис. 3.4.20), а также их активность (рис. 3.4.21) в клетках стриатума и гиппокампа.

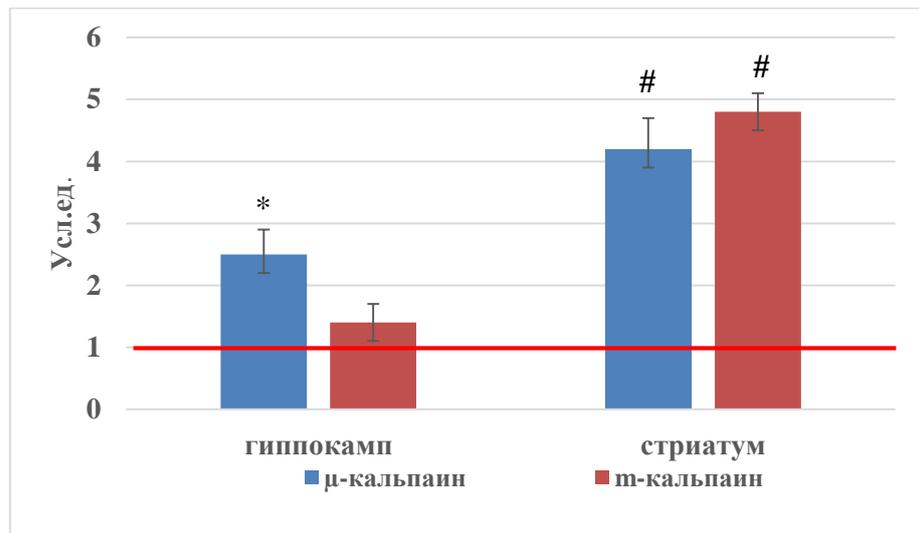
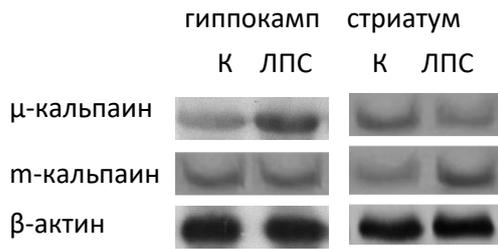


Рисунок 3.4.19 – Уровень мРНК μ - и m-кальпаина в гиппокампе и стриатуме крыс через 180 дней после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг; в каждой точке n=5. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, красной линией обозначен уровень контрольных значений. Критерий Стьюдента для независимых выборок, * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем; # - $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

Оказалось, что в гиппокампе более чем в два раза относительно контроля повышено содержание мРНК μ -кальпаина, при этом уровень мРНК m-кальпаина не отличается от контроля. В клетках стриатума мы выявили иные изменения – более чем 4-х кратное повышение уровня мРНК обеих протеаз (рис. 3.4.19).

А.



Б.

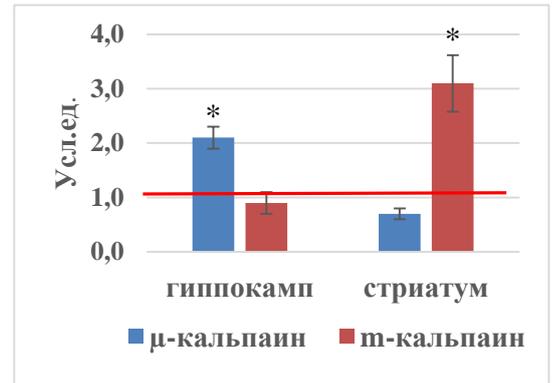
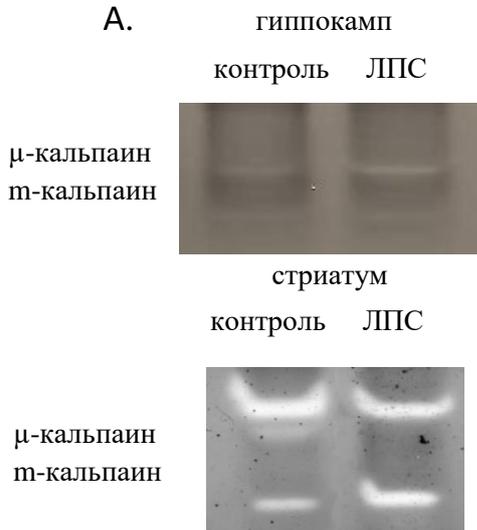


Рисунок 3.4.20 – Содержание μ- и m-кальпаина в гиппокампе и стриатуме крыс через 180 дней после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг. А. Репрезентативный иммуноблотт, где К – контроль. Б. Результаты денситометрирования иммуноблоттов, проявленных антителами к μ- и m-кальпаину, n=5. Данные представлены как среднее ± ошибка среднего, красной линией обозначен уровень контрольных значений. Критерий Стьюдента для независимых выборок, * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

В клетках гиппокампа наблюдается выраженное усиление продукции μ-кальпаина, а в стриатуме, напротив, – m-кальпаина, при неизменном и, в двух случаях из пяти, сниженном содержании μ-кальпаина (рис. 3.4.20).

А.



Б.

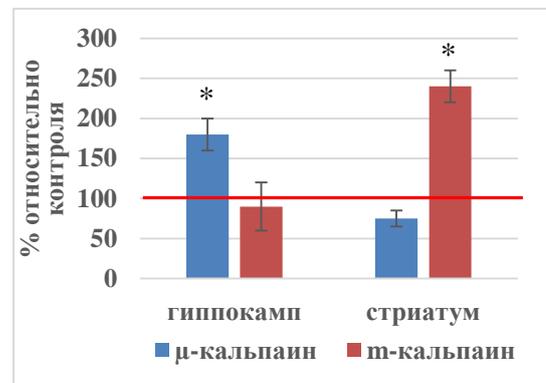


Рисунок 3.4.21 – Активность μ- и m-кальпаина в гиппокампе и стриатуме крыс через 180 дней после введения ЛПС в дозе 1 мг/кг. А. Репрезентативные зимограммы. Б. Результаты измерения площадей обесцвеченных зон, нормированные на контроль, n=5. Данные представлены как среднее ± ошибка среднего, красной линией обозначен уровень контрольных значений. Критерий Стьюдента для независимых выборок, * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

При сопоставлении данных, представленных на рис. 3.5.20 и рис. 3.5.21, прослеживается, что изменение активности анализируемых кальпаинов прямо пропорционально изменению их продукции: повышение продукции μ-

кальпаина в гиппокампе соответствует его повышенной активности в данной области ЦНС; повышение продукции m -кальпаина в стриатуме также сопровождается повышением активности данной протеазы. Как уже было сказано выше, в среднем ни продукция, ни активность μ -кальпаина в стриатуме не изменилась, однако у двух животных мы наблюдали снижение продукции и активности данной протеазы, при этом у них было максимальное из всех тестируемых животных содержание и активность m -кальпаина, а также наблюдались наиболее выраженные двигательные нарушения.

Резюмируя, можно заключить, что внутрибрюшинное введение субсептической дозы ЛПС крысам в отдаленном периоде вызывает в клетках гиппокампа усиление продукции мРНК ФНО α (без признаков активации микроглии), сопровождаемое усилением продукции мРНК, белка и активности μ -кальпаина (но не m -кальпаина), при неизменном относительно контроле содержания и скорости метаболизма дофамина и норадреналина. В клетках стриатума наблюдается усиление продукции мРНК ФНО α и мРНК маркера активации микроглии IBA-1, снижение скорости синтеза дофамина с одновременным усилением его высвобождения нервными окончаниями, сопряженное с усилением продукции мРНК, белка и активности m -кальпаина (но не μ -кальпаина). Таким образом, в остром, раннем отсроченном и в позднем отсроченном периодах клетки гиппокампа и стриатума по-разному реагируют на введение субсептической дозы ЛПС. Для клеток гиппокампа характерно отсутствие «перестроек» метаболизма дофамина и повышение продукции мРНК ФНО α , сопряженное с повышением содержания и активности μ -кальпаина. В клетках стриатума выявляются признаки активации микроглиоцитов, повышение продукции мРНК ФНО α , признаки деструкции нейронов черной субстанции, повышение содержания и активности m -кальпаина.

Для прямого подтверждения наличия/отсутствия дегенеративных изменений в стриатуме и гиппокампе были охарактеризованы некоторые патоморфологические изменения. Данные приведены на рис. 3.4.22.

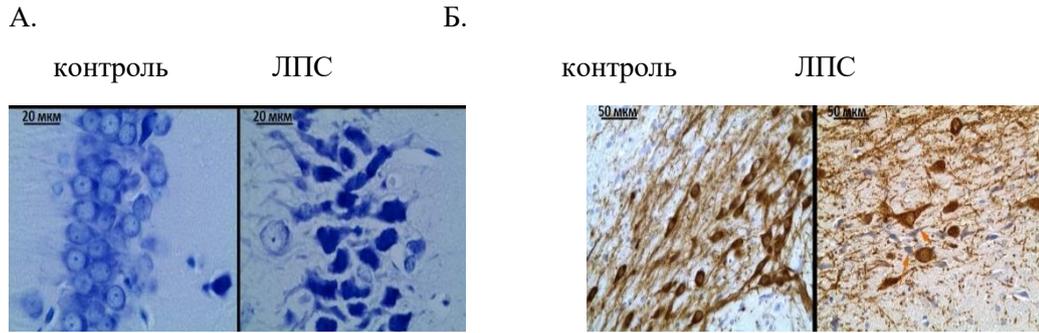


Рисунок 3.4.22 – Патоморфологические изменения в гиппокампе и в черной субстанции крыс после интраперитонеального введения ЛПС в дозе 1 мг/кг. А. Гистологическое окрашивание по методу Ниссля, представлена область СА1 гиппокампа; Б. Иммуногистохимическое выявление ТГ в нейронах черной субстанции. Нейроны, иммунопозитивные по ТГ, окрашены в темный цвет. Ядра подкрашены гематоксилином. Оранжевыми стрелками указаны дегенерирующие нейроны.

При окрашивании гиппокампа по методу Ниссля (рис. 3.4.22 А) было выявлено, что область СА1 гиппокампа контрольной группы содержит окрашенные пирамидные нейроны и единичные непирамидные нейроны, располагающиеся в *stratum oriens*. Ядра клеток были округлой формы, богатые эухроматином, с четко контурированным ядрышком. Цитоплазма содержала хроматофильную субстанцию, большая часть которой располагалась перинуклеарно и в базальной части клетки, т.е. в области, противоположной области отхождения основного дендрита. Четкого разделения эухроматина на глыбки не наблюдалось. В образцах, полученных от животных, которым вводили ЛПС в поле СА1, встречались многочисленные сморщенные нейроны палочковидной и треугольной формы, также укрупненные. В этих нейронах не просматривались ядра. «Сморщенность» нейронов не является дефектом при пробоподготовке, поскольку в этой области были также обнаружены нейроны с нормальной структурой.

При окрашивании антителами против ТГ срезов, полученных от животных контрольной группы, нами было выявлено типичное расположение нейронов, характерное для ЧР. Большинство нейронов имели интенсивно окрашенную цитоплазму, округлые ядра. В экспериментальной группе количество нейронов, содержащих ТГ, было значительно меньше. Наряду с нормальными по структуре нейронами выявлялись многочисленные дегенерирующие клетки («клетки-тени» и клетки с начальными признаками

дегенерации). Дегенерирующие нейроны были преимущественно веретеновидной формы, без видимого ядра и со слабым окрашиванием ТГ по периферии. Таким образом, в компактной части ЧС наблюдается большое количество дегенерирующих нейронов, в которых ТГ практически не выявляется, что согласуется с описанными выше данными – снижением уровня дофамина в стриатуме.

Далее мы проанализировали активность m-кальпаина в синаптических окончаниях нейронов экспериментальных животных. Для этого из стриатумов контрольных и экспериментальных животных, которым вводили ЛПС 180 дней назад, были выделены синаптосомы, и в них методом зимографии в геле определена активность m-кальпаина. Данные представлены на рис. 3.4.23.

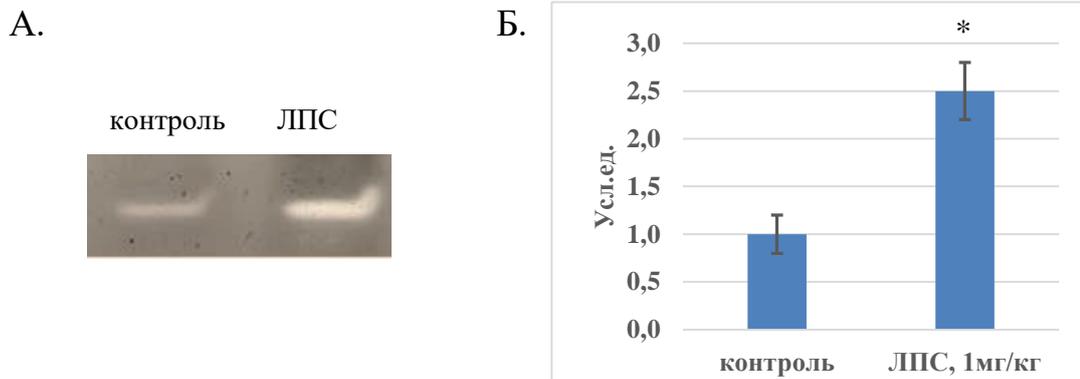


Рисунок 3.4.23 – Активность m-кальпаина в синаптосомах, выделенных из стриатумов крыс, получивших 180 дней назад интраперитонеальную инъекцию ЛПС в дозе 1 мг/кг. А. Репрезентативная зимограмма. Б. Результаты измерения площадей обесцвеченных зон, n=8. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, красной линией обозначен уровень контрольных значений. Критерий Стьюдента для независимых выборок, * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Таким образом, судя по данным, представленным на рис. 3.4.21 и 3.4.23, выявленное нами в гомогенате клеток стриатума повышение активности m-кальпаина характерно и для синаптосомальной фракции. У этих же животных мы определили уровень синаптосомального дофамина. В контрольной группе он составлял 5,5 нг/мкг белка синаптосом. У экспериментальных животных это значение было 2,1 нг/мг белка синаптосом, что соответствует примерно 2-

х кратному снижению содержания нейромедиатора. Сопоставляя эти результаты с данными, представленными на рис. 3.5.18, можно заметить, что выявленное нами снижение уровня дофамина в гомогенате клеток стриатума и в синаптосомальной фракции – сопоставимы. Принимая во внимание, что содержание ГВК в этих образцах было значимо выше, мы провели поиск вероятных сайтов взаимодействия кальпаинов с КОМТ и МАО-В. Оказалось, что в обоих ферментах катаболизма дофамина они выявляются. Данные приведены на рис. 3.4.24.

А. >NP_036663.1 catechol O-methyltransferase [Rattus norvegicus]

At the high threshold 0.0037
Possible cleavable peptides according to the score in descending order are as following:

# No. (start residue - end residue)	Peptide sequence and cleavage site	Score
#1 (252-259)	KAIY↓QGPS	0.29268
#2 (256-263)	QGPS↓SPDK	0.15245
#3 (257-264)	GPSS↓PDKS	0.07912
#4 (254-261)	IYQG↓PSSP	0.07003

Б. >AAA41566.1 monoamine oxidase B [Rattus norvegicus]

At the high threshold 0.0037
Possible cleavable peptides according to the score in descending order are as following:

# No. (start residue - end residue)	Peptide sequence and cleavage site	Score
#1 (67-74)	RILR↓LAKE	0.8728
#2 (478-485)	TNTF↓LERH	0.7232
#3 (452-459)	HAIG↓KIPE	0.6238
#4 (259-266)	YVIS↓AIPP	0.5469

Рисунок 3.4.24 – Вероятные сайты расщепления КОМТ (А) и МАО-В (Б) крысы кальпаинами. Данные получены с помощью сервиса LabCaS (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/LabCaS>). https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/papers/2013_7.pdf

Как видно из данных, представленных на рис. 3.4.24, в аминокислотной последовательности обоих ферментов выявляются потенциальные сайты расщепления кальпаином, причем, исходя из полученных данных, наиболее вероятно расщепление КОМТ на участке K252-S259 (внеклеточный домен белка, содержащий сайт фосфорилирования S259). Отщепление С-концевого

пептида QGPSSPDKS может существенным образом сказаться на функциональной активности фермента. Таким образом, m-кальпаин может напрямую модулировать катаболизм дофамина, например, расщепляя утилизирующие его ферменты. Однако расщепление КОМТ по этому сайту возможно только в случае внеклеточной локализации кальпаина, которая была нами продемонстрирована на модели выделенных нервных окончаний. Среди других последствий наблюдаемого нами увеличения активности m-кальпаина в клетках ЦНС животных, получивших инъекцию ЛПС, можно выделить следующие. m-кальпаин способен расщеплять протеинкиназу C (ПКC). Это приводит к разобщению каталитической и регуляторной субъединиц ПКC и образованию короткоживущей конститутивно активной протеинкиназы M (ПКM). ПКМ напрямую регулирует высвобождение дофамина, фосфорилируя DAT и D2 рецептор [164]. Возможно и опосредованное влияние кальпаинов на выживаемость дофаминергических нейронов. Например, кальпаины могут регулировать транслокацию NF- κ B в ядро, расщепляя его белок-ингибитор, тем самым способствуя продукции провоспалительных медиаторов, что, в свою очередь, вызывает развитие нейровоспаления и нейродегенерации [310]. Действительно, мы показали, что развитие системной воспалительной реакции приводит к увеличению уровня мРНК μ - и m-кальпаина в клетках стриатума и увеличению активности m-кальпаина, сопряженные с увеличением мРНК ФНО α . Сходный эффект обнаружен после введения 2 мкг ЛПС непосредственно в ЧС, при этом уже через 21 день наблюдалась 50% гибель Да-нейронов вследствие развития хронического нейровоспаления, при этом нейроны другой эргичности не страдали [311]. Наиболее вероятна реализация следующей цепи событий: в ответ на аппликацию ЛПС клетки микроглии активируются и начинают продуцировать нейротоксические факторы (провоспалительные цитокины, активные формы кислорода и азота), которые вызывают гибель близлежащих нейронов; внутринейрональные белки (в том числе кальпаин) оказываются в межклеточной жидкости и активируют клетки микроглии, что способствует распространению процесса [312]. Так

активируется и замыкается цепь патологической самоактивации. Действительно, через 6 месяцев после введения ЛПС мы наблюдаем более чем 2-х кратное увеличение активности m-кальпаина, 50% гибель ДА-нейронов, а у животных появляются выраженные двигательные нарушения.

Возможен еще один путь включения m-кальпаина в реализацию нейротоксических эффектов – через активацию каспаз. На первичной культуре микроглиальных клеток показано, что добавление в культуральную среду ЛПС в дозе 20 нг/мл вызывает увеличение продукции и активности m-кальпаина, но никак не сказывается на содержании μ -кальпаина. Данные изменения сопровождаются активацией каспазы-12, и часть клеток погибает путем апоптоза. Наблюдаемый эффект практически полностью подавляется 10мкМ ингибитора кальпаина Z-Leu-Leu-CHO или siРНК против m-кальпаина, но не против μ -кальпаина [313]. Вероятно, в условиях гиперактивации m-кальпаина в стриатуме часть микроглиальных клеток погибает путем апоптоза, что является дополнительным стимулом для активации уцелевших микроглиоцитов и гибели нейронов.

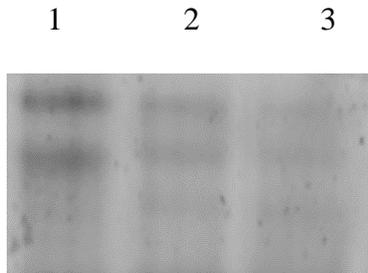
Остается открытым вопрос о причинах различной «реакции» кальпаинов на введение ЛПС в клетках гиппокампа и стриатума. Можно было бы предположить, что в гиппокампе нет дегенеративных изменений, однако, судя по данным, отображенным на рис. 3.4.22, в гиппокампе, как и в стриатуме/ЧС, присутствуют дегенерирующие нейроны, но повышения продукции и гиперактивации m-кальпаина не наблюдается (рис. 3.4.20 и рис. 3.4.21). Действительно, «сморщенность» нейронов поля CA1 гиппокампа является признаком дегенерации, однако существуют данные, что такие нейроны способны восстанавливаться. В дополнение к этому гиппокамп является областью мозга с высокой пластичностью, со способностью к нейрогенезу. Возможно, обнаруженные нами изменения разрешаются со временем. В работе [314] показано, что при хроническом (5 месяцев) интраназальном введении ЛПС в дозе 10 мкг/день мышам выявляются признаки дегенерации в стриатуме и ЧС, но не в гиппокампе, при этом у экспериментальных животных

в тесте «Водный лабиринт Морриса» детектируются выраженные нарушения памяти. Нарушения памяти также были выявлены у мышей, получивших интраперитонеальную инъекцию ЛПС в дозе 500 мкг/кг или 750 мкг/кг, уже через 7 дней после введения эндотоксина. При этом авторы наблюдали в гиппокампе экспериментальных животных усиление продукции маркера активации микроглии IBA-1, ИЛ-1 β , ФНО α и NF κ B [315]. Действительно, в наших экспериментах на ранних сроках после введения ЛПС мы также детектируем повышение уровня мРНК ФНО α , а также гиперактивацию кальпаинов, которая может привести к NF κ B-зависимой индукции синтеза провоспалительных агентов, но отсроченные эффекты в гиппокампе совершенно иные. Наиболее значимое отличие – повышение в клетках гиппокампа продукции и активности μ -, а не m-кальпаина, который, вероятно, оказывает нейропротективное или модулирующее действие. Действительно, было показано, что подавление активности кальпаинов с помощью специфических ингибиторов или siРНК приводит к предотвращению индукции LTP (long-temp potentiation), а у мышей с нокаутом гена μ -кальпаина и вовсе нарушена гиппокамп-зависимая пространственная память, вероятно, вызванная развитием вялотекущего нейродегенеративного процесса в CA1 поле гиппокампа [212, 315, 316]. Такие нарушения могут быть вызваны неспособностью нейронов в отсутствие кальпаинов к функциональной и морфологической реорганизации синаптических контактов. Кроме этого, оказалось, что μ -кальпаин способен модулировать эффективность связывания глутамата с его рецепторами [221]. Например, системное или интрацеребровентрикулярное введение агонистов рецепторов глутамата (кайнат или NMDA) индуцирует кальпаин-зависимое расщепление спектрина и MAP2 [215]. Добавление NMDA к переживающей культуре клеток гиппокампа вызывает активацию кальпаина, который, в свою очередь, расщепляет спектрин, вызывая изменение цитоархитектуры клетки (возможная причина наблюдаемой нами «сморщенности» нейронов поля CA1 гиппокампа). Кроме этого, кальпаин может расщеплять белки, входящие в

состав рецепторов к нейромедиаторам. Например, все три подтипа NR2 (NR2A-C) субъединицы NMDA-рецепторов являются субстратами кальпаина [218]. Таким способом может реализовываться нейропротективный эффект. Действительно, расщепляя NR2A субъединицу, кальпаин может подавить активность NMDA рецептора глутамата и тем самым предотвратить развитие эксайтотоксичности [219]. Другой вариант развития событий – активация NMDA рецепторов приводит к повышению продукции и активности μ -кальпаина, который расщепляет PHLPP1 фосфатазу (leucine-rich repeat protein phosphatase 1) и тем самым снимает блок с Akt- и ERK1/2-зависимых сигнальных путей, определяющих выживание клетки. Однако следует обратить внимание, что активация внесинаптических NMDA-рецепторов приводит к активации m-кальпаина, расщеплению STEP-фосфатазы (striatal-enriched protein tyrosine phosphatase) и, как следствие, к смерти нервной клетки [224]. Также недавно показано, что в пирамидальных нейронах поля CA1 и CA3 гиппокампа в ответ на повреждающие стимулы (апликация кайната) быстро активируется m-кальпаин, а активация μ -кальпаина характерна лишь для некоторых подтипов интернейронов, например, для парвальбумин-позитивных [316]. Принимая во внимание эти данные, можно предположить, что в ответ на введение субсептической дозы ЛПС в клетках гиппокампа, как и при введении кайната, активируется m-кальпаин, что приводит к расщеплению некоторых цитоплазматических белков и изменению морфологии клетки. Данные изменения со временем компенсируются, в частности, за счет повышения продукции/активности μ -кальпаина и активации сигнальных путей, определяющих выживание клетки. В клетках стриатума, напротив, в раннем периоде наблюдается снижение активности μ -кальпаина, что, вероятно, является одним из факторов, подавляющих адаптационные процессы в ЦНС и приводящих к развитию нейродегенеративных изменений, сопровождающихся гиперактивацией m-кальпаина.

Поскольку в крови пациентов с БП мы обнаружили увеличение активности кальпаинов, то этот же параметр был нами проанализирован и в крови крыс через 180 дней после введения ЛПС, результаты приведены на рис. 3.4.25.

А.



Б.

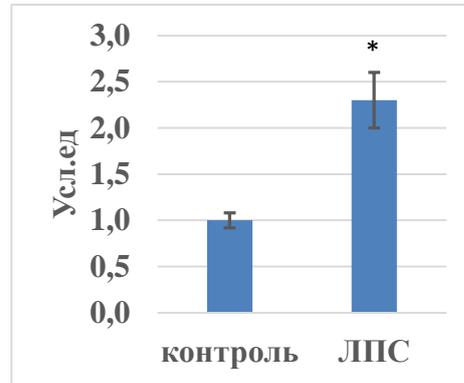


Рисунок 3.4.25– Казеинограмма, отражающая активность кальпаинов в плазме крови крыс через 180 дней после интраперитонеального введения субсептической дозы ЛПС, в каждой точке n=8. А. Вид типичной казеинограммы, где (1) - исходный FITC-казеин; (2) - FITC-казеин после инкубации с плазмой крови животных контрольной группы, (3) - FITC-казеин после инкубации с плазмой крови животных, получивших инъекцию ЛПС. Б. Результат денситометрирования зон, соответствующих фрагментам FITC-казеина к нерасщепленному FITC-казеину. Средний показатель в контрольной группе принят за 1. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, t-критерий для несвязанных групп, * - $p < 0,02$ по сравнению с контрольной группой.

Оказалось, что через 180 дней после интраперитонеального введения субсептической дозы ЛПС в плазме крови животных наблюдается повышение активности кальпаинов более чем в два раза по сравнению с контрольными животными соответствующего возраста (рис. 3.4.25). Однако с помощью данного метода невозможно выявить активность разных изоформ кальпаинов. На этот вопрос можно было бы ответить, применив метод казеиновой зимографии в геле, но чувствительности данного метода оказалась недостаточно (данные не показаны). Для контрольной и экспериментальной группы мы сопоставили активность кальпаинов в плазме крови с активностью m-кальпаина в синапсосомах, выделенных из стриатума этих же животных. Результаты приведены на рис. 3.4.26.

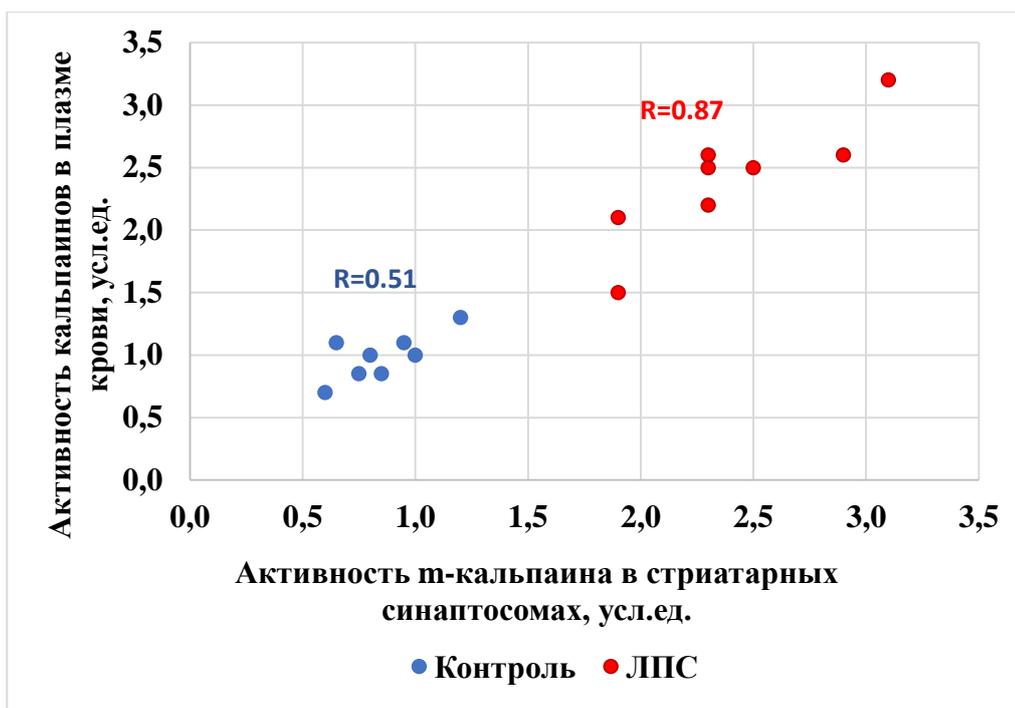


Рисунок 3.4.26 – Диаграмма рассеяния, отражающая зависимость между активностью кальпаинов в плазме крови и активностью m-кальпаина в синапсах, выделенных из стриатумов. Данные представлены в условных единицах, рассчитанных относительно показателей одного животного из контрольной группы. Коэффициенты корреляции Спирмена приведены на графике, $p < 0,05$.

Из данных, приведенных на рис. 3.4.26 видно, что обнаруживается прямая корреляционная связь между активностью кальпаинов в плазме крови и активностью m-кальпаина в синапсах, выделенных из стриатумов соответствующих животных, причем для контрольной группы выявляется связь средней силы ($R=0,51$), а для экспериментальной группы – сильная связь ($R=0,87$). Корреляционный анализ не позволяет установить причинно-следственные связи для выявленной закономерности, однако само наличие такой связи свидетельствует в пользу выдвинутой нами гипотезы о церебральном происхождении кальпаинов плазмы крови и/или о наличии механизма сопряжения активации m-кальпаина в нервных окончаниях и в плазме крови. В любом случае, исходя из полученных результатов, активность кальпаинов плазмы крови можно рассматривать в качестве диагностического/прогностического маркера выраженности нейродегенеративного процесса.

3.4.2. Содержание и активность кальпаинов в ЦНС крыс после интраназального введения $MnCl_2$

Работ, посвященных изучению функционального состояния кальпаиновой системы при интоксикации соединениями марганца, практически нет. Между тем, предположение о непосредственном участии кальпаинов в реализации марганцевой нейротоксичности очевидно. Действительно, одним из повреждающих механизмов марганца в отношении нервных клеток является активация NMDA рецепторов глутамата и, как следствие, массивный вход кальция в клетку. Увеличение концентрации внутриклеточного кальция неизбежно приведёт к активации кальпаинов, преимущественно m-кальпаина. Чрезмерная активация m-кальпаина и его высвобождение во внеклеточную среду, в свою очередь, должно вызвать нарушение регуляции многих физиологических функций, в том числе привести к дестабилизации синаптических связей и/или гибели нервной клетки [270]. При этом роль μ -кальпаина в описываемом выше процессе непонятна.

Для выявления вклада кальпаинов в развитие функциональных перестроек в ЦНС крыс в ответ на избыточное поступление хлорида марганца в организм, крысам Вистар ежедневно на протяжении 90 дней интраназально вводили 1 мг $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ в объеме 20 мкл; животные контрольной группы получали физиологический раствор по аналогичной схеме. На первом этапе мы оценивали последствия введения хлорида марганца на общеорганизменном уровне. Для этого измеряли массу тела животных. Данные представлены на рис. 3.4.27.

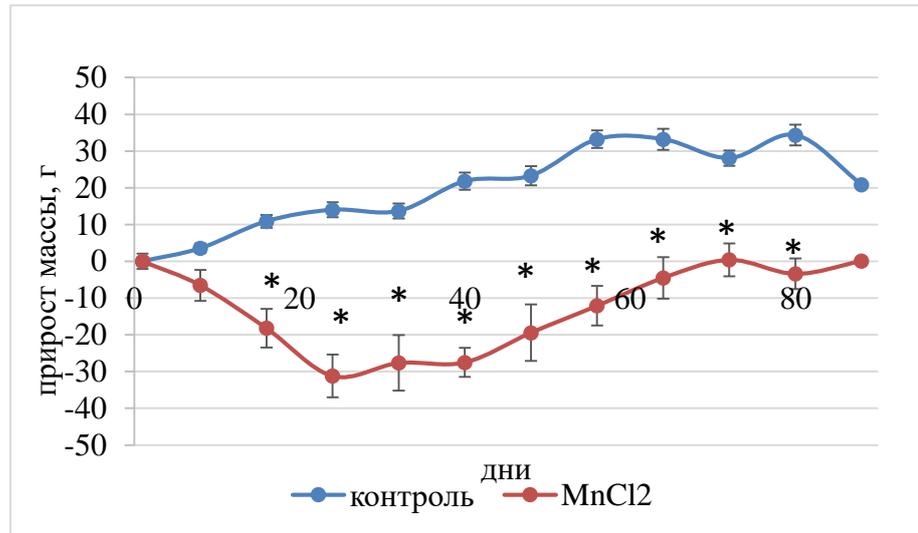


Рисунок 3.4.27 – Динамика изменения массы тела животных при хроническом интраназальном введении $MnCl_2$. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего ($n_1 = n_2 = 20$); точки для наглядности соединены линиями; критерий Стьюдента для независимых выборок; * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой в соответствующий день.

Из данных, представленных на рис. 3.4.27, видно, что масса крыс в опытной группе падает по сравнению с контролем, и на протяжении всего периода наблюдения остается значимо ниже.

Для пациентов, подвергшихся интоксикации соединениями марганца, характерно появление и нарастание синдрома паркинсонизма, псевдобульбарного синдрома в сочетании с вегетативными и мозжечковыми расстройствами (невнятная речь, значительное обеднение мимики, проблемы с координацией движений, мышечная ригидность, мультифокальная дистония, постуральная нестабильность с частыми падениями). В нашей модели мы проанализировали походку животных по отпечаткам лап в тесте «Следы» (рис. 3.4.28) и двигательную активность в тесте «Открытое поле» (рис. 3.4.29) в двух временных точках – в дебюте развития моторной симптоматики и при появлении выраженных нарушений, детектируемых при визуальном осмотре.

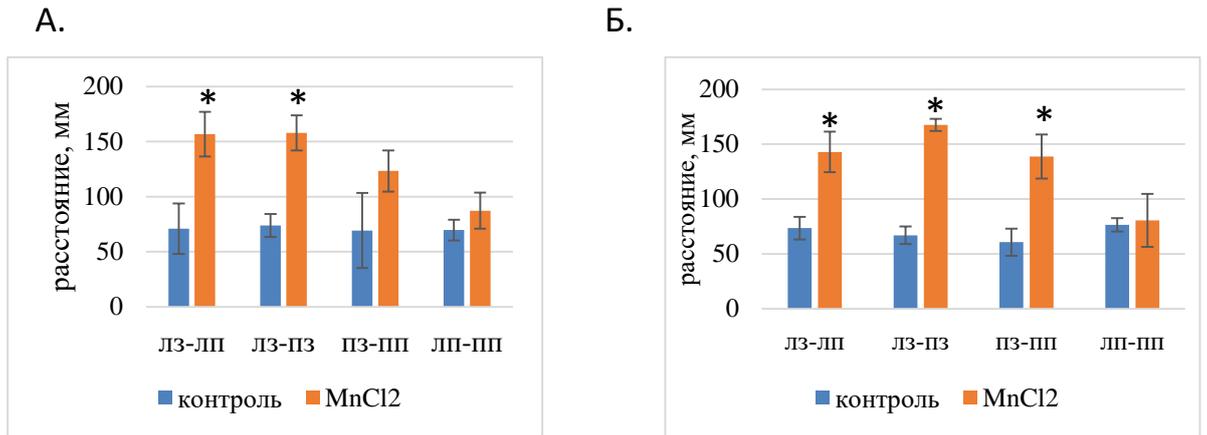


Рисунок 3.4.28 – Расстояния между соответствующими лапами в тесле «Следы» на 20 день эксперимента (А) и 60 день эксперимента (Б): лз-лп – расстояние между левой задней и левой передней лапой, лз-пз – расстояние между левой задней и правой задней лапой, пз-пп – расстояние между правой задней и правой передней лапой, лп-пп – расстояние между левой передней и правой передней лапой. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего ($n_1 = n_2 = 10$); критерий Стьюдента для независимых выборок; * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой в соответствующий день.

Оказалось, что у животных, получающих хлорид марганца, к 20 дню введений наблюдается увеличение ширины шага слева и расстояния между задними конечностями по сравнению с контролем. К 60-му дню эти изменения не только сохранялись, но развились и нарушения справа, а расстояние между постановкой передних лап осталось неизменным. Выявленные изменения свидетельствуют о выраженном нарушении походки у экспериментальных животных.

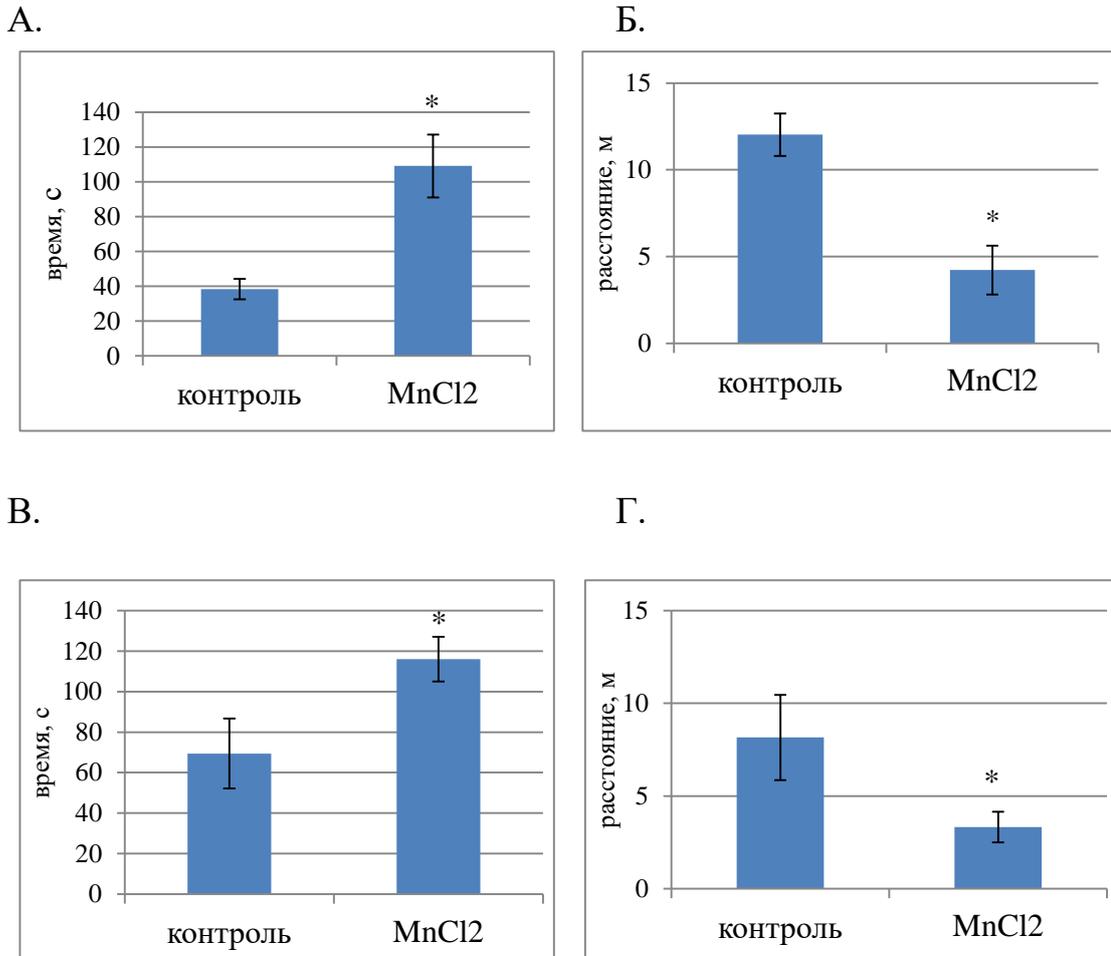


Рисунок 3.4.29 – Двигательная активность крыс при хроническом интраназальном введении $MnCl_2$, оцененная в тесте «Открытое поле»: время нахождения в неподвижном состоянии на 30-й день эксперимента (А) и 90-й день эксперимента (В); пройденное расстояние на 30-й день эксперимента (Б) и 90-й день эксперимента (Г). Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего ($n_1 = n_2 = 10$); критерий Стьюдента для независимых выборок; * $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Из данных, приведенных на рис. 3.4.29, видно, что на 30 день введения $MnCl_2$ у животных возрастает время нахождения в неподвижном состоянии и уменьшается пройденное ими расстояние по сравнению с контролем. К 90-му дню эти изменения сохраняются. Наши результаты указывают на то, что уже через 30 дней после начала введений марганца и до конца эксперимента локомоторная активность у экспериментальных животных снижена. Локомоторная активность в первые 3 минуты в тесте «Открытое поле» может рассматриваться как индикатор эмоционального ответа на незнакомую обстановку, а снижение активности коррелирует с повышением тревожности [317]. В связи с этим, мы полагаем, что выявленное нами снижение

локомоторной активности у экспериментальных крыс связано с развитием эмоциональных нарушений (повышение тревожности и, возможно, с депрессией), что характерно и для человека [318]. К подобным заключениям приходят и другие авторы [319, 320]. Для того чтобы проверить связь выявленных поведенческих изменений с накоплением марганца в ЦНС, было определено его содержание в гиппокампе, стриатуме, сыворотке крови и в печени. Данные представлены на рис. 3.4.30.

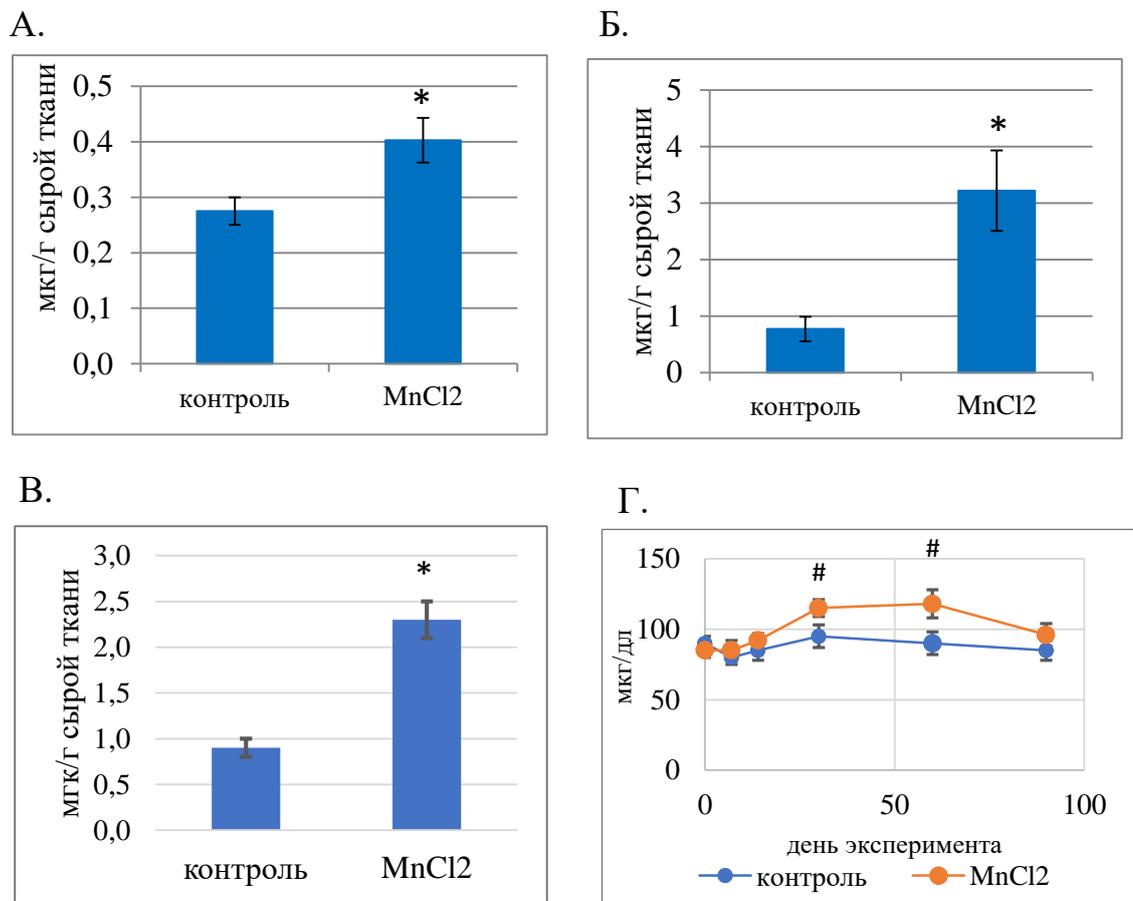


Рисунок 3.4.30 – Содержание марганца в гиппокампе (А), стриатуме (Б), печени (В) и в сыворотке крови (Г) крыс после хронического интраназального введения MnCl₂ (n₁=n₂=7); критерий Стьюдента для независимых выборок; * p<0,05 по сравнению с контролем, ** p<0,001, # p<0,05 по сравнению с контролем в соответствующий день эксперимента.

В клетках гиппокампа содержание марганца увеличилось в 1,5 раза, а в клетках стриатума – в 3,8 раз, в клетках печени – в 2,6 раза. В сыворотке крови уровень марганца отличался от контроля лишь на 30-й - 60-й день введения препарата (рис. 3.4.29).

Вероятнее всего, накопление марганца в гиппокампе и стриатуме приводит к дизрегуляции, по крайней мере, трех нейромедиаторных систем: дофаминергической, глутаматергической и ГАМК-ергической, и эти изменения затрагивают как внутренние ассоциативные связи, так и пути, связывающие различные структуры мозга. Действительно, имеются клинические и экспериментальные свидетельства влияния повреждения нейронов гиппокампа на активность дофаминергических нейронов среднего мозга [321]. Интересно, что в сыворотке крови животных через 90 дней после начала введения марганца его содержание повышено не было. Сходные наблюдения были сделаны и другими авторами. Например, после отмены препарата на фоне 10-ти недельного введения хлорида марганца его уровень в сыворотке крови животных также не отличался от контроля [322]. Вероятнее всего, марганец накапливается клетками крови, в частности, эритроцитами, на мембране которых есть транспортеры двухвалентных ионов. В клинических исследованиях уже показано, что у сварщиков содержание марганца в эритроцитах значительно превосходит показатели контрольной группы [323, 324].

При попадании в ЦНС марганец накапливается преимущественно в астроцитах и клетках микроглии, вызывая их активацию и способствуя развитию нейровоспаления, которое, как уже обсуждалось выше, вызывает гибель нейронов [325]. В связи с этим, как и в экспериментах по введению субсептических доз ЛПС, в клетках гиппокампа и стриатума нами было определено содержание мРНК основных провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β и ФНО α), маркера активации микроглии IBA-1, а также NF κ B и I κ B. Данные представлены на рис. 3.4.31 и 3.4.32.

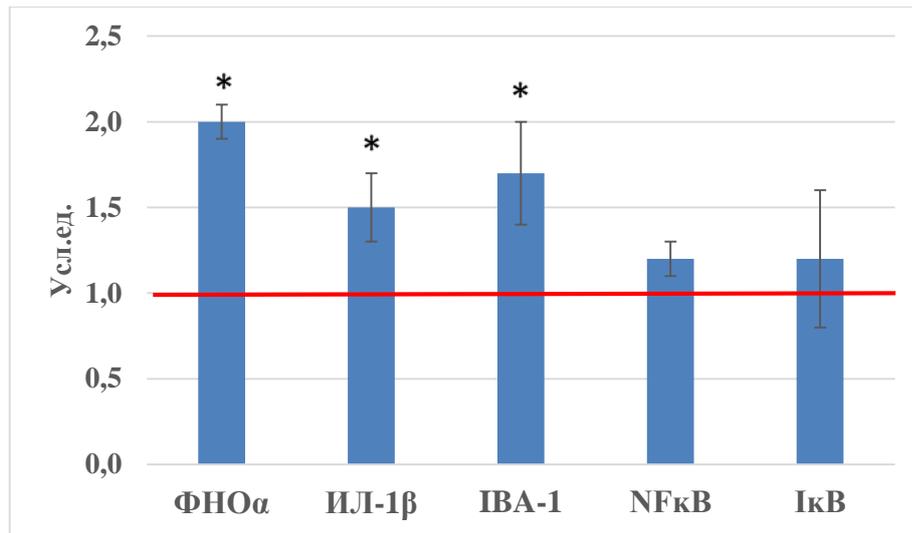


Рисунок 3.4.31 – Уровень мРНК ИЛ-1 β , ФНО α , IBA-1, NF κ B и I κ B в гиппокампе крыс на 90-й день интраназального введения MnCl₂. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего (n1=n2=7), красной линией обозначен уровень контрольных значений. Критерий Стьюдента для независимых выборок; * p < 0,05 по сравнению с контролем.

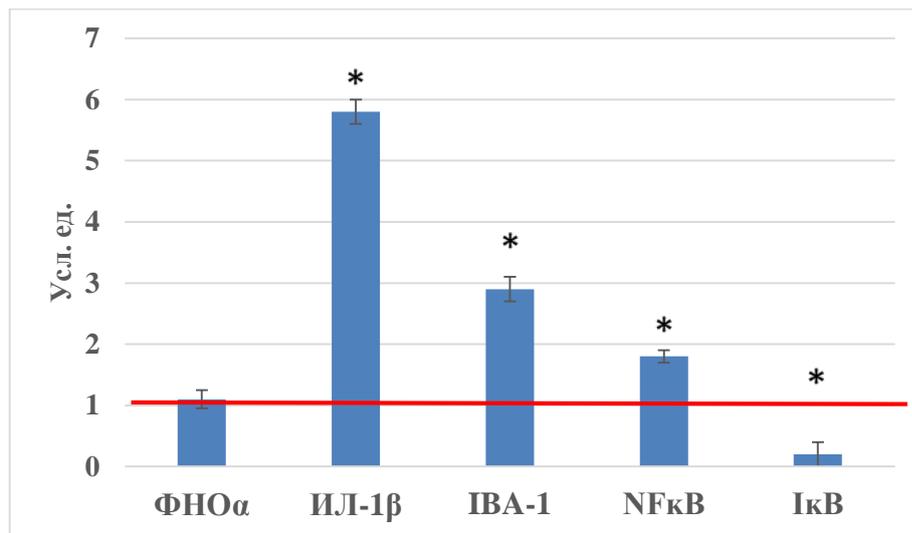


Рисунок 3.4.32 – Уровень мРНК ИЛ-1 β , ФНО α , IBA-1, NF κ B и I κ B в стриатуме крыс на 90-й день интраназального введения MnCl₂. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего (n1=n2=7), красной линией обозначен уровень контрольных значений. Критерий Стьюдента для независимых выборок; * p < 0,05 по сравнению с контролем.

При выбранной дозе и схеме введения MnCl₂ в клетках гиппокампа наблюдается 2-х кратное повышение содержания мРНК ФНО α , а также увеличение содержания мРНК ИЛ-1 β в 1,5 раза, при этом наблюдаются признаки активации микроглии – увеличение продукции мРНК IBA-1 (рис. 3.4.31). Удивительно, что изменения продукции мРНК NF κ B (субъединица

p65) и IκB не происходит. Поскольку под контролем транскрипционного фактора NFκB находится продукция основных цитокинов, а его активация является цитокин-зависимой, вероятно, на 90-й день после начала введения MnCl₂ все адаптационные перестройки в гиппокампе уже завершены, и мы наблюдаем за процессом восстановления. В используемой нами модели ЛПС-индуцированной дегенерации на 180-й день после введения эндотоксина уже не наблюдалось увеличения содержания мРНК провоспалительных цитокинов, а вот в остром периоде реакция клеток гиппокампа была схожей. Подобный факт ранее уже был описан: на 7-й день после введения мышам MnCl₂ (100 мг/кг) или ЛПС (200 мкг/животное) содержание ИЛ-1β в гомогенате клеток гиппокампа увеличивалось в 4 и 5 раз соответственно, при этом увеличение мРНК данного цитокина было пропорционально увеличению содержания его белкового продукта [326].

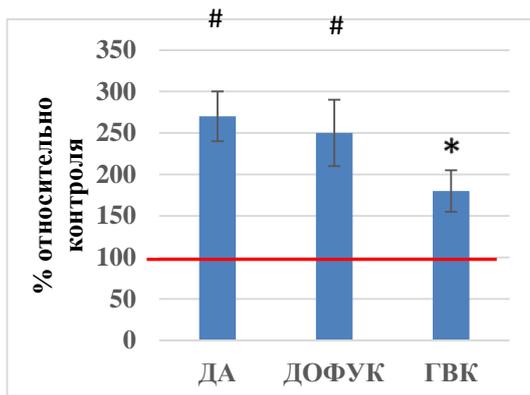
В клетках стриатума (рис. 3.4.32) мы наблюдали увеличение содержания мРНК ИЛ-1β (более чем в 5 раз по сравнению с контролем), но не ФНОα; в остальном проявлялись все признаки развития воспалительной реакции – увеличение продукции мРНК IBA-1 в 3 раза, сопряженной с повышением мРНК NFκB (p65) в 2 раза и снижением IκB в 8 раз. Полученные нами данные согласуются с результатами, описанными в ряде экспериментальных и клинических исследований. Например, в *post mortem* образцах мозга пациентов с марганцевой энцефалопатией (бледный шар) обнаруживаются активированные астроциты и микроглиоциты [327]. Признаки активации астроцитов и микроглии без существенной гибели дофаминергических нейронов обнаружены в черной субстанции приматов - *Cynomolgus macaques*, получавших внутривенные инъекции 15 мг/кг MnSO₄ раз в неделю на протяжении 50 недель [328]. Однако ни в нашем исследовании, ни в исследовании коллег нет ответа на вопрос какие именно клетки ЦНС начинают продуцировать провоспалительные факторы в ответ на аппликацию солей марганца: астроциты или микроглия? Частично на этот вопрос отвечают в [329]. На смешанной первичной культуре астроцитов и микроглиальных

клеток, выделенных из коры головного мозга новорожденных мышей, они показали двукратное повышение продукции мРНК ФНО α и 6-ти кратное ИЛ-1 β в ответ на аппликацию 100 мкМ MnCl $_2$, при этом по отдельности ни на культуре астроцитов, ни на микроглиоцитах этот эффект не проявлялся. Добавление ингибитора NF κ B Bay 11-7082 приводило к тому, что и в смешанной культуре, и в культуре астроцитов продукция мРНК ФНО α и ИЛ-1 β усиливалась, а экспрессия других NF κ B-зависимых генов (*nos2*, *c3*, *ccl5* и др.) подавлялась. Данный эффект не проявлялся на астроцитах, не экспрессирующих IKK2 (IkB-киназа) [329]. Следовательно, для развития марганец-индуцированной воспалительной реакции в ЦНС необходимо взаимодействие астроглиальных и микроглиальных клеток. В другом исследовании показано, что в активированной цитокинами смешанной культуре астроцитов и нейронов, но не в культуре нейронов, марганец стимулирует высвобождение провоспалительных цитокинов, циклооксигеназы-2 и простагландина E2 астроцитами, и тем самым индуцирует апоптоз нейронов. Активация же микроглиальных клеток приводит к высвобождению ими АФК и широкого спектра провоспалительных факторов [330]. Кроме этого, описанные выше данные частично подтверждают наши результаты о наличии механизма увеличения продукции мРНК ФНО α и ИЛ-1 β не через NF κ B-зависимый путь.

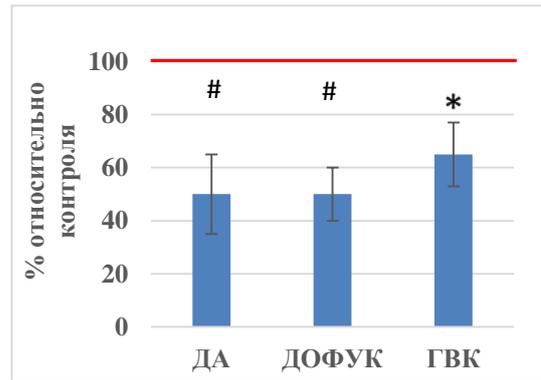
Таким образом, *интраназальное введение MnCl $_2$ приводит к развитию воспалительной реакции в ЦНС, но ее проявления специфичны для каждой из анализируемых областей. Выявленная специфичность может объясняться тем, что для каждой из этих областей характерно присутствие нейронов различной ергичности и различный баланс астроцитов/микроглиоцитов, которые и инициируют развитие воспаления в ЦНР.*

Далее, для выявления признаков нейродегенерации мы определили содержание дофамина и его метаболитов в гиппокампе и стриатуме крыс, хронически получавших введения MnCl $_2$. Данные представлены на рис. 3.4.33.

А.



Б.



В.

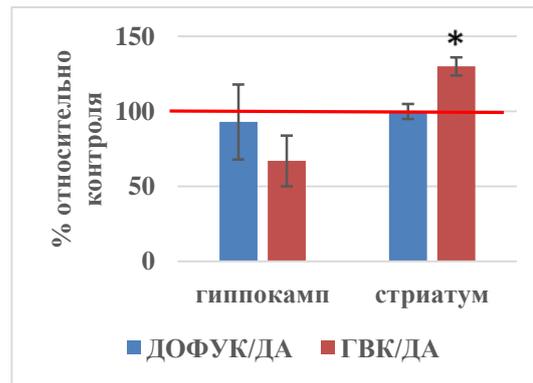


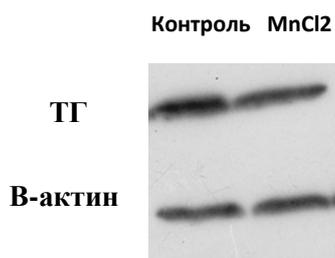
Рисунок 3.4.33 – Содержание ДА, ДОФУК, ГВК в гомогенате клеток гиппокампа (А) и стриатума (Б); отношение ДОФУК/ДА и ГВК/ДА в гиппокампе и стриатуме (В) крыс через 90 дней интраназального введения $MnCl_2$; в каждой точке $n=10$. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, красной линией обозначен уровень контрольных значений. Критерий Стьюдента для независимых выборок, * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем, # - $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

Оказалось, что интраназальное введение $MnCl_2$ приводит к значимому увеличению содержания дофамина (в 2,5 раза по отношению к контролю) и его метаболитов (содержание ДОФУК увеличивается в 2,5 раза, ГВК – в 1,7 раз) в клетках гиппокампа при неизменном по отношению к контролю соотношении метаболит/нейромедиатор. Это свидетельствует об интенсификации синтеза дофамина, например, за счет снижения активности дофамин-бета-гидроксилазы нейронов голубого пятна, имеющих свои окончания в СА3 поле гиппокампа. Данная гипотеза находит подтверждение в ряде работ, показывающих нарушение пространственной памяти у животных, принудительно получающих соли марганца, а также у пациентов с марганцевой энцефалопатией [331–334]. Дополнительно, в анализируемых нами образцах мы также видим значимое снижение содержания

норадреналина, с $(4,4 \pm 0,2)$ нг/мг белка в контрольной группе, до $(3,8 \pm 0,2)$ нг/мг белка в группе крыс, получающих $MnCl_2$, $p=0,045$.

В клетках стриатума, напротив, детектируется выраженное снижение содержания дофамина (в 2 раза по отношению к контролю) и его метаболитов (содержание ДОФУК падает в 2 раза, ГВК – на 37%), при этом возрастает скорость катаболизма внеклеточного дофамина. Эти данные свидетельствуют о снижении синтеза дофамина, например, вследствие гибели дофаминергических нейронов, сопряженной с усилением его высвобождения в синаптическую щель уцелевшими нервными клетками. Действительно, уже давно установлено, что при воздействии на организм соединений марганца дофаминергическая система наиболее уязвима [335, 336]. Поэтому неудивительно, что выбранная нами схема и доза введения хлорида марганца в стриатуме экспериментальных животных приводила к снижению содержания дофамина и его метаболитов, при неизменном соотношении ДОФУК/дофамин ($p=0.752$). Для подтверждения гипотезы о гибели дофаминергических нейронов черной субстанции мы проанализировали продукцию ТГ. Данные представлены на рис. 3.4.34.

А.



Б.

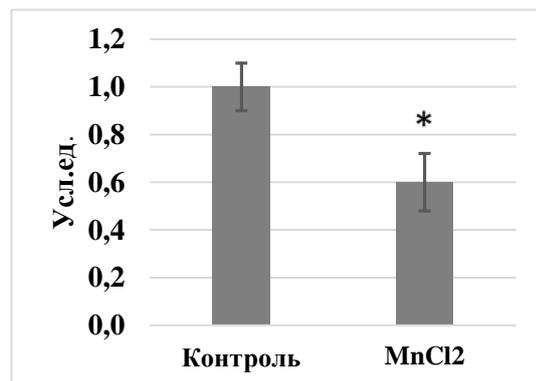


Рисунок 3.4.34 – Содержание тирозингидроксилазы (ТГ) в стриатуме крыс, получавших интраназально $MnCl_2$. А. Репрезентативный иммуноблотт. Б. Результаты денситометрирования иммуноблоттов, проявленных антителами к ТГ, $n=5$. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, критерий Стьюдента для независимых выборок, * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Как мы и предполагали, продукция ТГ значительно снизилась (в среднем на 40%) (рис. 3.4.34). Этот факт является дополнительным подтверждением гибели дофаминергических нейронов черной субстанции, имеющих свои окончания в стриатуме.

Считается, что при БП, напоминающей по симптоматике марганцевую энцефалопатию, моторные нарушения проявляются при потере 70% дофаминергических нейронов черной субстанции (для обзора [337]). *Мы же в тесте «Следы» и в тесте «Открытое поле» у экспериментальных животных видим нарушения походки и общее снижение двигательной активности, но при этом содержание дофамина в стриатуме не снижается до критической отметки. Следовательно, должны существовать дополнительные механизмы, интенсифицирующие клиническую манифестацию заболевания.* Вероятнее всего, выявленное нами накопление марганца в нейронах экстрапирамидной системы приводит к дизрегуляции не только дофаминергической системы, но и нейромедиаторных систем другой эргичности, и эти изменения затрагивают внутренние ассоциативные связи и пути, связывающие различные структуры мозга. Действительно, имеются как клинические, так и экспериментальные свидетельства влияния повреждения нейронов гиппокампа на активность дофаминергических нейронов среднего мозга [321]. Таким образом, более ранняя клиническая манифестация марганцевой энцефалопатии (по сравнению с болезнью Паркинсона) может быть объяснена большим количеством структур мозга, вовлеченных в патогенез заболевания.

Поскольку одной из причин гибели дофаминергических нейронов могла быть гиперактивация кальпаинов, мы проанализировали уровень мРНК (рис. 3.4.35), белка (рис. 3.4.36) и активность (рис. 3.4.37) μ - и m -кальпаина в гиппокампе и стриатуме крыс, получавших интраназально хлорид марганца в течение 90 дней.

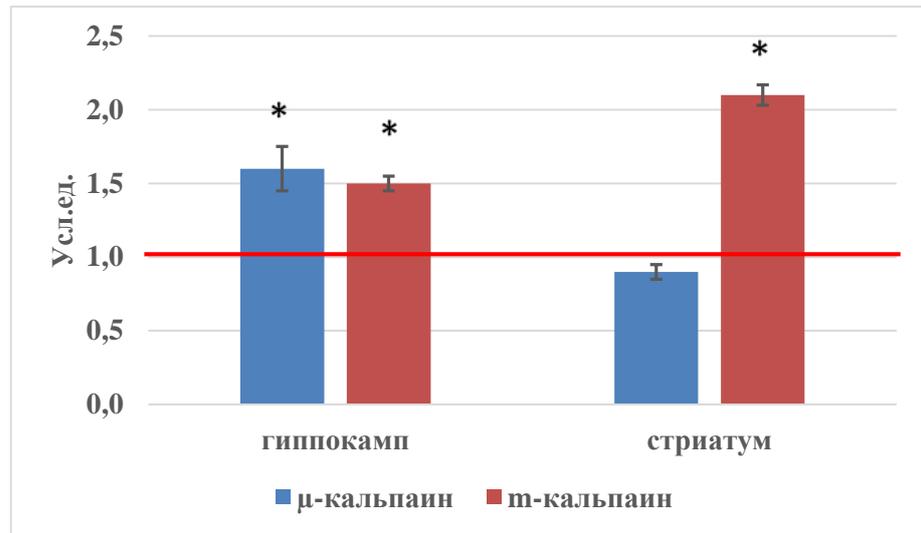
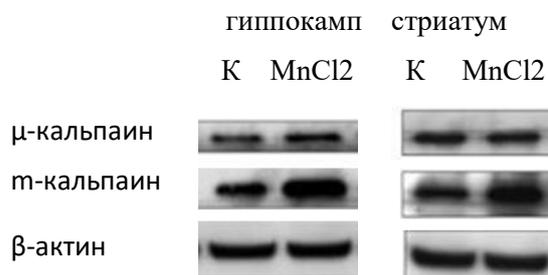


Рисунок 3.4.35 – Уровень мРНК μ - и m-кальпаина в гиппокампе и стриатуме крыс, получавших интраназально $MnCl_2$; в каждой точке $n=7$. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, красной линией обозначен уровень контрольных значений. Критерий Стьюдента для независимых выборок, * - $p<0,01$ по сравнению с контролем.

А.



Б.

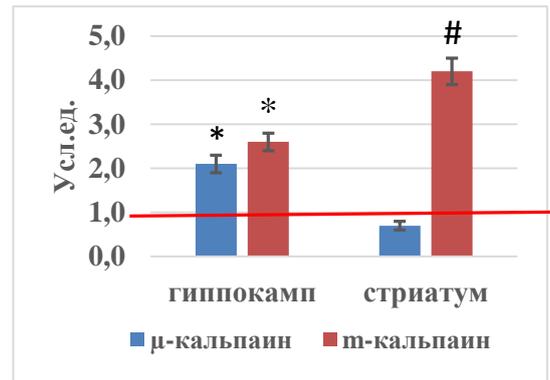


Рисунок 3.4.36 – Содержание μ - и m-кальпаина в гиппокампе и стриатуме крыс, получавших интраназально $MnCl_2$. А. Репрезентативный иммуноблотт, где К - контроль.

Б. Результаты денситометрирования иммуноблоттов, проявленных антителами к μ - и m-кальпаину, $n=5$. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, красной линией обозначен уровень контрольных значений. Критерий Стьюдента для независимых выборок, * - $p<0,05$ по сравнению с контролем, # - $p<0,01$ по сравнению с контролем.

Как видно из данных, приведенных на рис. 3.4.35, в клетках гиппокампа крыс, получавших $MnCl_2$ интраназально в течение 90 дней, наблюдается значимое увеличение содержания мРНК μ - и m-кальпаина, причем продукция мРНК обеих протеаз увеличивается в среднем на 50% относительно показателей контрольной группы. В клетках стриатума выявляются другие

изменения: продукция мРНК μ -кальпаина в среднем по группе не изменяется, а у трех животных из семи – снижается на (15-25) % по отношению к контролю, при этом содержание мРНК m -кальпаина увеличивается у всех экспериментальных животных более чем в два раза. Выявленные изменения в уровнях продукции обеих протеаз находились в полном соответствии с содержанием соответствующих мРНК (рис. 3.4.35). В клетках гиппокампа экспериментальных животных мы наблюдали увеличение продукции кальпаинов в 2,1 и 2,6 раз для μ - и m -кальпаина соответственно. В стриатуме содержание μ -кальпаина значимо не отличалось от контрольной группы, а m -кальпаина – увеличилось более, чем в 4 раза. Следовательно, увеличение содержания обеих протеаз можно объяснить интенсификацией синтеза соответствующих мРНК и, в случае m -кальпаина в клетках стриатума, за счет повышения эффективности трансляции.

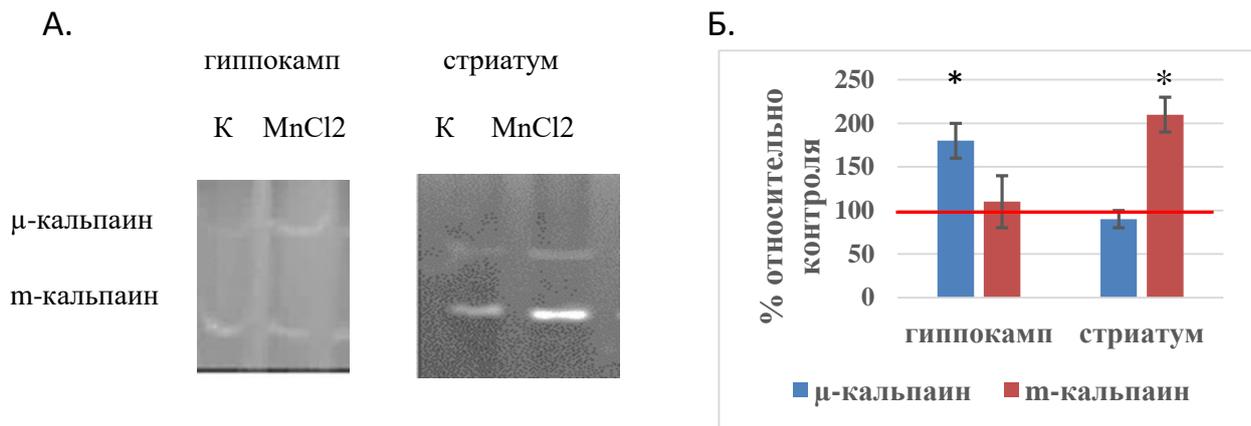


Рисунок 3.4.37 – Активность μ - и m -кальпаина в гиппокампе и стриатуме крыс, получавших интраназально MnCl₂. А. Репрезентативные зимограммы. Б. Результаты измерения площадей обесцвеченных зон, нормированные на контроль, $n=5$. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, красной линией обозначен уровень контрольных значений. Критерий Стьюдента для независимых выборок, * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

В гиппокампе экспериментальных животных активность μ -кальпаина увеличилась в 1,7 раз по сравнению с контролем, а активность m -кальпаина, несмотря на повышение его продукции, была сопоставима с показателем контрольной группы. В клетках стриатума, как и следовало ожидать, увеличилась только активность m -кальпаина.

Таким образом, в клетках стриатума экспериментальных животных нейродегенеративный процесс сопровождался увеличением продукции мРНК,

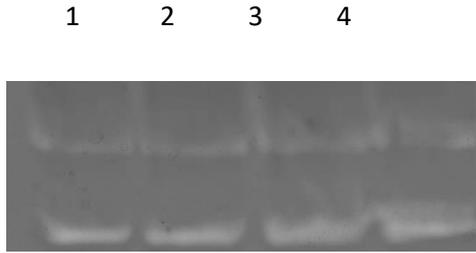
белка и активности *m*-кальпаина; в клетках гиппокампа возросла продукция мРНК и белка обеих протеаз, а увеличение активности наблюдалось только у *μ*-кальпаина. Мы полагаем, что благодаря гиперактивации *μ*-кальпаина дегенеративный процесс в гиппокампе не развивался, или его интенсивность была значимо ниже. Наши данные согласуются с двумя имеющимися в этой области исследованиями. Так, в исследовании Quintanar et al. (2012) показано, что интрастриальное введения крысам $MnCl_2$ в диапазоне концентраций 50-250 нмоль вызывает поражение нейронов стриатума и бледного шара, приводит к активации астроцитов в этих областях ЦНР. Этот процесс сопровождается гиперактивацией каспазы-3 и кальпаинов (*m* и *μ*-кальпаин авторы не разделяют). Применение специфического ингибитора кальпаинов MDL-28170 позволило снизить объем поражения ткани, что доказывает вовлечение кальпаинов в интенсификацию нейродеструкции в этой модели. Однако интрастриальное введение препаратов само по себе может вызвать нейровоспаление, что, в свою очередь, приведет к активации кальпаинов. Эту сторону вопроса авторы не обсуждают. Наши коллеги предполагают возможность непосредственной активации кальпаинов ионами марганца, однако поставленные ими эксперименты на гомогенатах клеток ЦНС не позволяют исключить эффекта «опосредованной» активации через инициацию нейровоспаления [338]. На срезах головного мозга крысы, которые инкубировались в среде, содержащей от 0 до 400 мкМ $MnCl_2$, показано многократное увеличение уровня лактатдегидрогеназы в инкубационной среде и активности внутриклеточных кальпаинов, причем данный эффект подавлялся ингибитором кальпаина II. Ингибитор также на 30% снижал долю клеток, имеющих признаки гибели путем апоптоза, и подавлял агрегатообразование альфа-синуклеина [339]. Другие механизмы вовлечения кальпаинов в патогенез марганцевой энцефалопатии в литературе не обсуждаются. Нам же удалось показать, что в стриатуме увеличивается экспрессия мРНК *m*-кальпаина и уровень соответствующего белка, а также его активность. В гиппокампе увеличение экспрессии, продукции характерно

для обеих изоформ, а активности – только для μ -кальпаина. Вероятно, имеет место следующая цепь событий. Марганец, аккумулированный клетками гиппокампа, непосредственно активирует μ -кальпаин, т. е. повышение активности этой протеазы связано с увеличением ее содержания и за счет дополнительной прямой активации самим марганцем. Прямой активации m -кальпаина марганцем не происходит. Быстрая активация μ -кальпаина приводит к деградации $\text{PHLPP1}\beta$ и активации Akt и ERK сигнальных путей, приводящих к «выживанию» клетки [20]. Однако, как было сказано выше, накопление марганца астроцитами вызывает их активацию, и они начинают выделять ROS, NO, ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 [340]. Высвободившиеся медиаторы действуют не только на соседние нейроны, но и на микроглию, и на астроциты, активируя их повторно [20], запускается лавинообразный патологический процесс. Как следствие, активируется m -кальпаин (в стриатуме), он расщепляет STEP, приводя к активации p38, и, тем самым, нейродегенеративный процесс интенсифицируется [20]. Мы видим повышение активности m -кальпаина только в стриатуме, поскольку плотность глиальных клеток там выше, чем в гиппокампе. Таким образом, нам удалось показать, что в ответ на интраназальное введение хлорида марганца происходит его преимущественное накопление в стриатуме, что вызывает увеличение продукции и активности m -кальпаина; в гиппокампе, где накопление марганца значительно менее выражено, наблюдается повышение активности только μ -кальпаина. На основании этих данных мы полагаем, что при разработке схем протективной терапии, направленной на подавление активности кальпаинов следует обратить особое внимание на ингибиторы, обладающие преимущественным действием на m -кальпаин.

3.5. Последствия подавления активности кальпаинов при интраназальном введении $MnCl_2$ крысам

Существует около 30 различных ингибиторов кальпаина, среди которых выделяют ингибиторы пептидной и непептидной природы (производные азолона, карбоксамиды, дигидроксихалконы, меркаптоакрилаты) [341]. Наиболее привлекательными для использования в терапевтических целях являются ингибиторы-пептиды, аминокислотная последовательность которых соответствует ингибиторным доменам кальпастина [342]. Константы ингибирования таких соединений для μ - и m -кальпаина были вычислены в экспериментах в системе *in vitro* и для некоторых типов клеток [342, 343], однако последствия введения таких соединений на лабораторных животных практически не изучалось. Как правило, в системе *in vivo* тестируются ингибитор кальпаина I, ингибитор кальпаина II, E64, калпептин, которые имеют близкие константы ингибирования для μ - и m -кальпаина (для примера [270, 344]). Судя по данным, представленным в работе [343], пептид длиной в 27 аминокислотных остатков, соответствующий 184-210 аминокислоте в составе кальпастина человека, преимущественно подавляет активность m -кальпаина и практически не ингибирует μ -кальпаин. Если основываться на этих данных, то именно данный ингибитор должен иметь протективное действие при марганцевой энцефалопатии. Мы проверили это предположение в гомогенате клеток стриатума и в системе *in vivo*. Для этого к гомогенату клеток ЦНС добавляли выбранный нами ингибитор - полипептид, соответствующий 184-210 аминокислоте в составе кальпастина человека (далее Cast (184-210)), - в дозе 5, 10 и 30 мкг/мл гомогената, в контрольный образец добавляли растворитель – дистиллированную воду; образцы инкубировали при 37⁰С в течение 60 минут в присутствии 1мМ $CaCl_2$, после чего анализировали остаточную активность μ - и m -кальпаина методом зимографии в геле, данные представлены на рис. 3.5.1.

А.



Б.

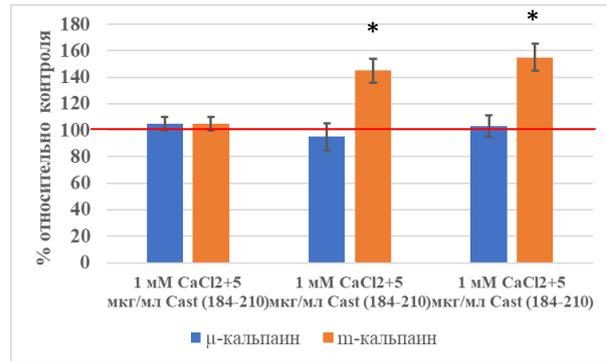


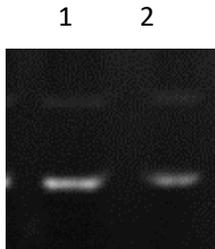
Рисунок 3.5.1 – Остаточная активность μ - и η -кальпаина в гомогенате клеток ЦНС крыс после инкубации в присутствии Cast (184-210) в дозе 5, 10 и 30 мкг/мл гомогената в течение 60 мин. А. Репрезентативные зимограммы, где 1. Контроль (инкубация в присутствии 1мМ CaCl₂), 2. 1 мМ CaCl₂+5 мкг/мл Cast (184-210); 3. 1 мМ CaCl₂+10 мкг/мл Cast (184-210); 4. 1 мМ CaCl₂+30 мкг/мл Cast (184-210). Верхняя зона соответствует μ -кальпаину, нижняя – η -кальпаину. Б. Результаты измерения площадей обесцвеченных зон, нормированные на контроль (n=3). Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, красной линией обозначен уровень контрольных значений. Дисперсионный анализ с последующим применением post-hoc критерия Тьюки, *- $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Как видно из данных, приведенных на рис. 3.5.1, при инкубации гомогената клеток ЦНС в присутствии выбранного ингибитора кальпаина – пептида Cast (184-210), - остаточная активность μ -кальпаина сопоставима с контрольными значениями, а η -кальпаина значимо выше показателей контрольного образца. Следовательно, выбранный нами ингибитор, действительно, преимущественно ингибирует η -кальпаин (пояснения: во время инкубации в присутствии 1мМ CaCl₂ кальпаины активируются и сами подвергаются протеолитическому расщеплению, поэтому при проведении казеиновой зимографии в геле мы детектируем уже остаточную активность – чем выше остаточная активность, тем ниже была активность протеаз во время инкубации).

Для проведения экспериментов в системе *in vivo* методом блочной рандомизации 10 самцов крыс Вистар были разделены на две группы: первая группа получала интраназально Cast (184-210) в дозе 10 мкг/10мкл воды на животное, ежедневно в течение 5 дней; вторая группа – воду по такой же

схеме. Через 5 дней животных декапитировали, извлекали мозг и анализировали активность кальпаинов в гомогенате клеток ЦНР. Данные представлены на рис. 3.5.2.

А.



Б.

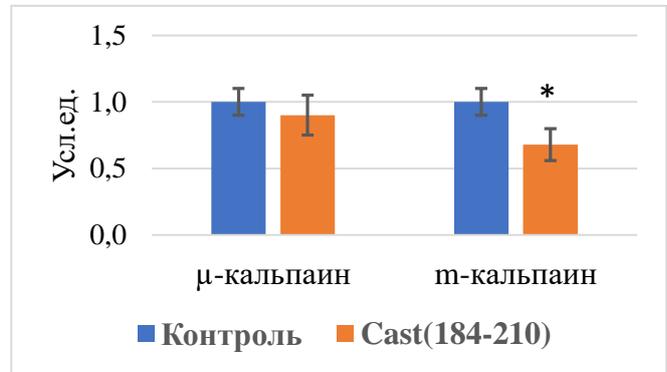


Рисунок 3.5.2 – Активность μ - и m-кальпаина в гомогенате клеток ЦНС крыс, получавших интраназально Cast (184-210) в дозе 10 мкг/животное в день, 5 дней.

А. Репрезентативные зимограммы, где 1. Активность кальпаинов в гомогенате клеток ЦНС контрольных животных; 2. Активность кальпаинов в гомогенате клеток ЦНС крыс, получавших курсовое введение Cast (184-210); верхняя зона соответствует активности μ -кальпаина, нижняя – m-кальпаина. Б. Результаты измерения площадей обесцвеченных зон, выраженное в условных единицах, n=5. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, критерий Стьюдента для независимых выборок, *- p < 0,05 по сравнению с контролем.

Оказалось, что применение ингибитора кальпаина Cast (184-210) в дозе 10 мкг/животное в день, 5 дней, действительно, вызывает снижение активности m-кальпаина и не влияет на активность μ -кальпаина (рис. 3.5.2).

По результатам описанных выше экспериментов для выявления последствий подавления активности кальпаинов при интраназальном введении $MnCl_2$ крысам нами был взят Cast (184-210). Эксперимент строили по следующему плану: методом блочной рандомизации 30 крыс распределили три равные группы, первой группе ежедневно на протяжении 30 дней интраназально вводили 1мг $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ в объеме 20 мкл; крысы второй группы дополнительно интраназально получали Cast (184-210), 10 мкг/животное; животным контрольной группы вводили физиологический раствор по аналогичной схеме. На протяжении всего эксперимента оценивали массу тела животных. Данные представлены на рис. 3.5.3.

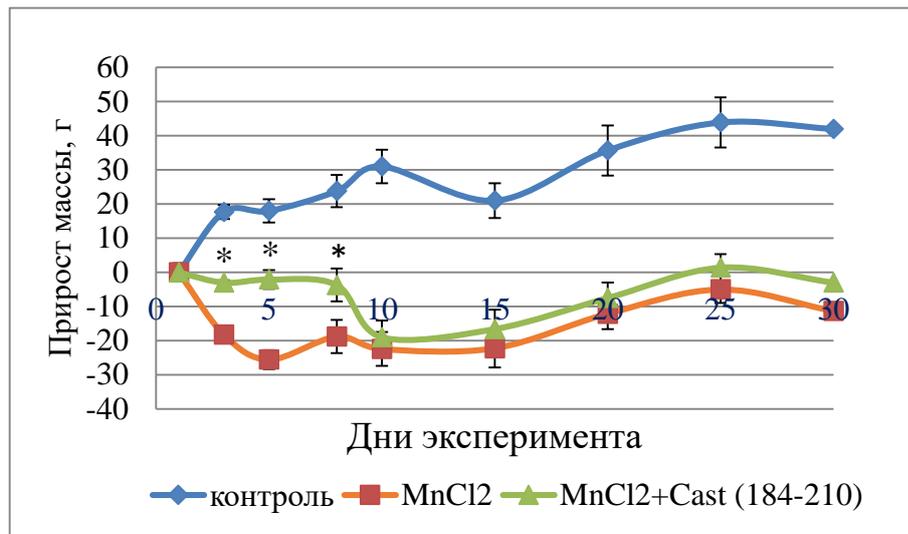


Рисунок 3.5.3 – Динамика изменения массы тела (относительно нулевого дня) животных при хроническом интраназальном введении $MnCl_2$. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего ($n_1 = n_2 = n_3 = 10$); точки для наглядности соединены линиями; дисперсионный анализ для независимых выборок с последующим применением post hoc критерия Тьюки; * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой в соответствующий день.

Уже с первого дня эксперимента масса животных, получающих интраназально $MnCl_2$, была значимо ниже, чем у животных контрольной группы; при этом в первые восемь дней эксперимента масса животных, которым совместно с $MnCl_2$ вводили ингибитор кальпаина Cast (184-210), не отличалась от контроля. Начиная с 10-го дня эксперимента, масса животных экспериментальных групп была значимо ниже, чем у крыс контрольной группы (рис. 3.6.3). Затем мы анализировали влияние введения ингибитора кальпаина на походку животных в тесте «Следы». Данные представлены на рис. 3.5.4.

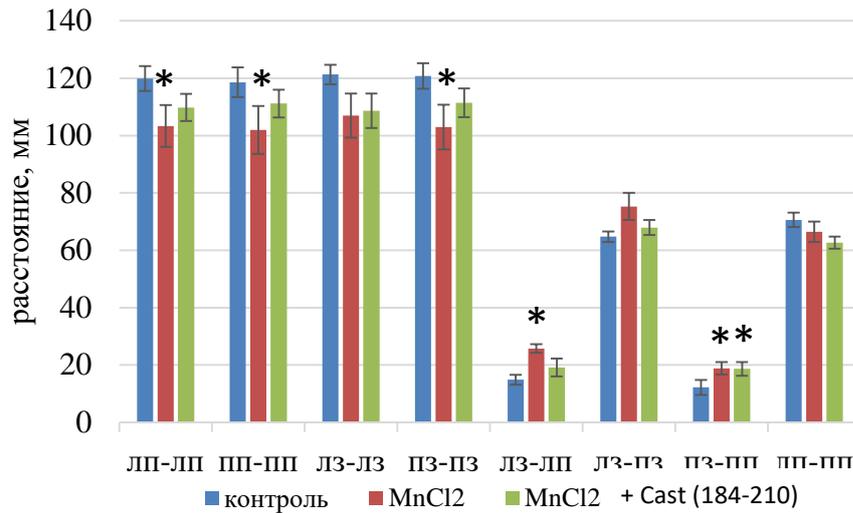
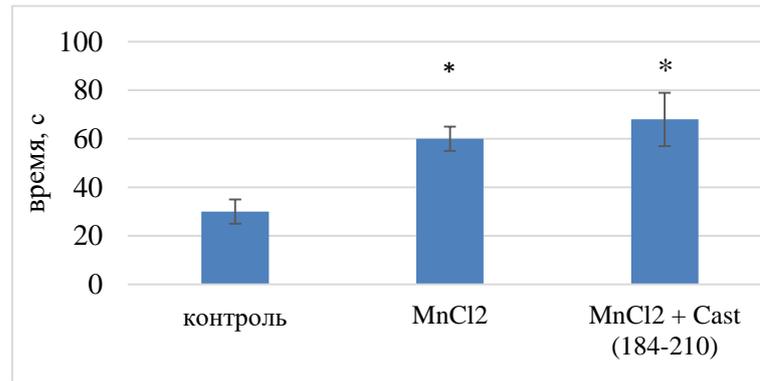


Рисунок 3.5.4 – Расстояния между соответствующими лапами в тесте «Следы» на 20 день эксперимента (А): лп-лп – расстояние между левой передней и левой передней лапой, пп-пп – расстояние между правой передней и правой передней лапой, лз-лз – расстояние между левой задней и левой задней лапой; пз-пз – расстояние между правой задней и правой задней лапой; лз-лп – расстояние между левой задней и левой передней лапой, лз-пз – расстояние между левой задней и правой задней лапой, пз-пп – расстояние между правой задней и правой передней лапой, лп-пп – расстояние между левой передней и правой передней лапой. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего ($n_1 = n_2 = n_3 = 10$); дисперсионный анализ с последующим применением post hoc критерия Тьюки; * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

Как видно из данных, представленных на рис. 3.5.4., на 20-й день эксперимента у крыс, получающих $MnCl_2$, наблюдались выраженные нарушения походки: уменьшалась длина шага, увеличивалось расстояние между задними лапами и между передними лапами. Применение ингибитора кальпаина на фоне введения $MnCl_2$ привело к нормализации длины шага (расстояние между одной и той же лапой, например, между правой передней и правой передней, не отличалось от показателя контрольной группы); сохранялось лишь одно изменение – было увеличено расстояние между передней и задней лапой справа. Для анализа двигательной активности животных был применен тест «Открытое поле», данные приведены на рис. 3.5.5.

А.



Б.

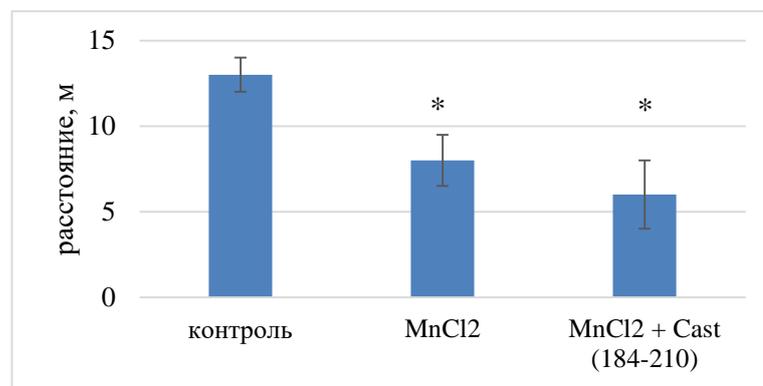
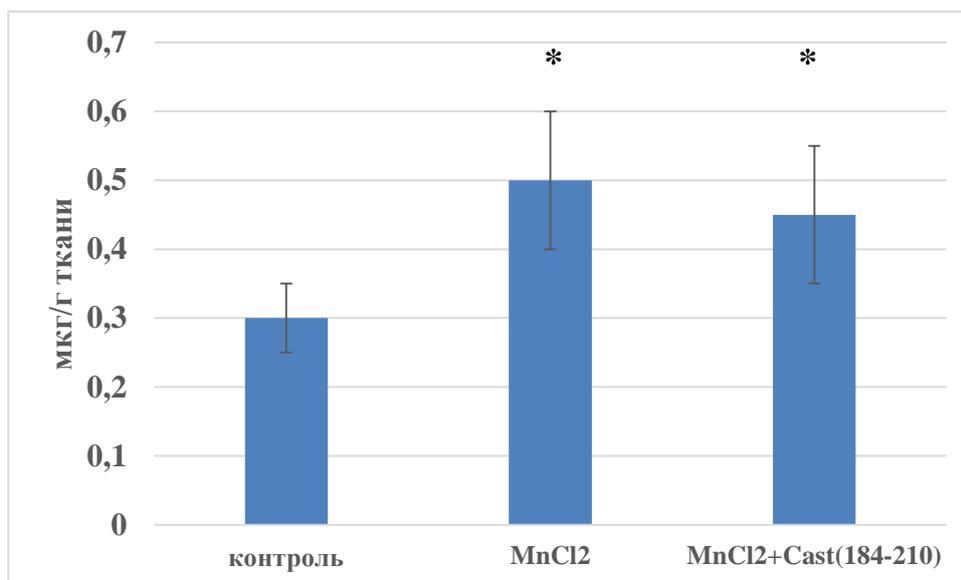


Рисунок 3.5.5 – Двигательная активность крыс, оцененная в тесте «Открытое поле» на 30-й день эксперимента: время нахождения в неподвижном состоянии (А) и пройденное расстояние (Б). Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего ($n_1=n_2=n_3=10$); дисперсионный анализ с последующим применением *post hoc* критерия Тьюки; * $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

На 30 день введения препаратов у животных экспериментальных групп возрастает время нахождения в неподвижном состоянии и уменьшается пройденное ими расстояние по сравнению с контролем (рис. 3.5.5), следовательно, введение ингибитора кальпаина не приводит к восстановлению двигательной активности у крыс, принудительно получающих $MnCl_2$. Таким образом, судя по данным, представленным на рис. 3.5.3 – 3.5.5, введение ингибитора кальпаина Cast (184-210) приводит к снижению скорости падения массы тела в первые 10 дней эксперимента, частично нормализует походку животных, но не восстанавливает двигательную активность крыс, анализируемую нами в тесте «Открытое поле», поэтому весьма вероятно, что применение данного ингибитора не

только не способствует восстановлению эмоциональных нарушений, но и может приводить к усилению их выраженности. Наше предположение согласуется с данными еще одного исследования [345]. В описываемом эксперименте авторы ежедневно с 7-го по 14-й день жизни внутривентрикулярно вводили крысам кальпептин (ингибитор кальпаина, в равной степени подавляет активность μ - и m -кальпаина, проходит через ГЭБ) в дозе 2мг/кг и анализировали их поведение в тесте «Открытое поле» на 60-м дне жизни. Оказалось, что экспериментальные животные проходили меньшую дистанцию и в 2,5 раза больше времени проводили в центре поля, что авторы связывают с развитием тревожно-подобного поведения. Таким образом, при использовании ингибиторов кальпаина необходимо обратить внимание на такое вероятное побочное действие, как развитие тревожности. Тем не менее, судя по частичному восстановлению походки, данный ингибитор оказывает нейропротективное действие, что может быть реализовано по одному из двух механизмов. Во-первых, ингибитор препятствует накоплению марганца в клетках ЦНС или же подавляет развитие нейродегенеративного процесса, запускающегося при накоплении марганца в клетках. Для проверки этого предположения было определено содержание марганца в гиппокампе и стриатуме экспериментальных животных в сравнении с контрольными крысами и крысами, получающими только инъекции $MnCl_2$. Данные представлены на рис. 3.5.6.

А.



Б.

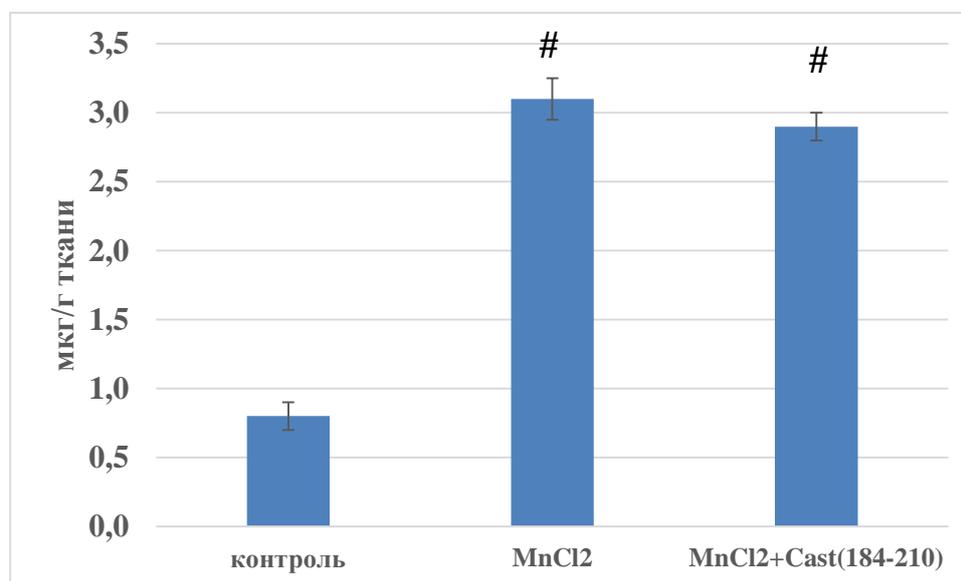


Рисунок 3.5.6 – Содержание марганца в гиппокампе (А) и в стриатуме (Б) крыс после хронического интраназального введения $MnCl_2$ и при подавлении активности кальпаинов с помощью Cast (184-210), ($n_1=n_2=n_3=10$); дисперсионный анализ с последующим применением post hoc критерия Тьюки; * $p < 0,05$ по сравнению с контролем, # $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

Как видно из данных, приведенных на рис. 3.5.6, применение ингибитора кальпаина Cast (184-210) в выбранной дозе и по указанной выше схеме не приводит к снижению содержания марганца в анализируемых структурах мозга. Следовательно, наблюдаемые нами эффекты могут объясняться снижением интенсивности нейродегенеративного процесса.

Таким образом, данный ингибитор нельзя использовать в качестве профилактического средства.

Для выявления звеньев патогенеза, на которые повлияло введение ингибитора кальпаина, как и в эксперименте, описанном в п. 3.5, в клетках гиппокампа и стриатума нами было определено содержание мРНК основных провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β и ФНО α), маркера активации микроглии IBA-1, а также NF κ B и I κ B. Основанием для выдвижения гипотезы о том, что введение ингибитора кальпаина может подавить или снизить развитие воспалительного процесса в ЦНС, служат следующие данные. На модели черепно-мозговой травмы (ЧМТ) у мышей было показано, что внутрибрюшинное введение ингибитора кальпаина MDL28170 в дозе 20 мг/кг в первые часы после нанесения травмы приводит к снижению продукции NF κ B и увеличению содержания I κ B в мозге, при этом продукция ФНО α снижается по сравнению с группой ЧМТ без введения ингибитора на 30%, выявленные изменения сохраняются в течение первых суток после нанесения травмы [346]. Таким образом, есть все основания полагать, что при интоксикации MnCl₂ действие ингибитора кальпаина будет сходным. Полученные нами данные представлены на рис. 3.5.7 и рис. 3.5.8.

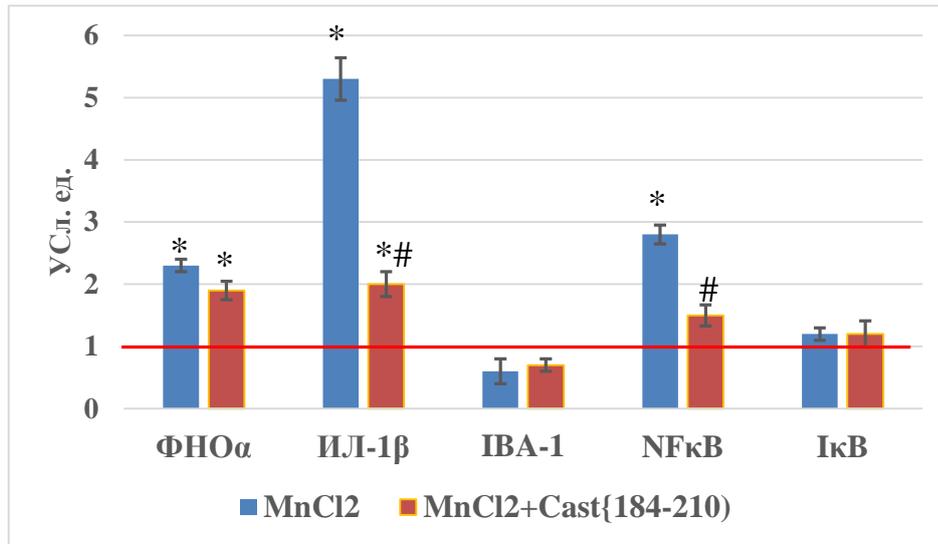


Рисунок 3.5.7 – Уровень мРНК ИЛ-1β, ФНОα, IBA-1, NFκB и IκB в гиппокампе крыс на 30-й день интраназального введения MnCl₂ и при подавлении активности кальпаинов с помощью Cast (184-210). Данные представлены как среднее ± ошибка среднего (n1=n2=n3=10), красной линией обозначен уровень контрольных значений. Дисперсионный анализ с последующим применением post hoc критерия Тьюки; * p < 0,05 по сравнению с контролем, # - p < 0,05 по сравнению с группой MnCl₂.

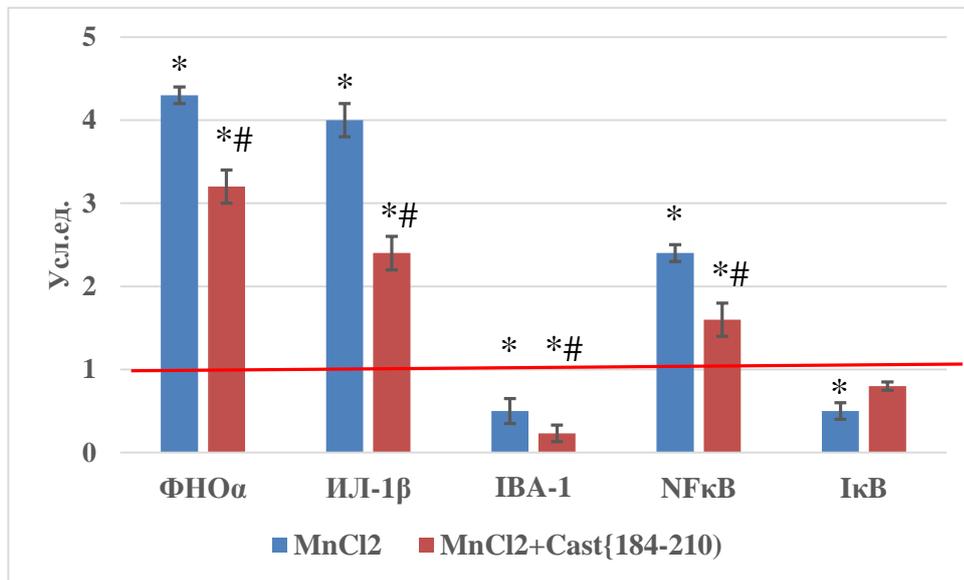


Рисунок 3.5.8 – Уровень мРНК ИЛ-1β, ФНОα, IBA-1, NFκB и IκB в стриатуме крыс на 30-й день интраназального введения MnCl₂ и при подавлении активности кальпаинов с помощью Cast (184-210). Данные представлены как среднее ± ошибка среднего (n1=n2=n3=10), красной линией обозначен уровень контрольных значений. Дисперсионный анализ с последующим применением post hoc критерия Тьюки; * p < 0,05 по сравнению с контролем, # - p < 0,05 по сравнению с группой MnCl₂.

При сопоставлении данных, приведенных на рис. 3.5.7 и 3.4.31, оказалось, что на 30-й день эксперимента в гиппокампе наблюдается более

выраженный подъем уровня мРНК ИЛ-1 β , чем на 90-й день ($p=0,0003$, дисперсионный анализ с последующим применением post hoc критерия Тьюки) – в 5,2 против 1,5 раз по сравнению с контролем, однако уровни мРНК ФНО- α были сопоставимы (на 30-й и на 90-й день введения наблюдалось увеличение в два раза по сравнению с контролем). Это свидетельствует в пользу выдвинутого нами ранее предположения о развитии в клетках гиппокампа адаптивных реакций. При этом сопоставление данных, приведенных на рис. 3.5.8 и 3.4.32, позволяет сделать заключение о том, что с развитием патологического процесса в клетках стриатума уровень продукции мРНК ИЛ-1 β усиливается (с 4-х кратного до 6-ти кратного превышения контрольных показателей на 30-й и 90-й день эксперимента соответственно, $p=0,039$, дисперсионный анализ с последующим применением post hoc критерия Тьюки), а содержание мРНК ФНО α , напротив, снижается с 4-х кратного превышения показателей контрольной группы на 30-й день, до нормы к 90-му дню ($p=0,0001$, дисперсионный анализ с последующим применением post hoc критерия Тьюки). Это свидетельствует в пользу выдвинутого нами ранее предположения о развитии в клетках гиппокампа и стриатума различных по механизмам, но, безусловно, адаптивных или компенсаторных реакций. Применение ингибитора кальпаина Cast (184-210) привело к значимому снижению продукции мРНК ИЛ-1 β по сравнению с показателями животных, не получающих ингибитор, в клетках гиппокампа (в 2,6 раза) и стриатума (в 1,6 раза), а также снижению содержания мРНК ФНО α в стриатуме (в 1,7 раза).

Содержание в гиппокампе мРНК транскрипционного фактора NF κ B (при неизменном содержании его ингибитора - I κ B) на 30-й день эксперимента в 3 раза превышало, а в случае подавления активности кальпаинов – не отличалось от показателя контрольной группы, при этом даже без применения ингибиторов кальпаина данный показатель снижался до нормы к 90-му дню, что может быть причиной выявленного нами снижения продукции мРНК ИЛ-1 β в этих клетках. В стриатуме на обоих сроках наблюдался сопоставимый

подъем уровня мРНК NFκB и снижение содержания мРНК IκB; применение ингибитора кальпаинов снижало выраженность данных изменений.

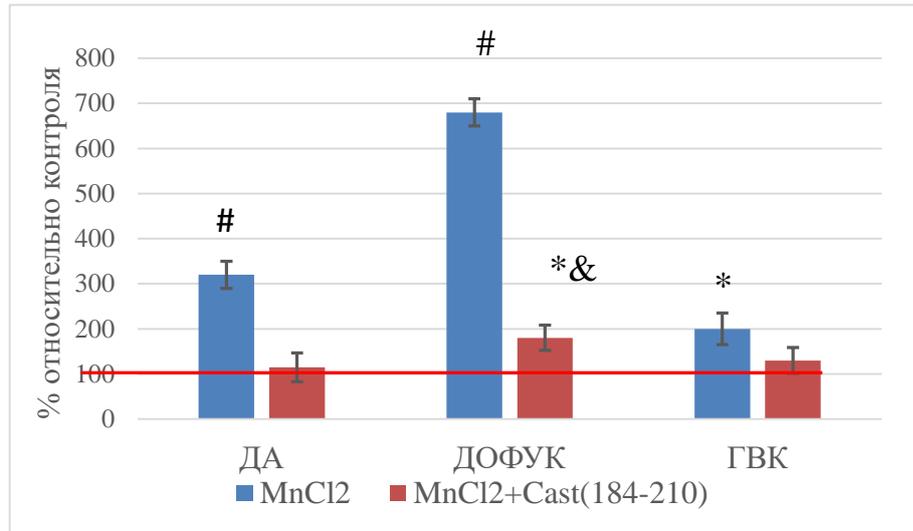
Любопытно, что в клетках гиппокампа на 30-й день введения $MnCl_2$ (вне зависимости от применения ингибитора кальпаина) мы не обнаружили изменений содержания мРНК IBA-1, а к 90-му дню данный показатель уже в 1,7 раза превышал значения, характерные для группы контроля ($p=0,0084$). В клетках стриатума на 30-й день наблюдалось значимое относительно контроля снижение уровня мРНК IBA (на 40%), а при введении ингибитора кальпаина - на 60% (изменения оказались значимыми по сравнению с контролем ($p=0.012$) и с группой $MnCl_2$ ($p=0,038$)). К 90-му дню, как это представлено на рис. 3.5.32, уровень мРНК IBA-1 уже в 2,7 раза превышал показатели контрольной группы. Вероятнее всего, на первых этапах развития патологического процесса в обеих анализируемых областях ЦНС провоспалительные агенты продуцируются клетками астроглии, а позже (в период с 30-го по 90-й день эксперимента) происходит активация микроглиальных клеток, плотность которых в стриатуме выше, что и объясняет большую выраженность (по анализируемым показателям) воспалительного процесса в этой области мозга.

В совокупности эти данные также свидетельствуют о развитии адаптивных/компенсаторных процессов в первый месяц введения токсина. Однако в условиях хронического токсического воздействия, вероятно, происходит истощение физиологических резервов и нарушение взаимодействия метаболических механизмов адаптации, что приводит к неконтролируемому развитию воспалительного процесса, преимущественно, в клетках стриатума. Применяемый нами ингибитор кальпаина снижал выраженность воспалительного процесса в гиппокампе и в стриатуме, что проявлялось в уменьшении содержания мРНК основных провоспалительных цитокинов и транскрипционного фактора NFκB, а также мРНК IBA-1 – маркера активированной микроглии. Подобный эффект другого ингибитора кальпаина – кальпептина – наблюдался на модели МФТП-индуцированной

дегенерации дофаминергических нейронов у мышей. Оказалось, что интраперитонеальное введение МФТП-мышам кальпептина в дозе 25 мкг/кг приводит к значимому снижению доли активированных клеток астро- и микроглии в шейном и поясничном отделе спинного мозга (другие отделы ЦНС не анализировались), что на организменном уровне сопровождается нормализацией походки [299]. В экспериментах на клеточных культурах было показано, что кальпептин предотвращает дегенерацию нейронов, культивируемых в среде, полученной от активированных интерфероном-гамма микроглиальных клеток [347]. Как уже было описано выше, *вероятнее всего, т-кальпаин секретируется из поврежденных нейронов, активированных астро- и микроглиальных клеток, и интенсифицирует патологический процесс, а μ-кальпаин, напротив, активирует в уцелевших нейронах процессы, направленные на стимуляцию «выживаемости».*

Далее, с целью выявления механизмов нейропротективного действия Cast (184-210) было проанализировано содержание дофамина и его метаболитов в гиппокампе и в стриатуме (рис. 3.5.9), а также скорость метаболизма дофамина (рис. 3.5.10).

А.



Б.

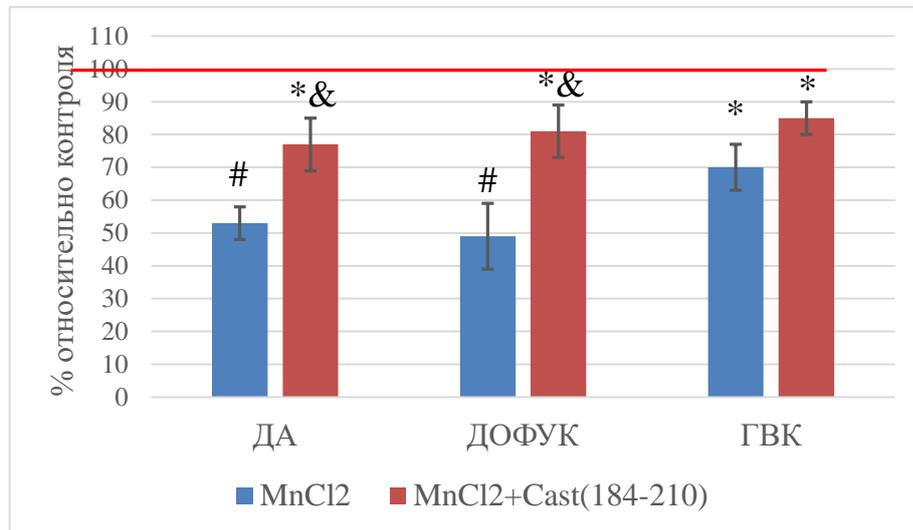
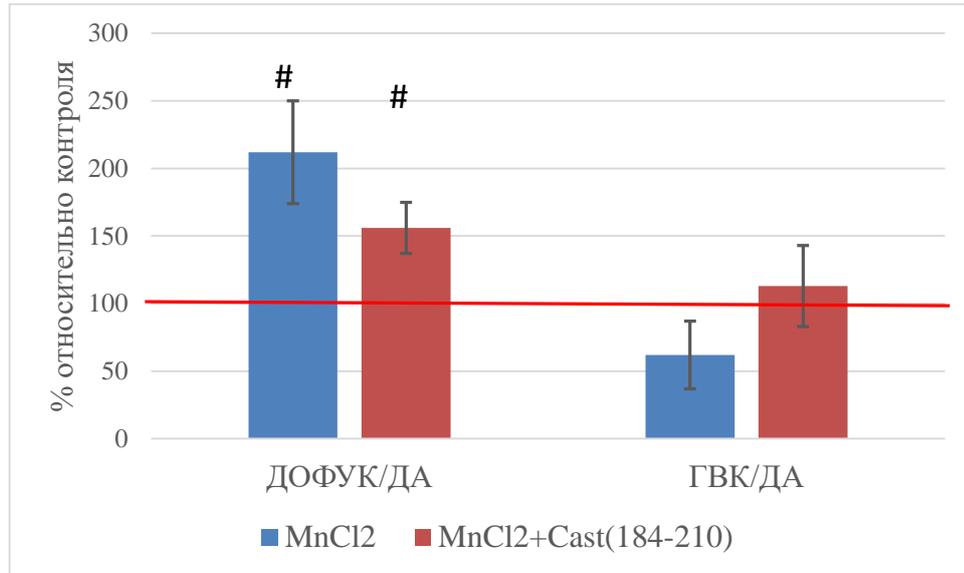


Рисунок 3.5.9 – Содержание ДА, ДОФУК, ГВК в гомогенате клеток гиппокампа (А) и стриатума (Б) крыс через 30 дней интраназального введения MnCl₂ и при подавлении активности кальпаинов ингибитором Cast (184-210); данные представлены как среднее ± ошибка среднего (n₁=n₂=n₃=10), красной линией обозначен уровень контрольных значений. Дисперсионный анализ с последующим применением post hoc критерия Тьюки, * - p < 0,05 по сравнению с контролем, # - p < 0,005 по сравнению с контролем, & - p < 0,05 по сравнению с группой MnCl₂.

А.



Б.

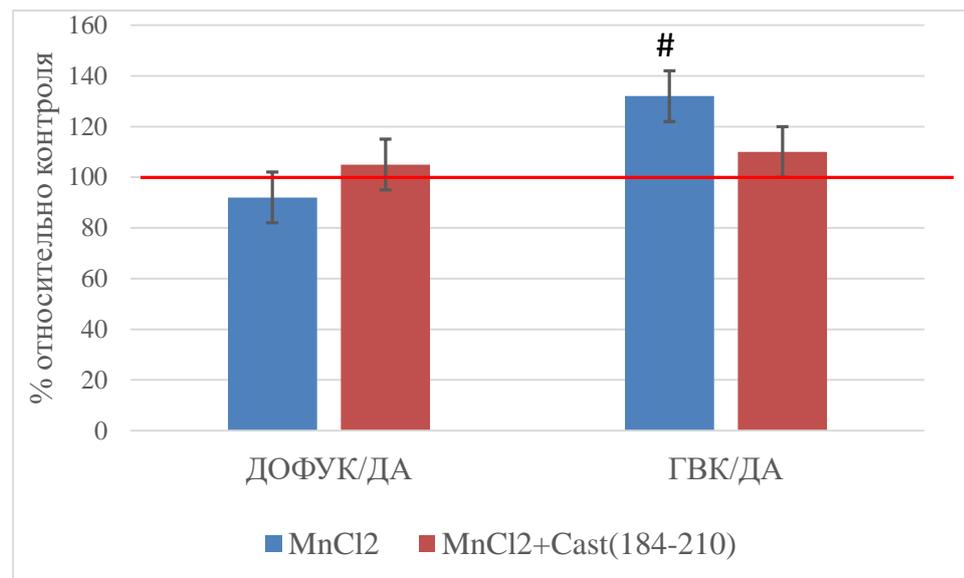


Рисунок 3.5.10 – Скорость метаболизма дофамина, оцененная по соотношению ДОФУК/ДА и ГВК/ДА в гомогенате клеток гиппокампа (А) и стриатума (Б) крыс через 30 дней интраназального введения MnCl₂ и при подавлении активности кальпаинов ингибитором Cast (184-210); данные представлены как среднее ± ошибка среднего (n1=n2=n3=10), красной линией обозначен уровень контрольных значений. Дисперсионный анализ с последующим применением post hoc критерия Тьюки, # - p < 0,01 по сравнению с контролем.

Сопоставление данных содержания ДА и его метаболитов на 30-й и 90-й день введения MnCl₂ (рис. 3.5.9 (А) и рис. 3.4.33 (А)) показало, что на 30-й день введения в клетках гиппокампа наблюдается более выраженный, по

сравнению с 90-м днем, подъем уровня дофамина ($p=0,038$) и его метаболита ДОФУК ($p=0,000$) - в 3,1 раза против 2,5 раза по отношению к контролю для дофамина и в 6,8 раза против 2,5 раза для ДОФУК; при этом содержание ГВК повышено в равной степени на 30-й и 90-й день ($p=0,754$) – в 1,7 и в 2,0 раза соответственно. Следовательно, в клетках гиппокампа на 30-й день происходят более выраженные изменения, в частности, идет интенсификация внутриклеточного катаболизма дофамина. Это свидетельствует об усилении адаптационных процессов: увеличение уровня дофамина в гиппокампе возможно обусловлено его избыточным синтезом клетками голубого пятна из-за нарушения функционирования β -дофамингидроксилазы. Результатом такого увеличения является развитие выраженных когнитивных и аффективных нарушений, в частности, нарушений памяти. Поэтому усиление внутриклеточного катаболизма дофамина с образованием ДОФУК, приводящее к снижению содержания дофамина, должно частично нормализовать нарушенные функции. Как видно из данных, приведенных на рис. 3.6.9 (А), применение ингибитора кальпаина приводит к снижению содержания дофамина до нормы и значимому снижению ДОФУК, вероятно, способствуя восстановлению когнитивных нарушений или снижению скорости их развития. К сходному заключению приходят авторы следующих исследований. На мышинной модели болезни Альцгеймера было показано, что введение животным ингибитора кальпаина Е64 вызывает восстановление рабочей памяти [348]. Введение мышам 3хТgAD (модель болезни Альцгеймера) ингибитора кальпаина А-705253 снижает скорость нарастания выраженности когнитивных нарушений, что сопровождается повышением экспрессии в клетках гиппокампа ABCA1 [349]. Принимая во внимание наши данные о том, что кальпаины могут высвобождаться из клетки через ABCA1 транспортеры, можно предположить, что одним из механизмов протективного действия ингибиторов кальпаина является повышение внеклеточной концентрации кальпаина (одной или нескольких изоформ).

В клетках стриатума были выявлены совершенно иные изменения. При сопоставлении данных, приведенных на рис. 3.5.9 (Б) и 3.4.33 (Б), оказалось, что на 30-й и на 90-й день введения $MnCl_2$ обнаруживается сопоставимое по выраженности снижение содержания дофамина ($p=0,987$) и его метаболитов ($p=0,897$ для ДОФУК и $p=0,452$ для ГВК). Следовательно, наиболее драматические изменения в клетках стриатума происходят в первый месяц введения $MnCl_2$. Позже процесс, вероятно, хронизируется и распространяется, но скорость его течения снижается. Применение ингибитора кальпаина Cast (184-210) приводит к значимому увеличению содержания дофамина и обоих его метаболитов. Однако при выбранной дозе и схеме введения препарата нам не удалось достигнуть показателей контрольной группы (рис. 3.5.9 (Б)). Обращает на себя внимание тот факт, что и на 30-й, и на 90-й день наблюдается сопоставимое по выраженности усиление внеклеточного катаболизма дофамина, а применение ингибитора кальпаина приводит к восстановлению этого параметра до уровня нормальных значений (рис. 3.6.10 (Б) и рис. 3.5.33 (В)). Это означает, что либо кальпаины вовлечены в регуляцию активности внеклеточных ферментов катаболизма дофамина (этот факт был нами предсказан ранее на основе анализа спектра возможных внеклеточных субстратов кальпаина), либо, что уже хорошо известно, подавление активности кальпаина привело к снижению выброса дофамина во внеклеточную среду, либо, что более вероятно, к модуляции обоих процессов сразу.

В клетках стриатума, как было описано выше, наблюдалось пропорциональное снижение содержания дофамина и его метаболитов. Эти данные свидетельствуют о гибели дофаминергических нейронов. Если принять эту гипотезу, то, судя по нашим данным, ингибитор кальпаина должен предотвращать гибель дофаминергических нейронов при интоксикации солями марганца. Для проверки этого предположения в гомогенате клеток стриатума был определен уровень продукции ТГ. Данные приведены на рис. 3.5.11.

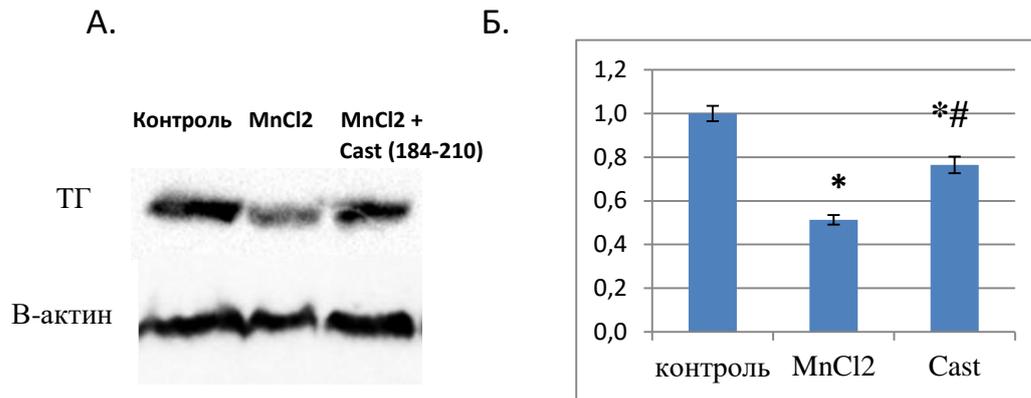


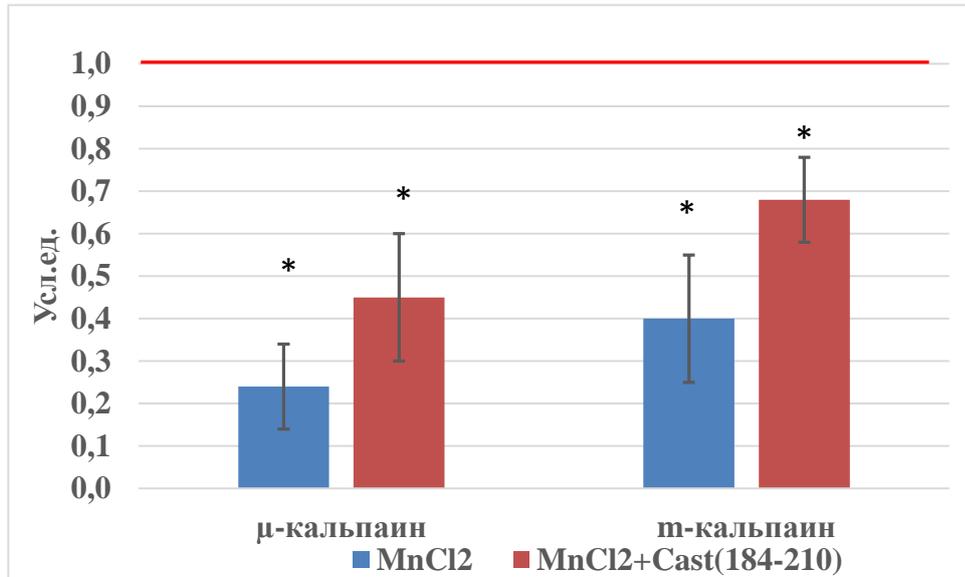
Рисунок 3.5.11 – Содержание тирозингидроксилазы (ТГ) в стриатуме крыс через 30 дней интраназального введения $MnCl_2$ и при подавлении активности кальпаинов ингибитором Cast (184-210). А. Репрезентативный иммуноблотт. Б. Результаты денситометрирования иммуноблоттов, проявленных антителами к тирозингидроксилазе, $n=5$. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, дисперсионный анализ с последующим применением post hoc критерия Тьюки, * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем, # - $p < 0,05$ по сравнению с группой $MnCl_2$.

К 30-му дню эксперимента содержание ТГ в стриатуме снижается в двое по сравнению с контролем (рис. 3.5.11). При этом, на 90-й день (рис. 3.4.34) мы наблюдаем сопоставимые изменения ($p=0,956$), что еще раз подтверждает предположение о высокой интенсивности течения дегенеративного процесса в стриатуме в первый месяц воздействия $MnCl_2$. *Применение ингибитора кальпаина способствует выживаемости дофаминергических нейронов, что отражается в значимом увеличении содержания ТГ по сравнению с группой $MnCl_2$.* Подобные свойства ингибиторов кальпаина ранее уже отмечались. Например, в исследовании [350] отмечается, что интрацеребральное введение ингибитора кальпаина MDL-28170 за сутки до индукции дегенерации дофаминергических нейронов с помощью введения МФТП приводит к увеличению количества ТГ-положительных нейронов в черной субстанции по сравнению с положительным контролем (погибает менее 18% нейронов против 56% у животных, получающих исключительно инъекции МФТП); при этом авторы показывают, что подавление активности кальпаинов не приводит к изменению скорости метаболизма МФТП. Однако в этом эксперименте авторы не наблюдают снижения уровня стриатарного дофамина, следовательно, обнаруженные ими изменения характеризуют лишь

доклиническую стадию заболевания. В другом исследовании на мышах с генетически детерминированным высоким уровнем продукции α -синуклеина также продемонстрировано протективное в отношении дофаминергических нейронов действие ингибитора кальпаина. Так, интраперитонеальное введение габадула в дозе 1 мг/животное приводило к значимому снижению активности кальпаинов, снижению количества телец Леви в коре и гиппокампе, значимому увеличению в гиппокампе числа NeuN-позитивных клеток [235], но механизмы действия ингибитора авторы практически не обсуждают.

Несмотря на обнаруженный нами выраженный нейропротективный эффект используемого ингибитора кальпаина Cast (184-210), в литературе нет данных о его способности подавлять активность/продукцию кальпаинов в условиях марганцевой интоксикации. Поэтому мы проанализировали содержание мРНК и белка кальпаинов у животных, получающих Cast (184-210) совместно с $MnCl_2$, в сравнении с контрольными животными и с животными, получающими исключительно $MnCl_2$. Данные представлены на рис. 3.5.12.

А.



Б.

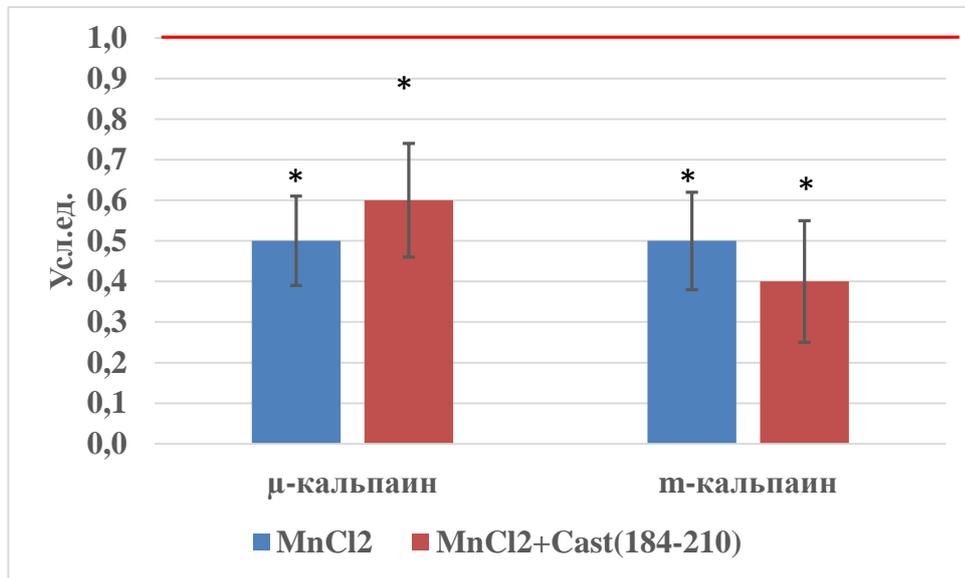
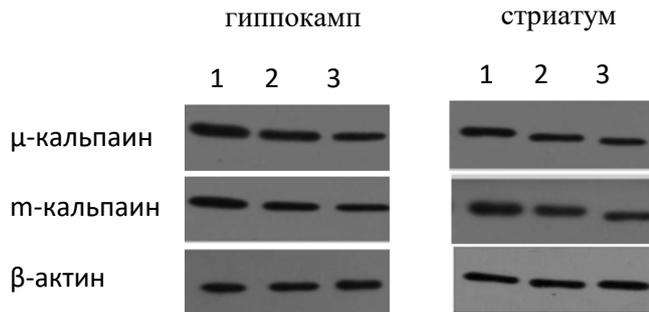


Рисунок 3.5.12 – Уровень мРНК μ - и m-кальпаина в гиппокампе (А) и стриатуме (Б) крыс через 30 дней интраназального введения $MnCl_2$ и при подавлении активности кальпаинов ингибитором Cast (184-210), в каждой точке $n=10$. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, красной линией обозначен уровень контрольных значений, дисперсионный анализ с последующим применением post hoc критерия Тьюки, *- $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

Оказалось, что на 30-й день введения $MnCl_2$ и в клетках гиппокампа, и в клетках стриатума по сравнению с контрольной группой наблюдается снижение продукции мРНК обоих кальпаинов: в клетках гиппокампа в 4 и в 2,2 раза, а в клетках стриатума в 2,0 и в 1,7 раза для μ - и m-кальпаина соответственно. Применение ингибитора кальпаинов Cast (184-210) не привело к значимому изменению данных показателей (в клетках обеих

анализируемых структур содержание мРНК μ - и m -кальпаина оставалось ниже показателей контрольной группы). Таким образом, применение выбранного нами ингибитора кальпаинов в условиях введения $MnCl_2$ никак не сказывается на содержании мРНК обеих изоформ кальпаинов. Данные о влиянии аппликации Cast (184-210) на содержание μ - и m -кальпаина в гиппокампе и стриатуме крыс после 30 дней введения $MnCl_2$ представлены на рис. 3.5.13.

А.



Б.

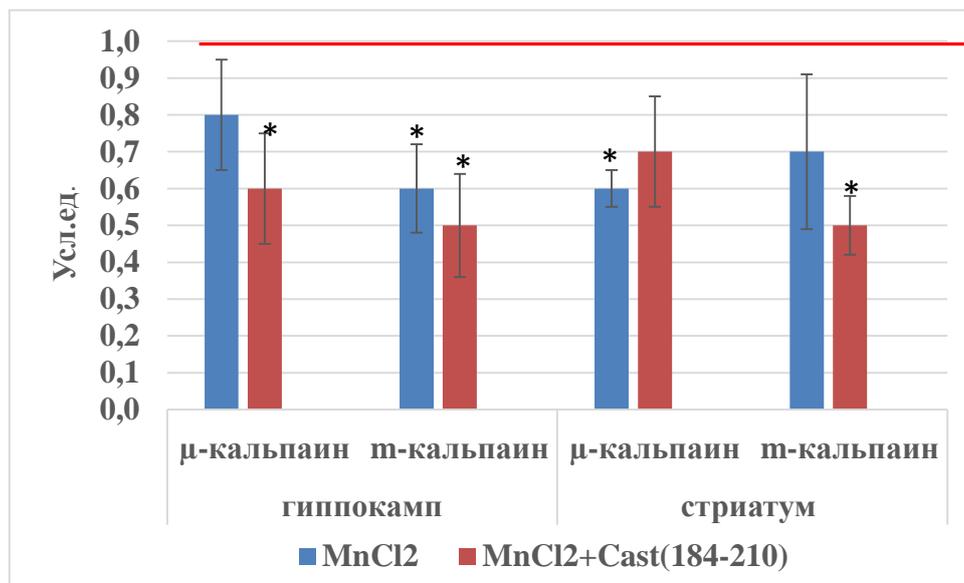


Рисунок 3.5.13 – Содержание μ - и m -кальпаина в гиппокампе и стриатуме крыс через 30 дней интраназального введения $MnCl_2$ и при подавлении активности кальпаинов ингибитором Cast (184-210), в каждой точке $n=5$. А. Репрезентативный иммуноблотт, где 1- контроль, 2 – $MnCl_2$, 3 – $MnCl_2 + Cast(184-210)$. Б. Результаты денситометрирования иммуноблоттов, проявленных антителами против μ - и m -кальпаину. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, красной линией обозначен уровень контрольных значений. Дисперсионный анализ с последующим применением post hoc критерия Тьюки, * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Как видно из данных, приведенных на рис. 3.5.13, в клетках гиппокампа крыс, получавших 30 дней интраназально $MnCl_2$, наблюдается снижение содержания m -кальпаина, а применение ингибитора Cast (184-210) приводит к значимому снижению продукции обеих протеаз относительно контрольной

группы. В клетках стриатума введение $MnCl_2$, напротив, привело к снижению содержания μ -кальпаина, а применение ингибитора Cast(184-210) вызвало снижение содержания m -кальпаина, при этом уровень белка μ -кальпаина был не отличим от контроля. Таким образом, в обеих экспериментальных группах по исследуемым показателям наблюдались отличия только по сравнению с контрольной группой, между экспериментальными группами значимых различий выявлено не было, следовательно, применение ингибитора кальпаинов Cast(184-210) не приводит к изменению продукции μ - и m -кальпаина в гиппокампе и стриатуме крыс через 30 дней интраназального введения $MnCl_2$. В целом, данные изменения согласуются с выявленным нами снижением продукции мРНК μ - и m -кальпаина в гиппокампе и стриатуме. При определении активности протеаз оказалось, что на 30-й день введения $MnCl_2$ в обеих анализируемых структурах активность μ - и m -кальпаина не отличается от показателей контрольной группы (данные не показаны).

Сопоставить полученные нами результаты с литературными данными весьма сложно, поскольку эксперимент по схеме аналогичной нашей никто не проводил. Однако существуют немногочисленные работы, в которых после воздействий различного рода на срезах, на клеточных культурах, или на других моделях нейродегенерации *in vivo* исследовали содержание только мРНК/белка μ - или m -кальпаина. Например, обработка первичной культуры нейронов гиппокампа крысы оксидом мышьяка привела к значимому увеличению доли клеток, погибших путем апоптоза, при этом в них наблюдалось увеличение содержания мРНК и белка μ -кальпаина, а данные показатели для m -кальпаина по сравнению с контролем изменены не были [351]. На модели диабетической ретинопатии у мышей также показано увеличение содержания мРНК μ -, но не m -кальпаина в ганглиозных клетках сетчатки, сопровождающееся значимым увеличением суммарной протеолитической активности данных протеаз [352]. На переживающих срезах головного мозга крысят показано, что их обработка 400 мкМ $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ в течение суток привела к 3-х кратному увеличению уровня внеклеточной ЛДГ,

30% увеличению доли клеток, погибших путем апоптоза, 3-х кратному увеличению концентрации внутриклеточного кальция, увеличению суммарной кальпаин-подобной протеолитической активности в 5 раз, 3-х кратному увеличению уровня мРНК μ -кальпаина и 1,5 кратному увеличению содержания белка μ -кальпаина. При этом аппликация ингибитора кальпаина II снижала, но не восстанавливала до уровня контроля содержание внеклеточной ЛДГ, как и долю клеток, погибших путем апоптоза, суммарную активность кальпаинов (до 4-х, 3-х и 2-х кратного превышения относительно контроля при добавлении 1, 2 и 4 мкМ ингибитора соответственно), но никак не сказывалась на уровне внутриклеточного кальция и на содержании мРНК и белка μ -кальпаина [344]. Следовательно, протективный эффект ингибитора кальпаина II не был вызван снижением продукции μ -кальпаина. Поскольку авторы цитируемой работы не исследовали содержание мРНК и белка m -кальпаина, то однозначно заключить, что аппликация ингибитора не привела к изменению продукции этой изоформы нельзя. Полученные же нами данные однозначно указывают на то, что выявленный нами протективный эффект ингибитора Cast(184-210) не связан с изменением продукции данных протеаз, а может быть вызван лишь снижением протеолитической активности кальпаинов или неизвестными, но не связанными с кальпаинами функциями данного пептида.

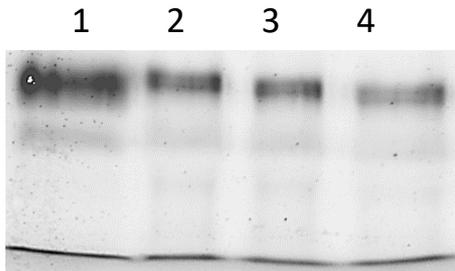
Сопоставление данных, представленных на рис. 3.5.12 и 3.4.35, показало, что более длительное ведение $MnCl_2$ (90 дней) приводит к противоположным изменениям: в клетках гиппокампа наблюдается повышение содержания мРНК μ - и m -кальпаина в 1,6 и 1,5 раз по сравнению с контролем (данные приведены на рис. 3.4.34), а также в 6,4 и в 3,3 раза для мРНК μ - и m -кальпаина по сравнению с 30-ти дневным введением ($p=0,0012$ и $p=0,0038$ соответственно, дисперсионный анализ с последующим применением *post hoc* критерия Тьюки). Оказалось, что в клетках гиппокампа через 30 дней введения $MnCl_2$ содержание μ -кальпаина не отличимо от контрольной группы, а m -кальпаина – снижено (рис. 3.5.13); более длительное

ведение $MnCl_2$ (90 дней) приводит к увеличению содержания μ - и m -кальпаина в 2 и 2,5 раза по отношению к контролю соответственно (рис. 3.4.36), а также и по отношению к 30-му дню – в 2 и в 4,2 раза для ($p=0,023$ и $p=0,003$, дисперсионный анализ с последующим применением *post hoc* критерия Тьюки). Следовательно, можно предположить, что на относительно ранних этапах развития марганцевой интоксикации в исследуемых нами областях мозга наблюдается компенсаторное снижение экспрессии соответствующих генов, а также продукции данных белков. Частично наше предположение находит подтверждение в работе [353], где показано, что у крыс с пилокарпин-индуцированной эпилепсией в клетках CA1 и в CA3 поля гиппокампа наблюдается снижение продукции μ -кальпаина, но увеличение активности данной протеазы по сравнению с контролем; для m -кальпаина характерны другие изменения – продукция протеазы остается на сопоставимом с контрольной группой уровне, а активность повышается. Для обеих протеаз показана сильная положительная связь между активностью кальпаинов и числом эпилептических припадков. В более раннем исследовании на модели травматического поражения спинного мозга у крыс показано увеличение суммарной активности кальпаинов в клетках спинного мозга травмированных животных. Авторы обращают внимание на то, что активность кальпаинов увеличивается со временем после нанесения травмы и через 2 суток уже в 2,5 раза превышает данный показатель в контрольной группе. При этом уровень мРНК обеих протеаз на протяжении трех суток после нанесения травмы неотличим от контроля [354]. Таким образом, в ряде работ, как и в нашем исследовании показано снижение или сохранение на уровне контрольных значений содержания мРНК и белка μ - и m -кальпаина при одновременном увеличении активности протеаз, которая коррелирует с выраженностью патологического процесса.

Поскольку нами было показано $MnCl_2$ -индуцированное высвобождение m -кальпаина из нервных окончаний (синапсом), логично было бы проанализировать содержание и/или активность кальпаинов в ликворе

животных. Однако взятие ликвора у крыс сопряжено с высокой летальностью, что в совокупности со значительной стоимостью содержания экспериментальных животных не позволило нам провести такое исследование. Тем не менее, мы смогли проанализировать активность кальпаинов в плазме крови экспериментальных животных. Данные представлены на рис. 3.5.14.

А.



Б.

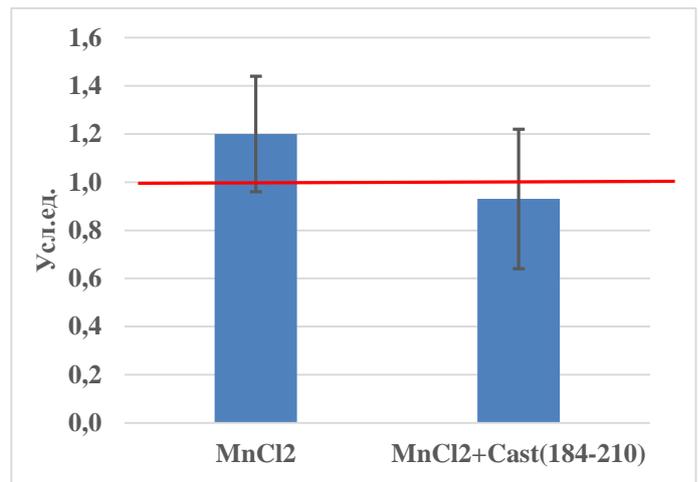


Рисунок 3.5.14 – Казеинограмма, отражающая активность кальпаинов в плазме крови крыс через 30 дней интраназального введения $MnCl_2$ и при подавлении активности кальпаинов ингибитором Cast (184-210), в каждой точке $n=3$. А. Вид типичной казеинограммы, где исходный FITC-казеин (1); FITC-казеин после инкубации с плазмой крови животных контрольной группы (2), группы $MnCl_2$ (3), группы $MnCl_2 + Cast$ (184-210) (4). Б. Результат денситометрирования зон, соответствующих фрагментам FITC-казеина к нерасщепленному FITC-казеину нормированные на показатель контрольной группы. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, красной линией обозначен уровень контрольных значений; дисперсионный анализ.

Как видно из данных, представленных на рис. 3.5.14, активность кальпаинов в плазме крови животных, подвергшихся интоксикации $MnCl_2$ не была повышена; также нет оснований считать, что введение ингибитора кальпаина Cast(184-210) повлияло на активность кальпаинов плазмы крови или на уровень секреции/высвобождения кальпаинов из клеток в плазму крови. Отсутствие в литературе подобных исследований не позволяет сопоставить эти результаты с данными других научных групп. Вероятно, патологические изменения к 30-му дню введения $MnCl_2$ еще не столь

выражены, и поэтому мы не наблюдаем изменения активности кальпаинов в плазме крови.

Таким образом, курсовое интраназальное введение Cast (184-210) в условиях интоксикации $MnCl_2$ частично нормализует походку животных, но не восстанавливает двигательную активность крыс; в клетках гиппокампа и стриатума снижает выраженность воспалительного процесса, что проявляется в уменьшении содержания мРНК основных провоспалительных цитокинов, NFκB и IBA-1; способствует выживаемости дофаминергических нейронов за счет нормализации содержания дофамина, его метаболитов, скорости внеклеточного метаболизма дофамина, в том числе вследствие увеличения содержания тирозингидроксилазы; не приводит к снижению содержания марганца в анализируемых структурах мозга и не влияет на содержание мРНК и белка μ -/ τ -кальпаина.

3.6. Активность кальпаинов в плазме крови пациентов с заболеваниями экстрапирамидной системы

В последнее десятилетие появились относительно простые, пригодные для амбулаторной диагностики методы определения активности кальпаинов в биологических жидкостях, что позволило нам провести исследование данного показателя на небольших группах пациентов с заболеваниями экстрапирамидной системы. Основная рабочая гипотеза состояла в том, что развитие нейродегенеративного процесса приводит к ослаблению ГЭБ; из-за повышения проницаемости ГЭБ некоторые церебральные белки попадают в общий кровоток или же в кровоток выходят медиаторы, стимулирующие продукцию определенных белков на периферии, например, кальпаинов. В любом случае, повышение содержания таких белков в кровотоке может отражать стадию или тяжесть/скорость течения нейродегенеративного процесса.

Для исследования были взяты демографические и биохимические показатели пациентов с болезнью Паркинсона (БП) и с эссенциальным

тремором (ЭТ), поскольку эти формы патологии ЦНС являются самыми распространенными заболеваниями экстрапирамидной системы. Однако в отличие от БП – полиморфного заболевания, приводящего к тяжелой инвалидизации больного, ЭТ традиционно рассматривают как заболевание с относительно доброкачественным течением; при этом примерно в 40 % случаев в клинической картине ЭТ могут наблюдаться моторные и немоторные симптомы, характерные и для БП, такие как тремор покоя, мышечная ригидность, депрессия, когнитивная дисфункция [355]. Таким образом, нами были выбраны разные по этиологии, но близкие по симптоматике заболевания. В исследование были включены данные 12 пациентов с БП, 12 пациентов с ЭТ и 12 неврологически здоровых волонтеров, которые проходили обследования в рамках выполнения других клинических исследований (см. п. 2.3). Краткая характеристика пациентов представлена в табл. 3.6.1.

Таблица 3.6.1. Клинико-демографическая характеристика исследуемых групп.

	БП, n=12	ЭТ, n=12	Контрольная группа, n=12
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
Возраст, годы	63 (60;66)	62 (60; 65)	63 (58; 68)
Гендерный состав (м/ж)	6/6	6/6	6/6
Стадия БП в соответствии с классификацией Хен и Яра	2,25 (1,75; 2,50)	-	-
Оценка по шкале FTM, баллы	-	27 (22;38)	-

Помимо клинико-демографических параметров в исследование были включены данные о содержании в периферической крови испытуемых основных провоспалительных цитокинов, показателей энергетического обмена и активности кальпаинов. Определение этих параметров было предусмотрено дизайном соответствующих исследований. Данные приведены в табл. 3.6.2.

Таблица 3.6.2 Сравнительная характеристика биохимических показателей в крови пациентов с БП, ЭТ и контрольной группы.

Параметр/группа	БП, n=12 (группа 1)	ЭТ, n=12 (группа2)	Контрольная группа, n=12 (группа3)	p ₁₂ /p ₁₃ /p ₂₃ *
<i>I</i>	2	3	4	5
ИЛ-1β, пг/мл	6,0 ± 0,4	4,3 ± 0,3	3,0 ± 0,5	0,007/0,000/0,097
ИЛ-6, пг/мл	1,6 ± 0,3	1,1 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,304/0,099/0,915
ИЛ-10, пг/мл	4,5 ± 0,2	4,8 ± 0,2	5,0 ± 0,3	0,915/0,541/0,991
ФНО-α, пг/мл	2,4 ± 0,3	2,4 ± 0,1	2,1 ± 0,3	0,989/0,956/0,986
Пируват, мг/дл	0,96 ± 0,05	0,62 ± 0,01	0,60 ± 0,01	0,000/0,000/0,725
Лактат, мг/дл	14,0 ± 0,4	11,6 ± 0,3	12,2 ± 0,3	0,000/0,005/0,458
ЛДГ, Ед/л	190,2 ± 7,0	187,3 ± 5,9	179,4 ± 3,6	0,998/0,541/0,785
Активность кальпайнов плазмы крови, Ед/мл	4,6 ± 0,5	3,8 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,570/0,001/0,025

*p – уровень значимости при сравнении соответствующих групп, номера сравниваемых групп указаны как подстрочные индексы.

Как видно из данных, приведенных в табл. 3.6.2, среди анализируемых биохимических показателей крови диагностическим потенциалом для дифференциальной диагностики ЭТ и БП, вероятно, обладает уровень ИЛ-1β в плазме крови, а также содержание лактата и пирувата в плазме крови (размер эффекта для всех установленных различий составил $d=0.623$ и выше). Судя по полученным данным, показатель активности кальпайнов плазмы крови не может быть использован для дифференциальной диагностики БП и ЭТ (уровень значимости при сопоставлении группы БП и ЭТ составил $p=0,570$). Обращает на себя внимание тот факт, что активность кальпайнов плазмы крови в обеих экспериментальных группах значимо выше контрольных значений ($p=0,001$ и $p=0,025$ по сравнению с контрольной группой для группы БП и ЭТ соответственно). В связи с выявленным фактом мы проанализировали связь между активностью кальпайнов плазмы крови и стадией/тяжестью

заболевания. Пациенты группы БП были разделены на две подгруппы в зависимости от стадии заболевания, в соответствии с классификацией Хен и Яра. В первую подгруппу вошли пациенты со стадией 1,0–2,0 (n=6) (подгруппа БП1), во вторую – со стадией 2,5–3,0 (n=6) (подгруппа БП2). Пациенты с ЭТ были разделены на две подгруппы по степени выраженности тремора, оцененной по шкале FTM – с легким или умеренным тремором (амплитуда <2 см) (подгруппа ЭТ1) и с выраженным тремором (амплитуда ≥ 2 см) (подгруппа ЭТ2). Данные об активности кальцаинов в выделенных подгруппах пациентов представлены на рис. 3.6.1.

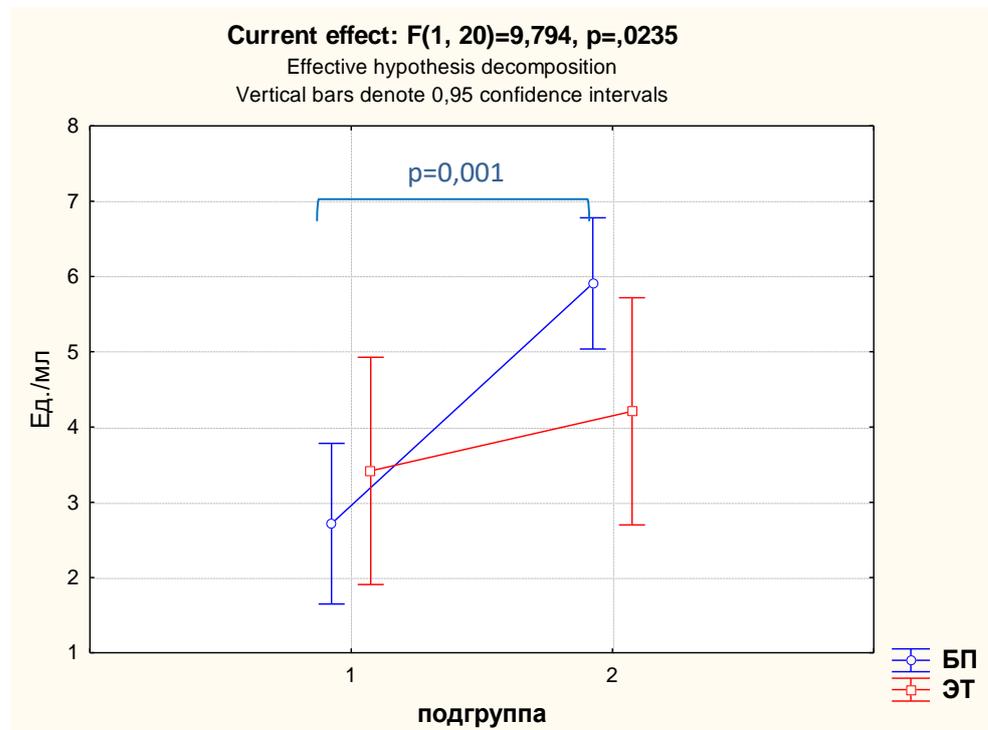
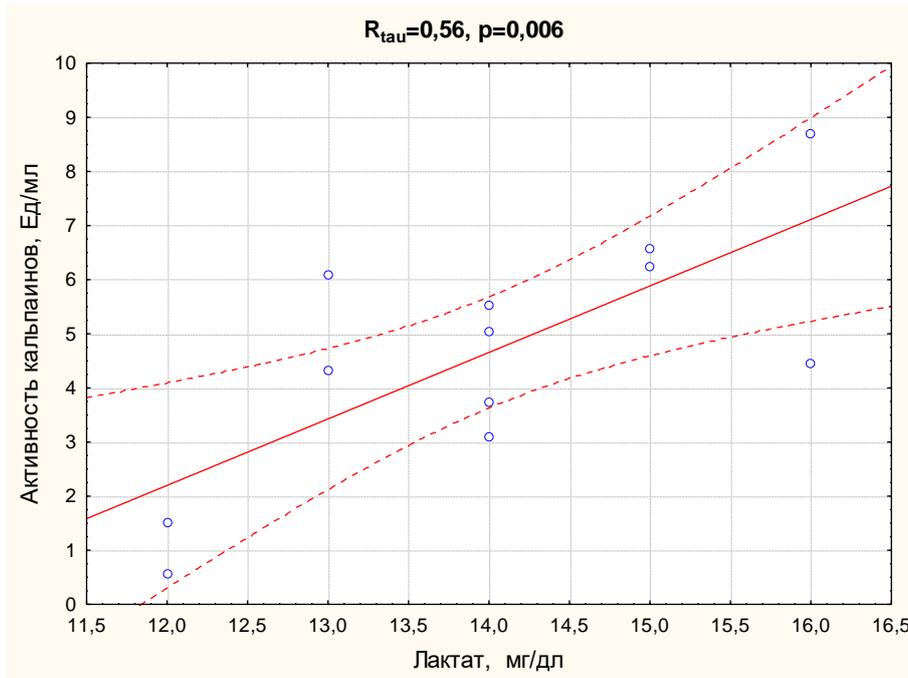


Рисунок 3.6.1 – Диаграмма, отражающая зависимость активности кальцаинов плазмы крови пациентов с БП и ЭТ в зависимости от стадии/тяжести заболевания (пояснения в тексте). Данные представлены как среднее \pm доверительный интервал, двухфакторный дисперсионный анализ (фактор 1 – нозология, фактор 2 – стадия/тяжесть) с последующим применением post hoc критерия Тьюки; при уровне значимости 5% размер наблюдаемого эффекта составил $d=0,541$, мощность 90%.

Значимых различий между уровнями активности кальцаинов в плазме крови пациентов групп БП1 и ЭТ1 выявлено не было ($p=0,853$). Следовательно, на ранних стадиях развития БП, как и при ЭТ с легким или умеренным тремором, активность кальцаинов в плазме крови значимо выше контрольных значений, но не различается между соответствующими

группами. Однако на развернутых стадиях БП (подгруппа БП2) активность кальпаинов плазмы крови значительно превышает показатели группы БП1 ($p=0,001$), при этом данный показатель между группами БП2 и ЭТ2 не различается ($p=0,206$) (рис. 3.6.1). Следовательно, весьма вероятно, что увеличение активности кальпаинов в плазме крови при прогрессировании БП указывает на вовлечение кальпаинов в развитие заболевания. Это предположение подтверждается достаточно высокой величиной эффекта (для дисперсионного анализа размер эффекта $d=0.4$ и выше считается высоким). Для выявления вероятного звена патогенеза БП, в который могут быть вовлечены кальпаины, мы сопоставили активность кальпаинов с содержанием в крови лактата и пирувата (рис. 3.6.2, 3.6.3).

А.



Б.

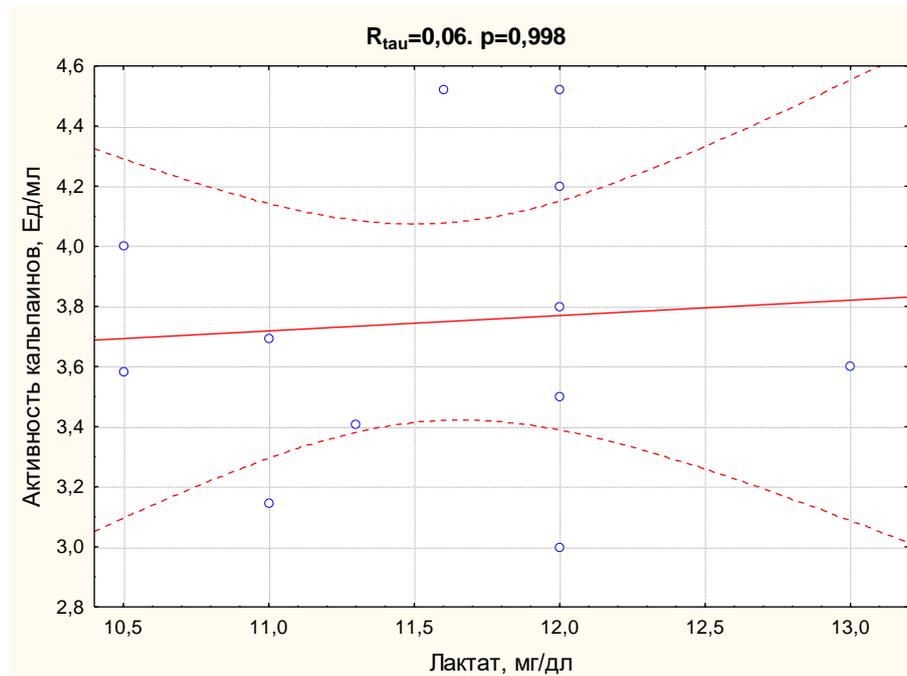
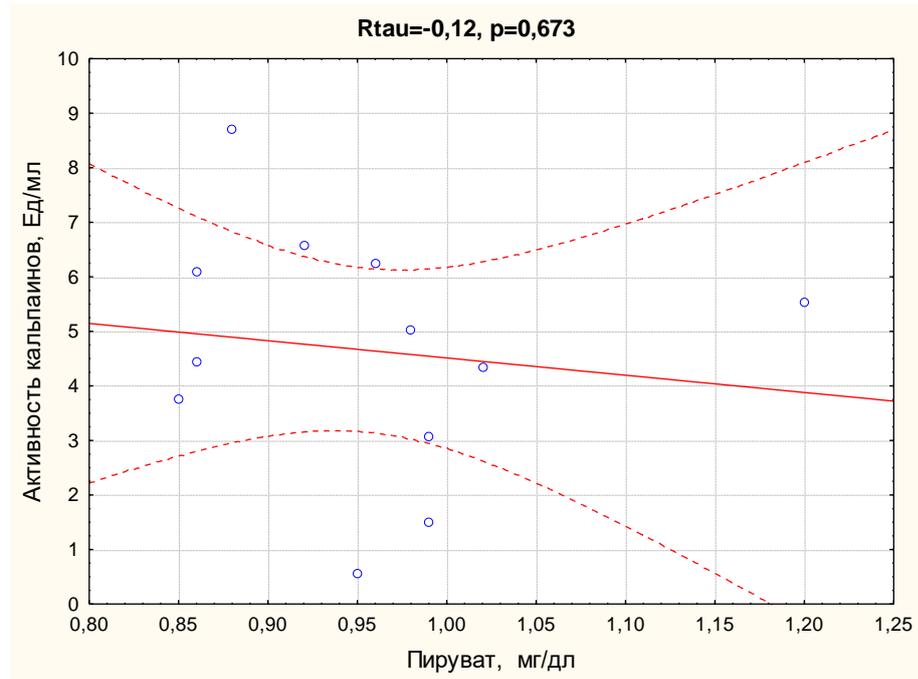


Рисунок 3.6.2 – Диаграмма рассеяния активности кальционов плазмы крови на концентрации лактата в крови пациентов с БП (А) и ЭТ (Б). Сплошной красной линией показана линия регрессии, пунктиром – доверительный интервал. Коэффициент корреляции Кендалла (R_{τ}) и соответствующий уровень значимости (p) указан над каждым графиком.

А.



Б.

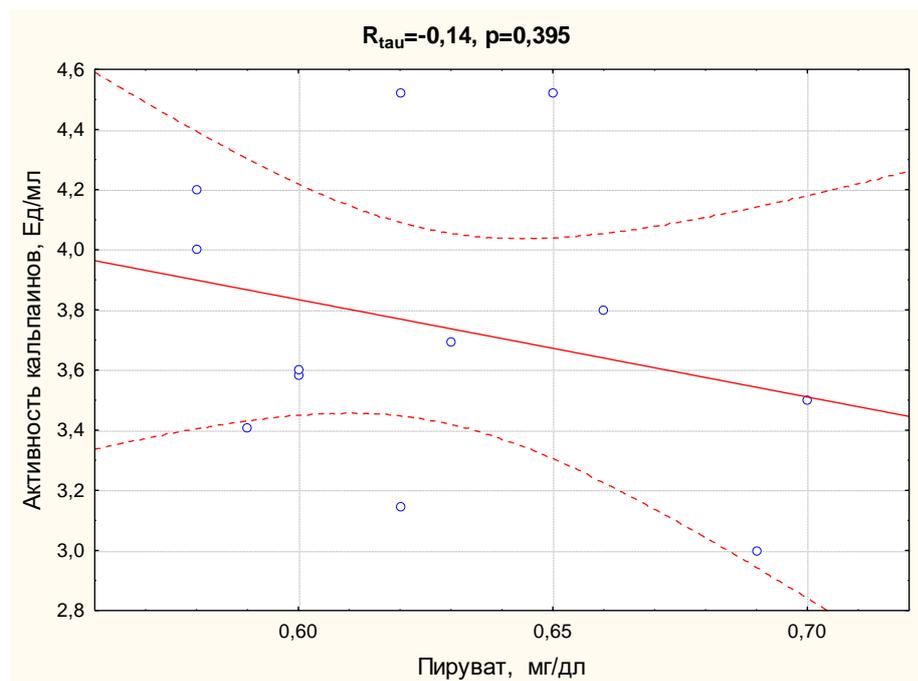


Рисунок 3.6.3 – Диаграмма рассеяния активности кальпаинов плазмы крови на концентрации пирувата в крови пациентов с БП (А) и ЭТ (Б). Сплошной красной линией показана линия регрессии, пунктиром – доверительный интервал. Коэффициент корреляции Кендалла (R_{τ}) и соответствующий уровень значимости (p) указан над каждым графиком.

Как видно из диаграмм рассеяния, представленных на рис. 3.6.2 и 3.6.3, обнаруживается положительная корреляционная зависимость средней силы между уровнем лактата и активностью кальпаинов в крови пациентов с БП

(коэффициент детерминации составил 0,31); между остальными параметрами корреляционных связей не выявлено. Следовательно, повышение активности кальпаинов в плазме крови пациентов с БП может быть сопряжено или вызвано развитием метаболических нарушений (вне зависимости от тяжести заболевания), особенно если принять во внимание изначально возможную митохондриальную локализацию μ -кальпаина [356].

Известно, что нарушение эффективности функционирования комплекса дыхательной цепи митохондрий вызывает развитие мощнейшего окислительного стресса. Этот процесс наиболее ярко выражен в мышечной ткани [357]. Однако существуют доказательства, что дефекты в структуре комплекса переноса электронов вызывают дисфункцию клеток ЦНС и, в частности, являются этиологическим фактором развития БП [358]. Это неудивительно, поскольку энергетические потребности нейронов обеспечиваются ими исключительно за счет окислительного фосфорилирования. Например, ингибирование комплекса I дыхательной цепи путем системного введения лабораторным мышам МФТП приводит к увеличению концентрации внутриклеточного кальция, гиперактивации кальпаинов, массовой гибели дофаминергических (ДА)-нейронов, и вызывает развитие триады симптомов паркинсонизма [359, 360].

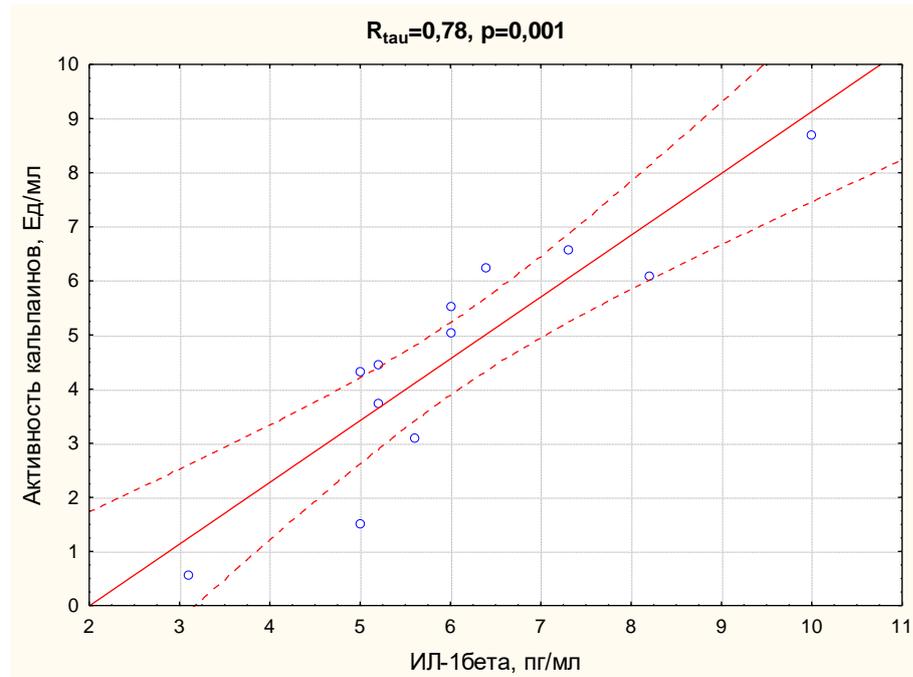
Аппликация 0,5 мМ МФТП к выделенным нервным окончаниям приводит к высвобождению m -кальпаина во внеклеточную среду (см. п. 3.2), что при ослабленном ГЭБ может быть причиной увеличения активности кальпаинов в крови, которые в свою очередь могут вовлекаться в модуляцию функциональной активности митохондрий клеток крови. В митохондриях, выделенных из тромбоцитов пациентов с БП, также были обнаружены дефекты комплекса I - увеличенная утечка протонов, что вызывало значительное снижение дыхательной ёмкости митохондрий [361]. Причиной развития таких нарушений может быть образование под действием кальпаинов фрагментов атаксина-3, которые нарушают работу комплекса I, вызывая развитие митохондриальной дисфункции [362]. Нарушения

окислительного фосфорилирования митохондрий у пациентов с БП были выявлены также в лимфоцитах, фибробластах и миоцитах, что свидетельствует о системном характере метаболических нарушений [363, 364]. Таким образом, у пациентов с БП вследствие митохондриальной недостаточности, могут развиваться метаболические нарушения, в частности, происходит частичное переключение на гликолиз. Подобные нарушения наблюдаются у пациентов с синдромом MELAS (Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes — «митохондриальная энцефаломиопатия, лактатацидоз, инсультоподобные эпизоды»), нейродегенеративным заболеванием, обусловленным наличием мутаций в митохондриальных генах. Выраженность метаболических нарушений у таких пациентов варьирует от умеренных до тяжелых и крайне тяжелых; возможно развитие лактат-ацидоза с увеличением уровня лактата в крови до 100 мг/дл, при смещении соотношения лактат/пируват в сторону лактата, сопровождающимся небольшим увеличением пирувата [365]. Активность и содержание кальпаинов в крови таких пациентов не изучались. Поскольку ассоциации БП и ЭТ с дефектами митохондриальных генов не выявлено, логично предположить, что нарушение функционирования комплексов цепи переноса электронов в митохондриях различных типов клеток пациентов с БП является вторичным. Поэтому и выявленные нами изменения (согласно табл. 3.6.2) не столь значительны: уровень лактата крови у пациентов с БП находится на верхней границе нормы, но превышает значение контрольной группы на 15%, а у пациентов с ЭТ - не отличается от контроля. Схожие изменения обнаружены и в отношении пирувата крови: у пациентов с БП уровень пирувата на 60% превышает показатель контрольной группы, а у пациентов с ЭТ не отличается от контроля; активность кальпаинов плазмы крови у пациентов с БП более чем в 4,5 раза превышает показатель контрольной группы, а для группы ЭТ характерно повышение этого показателя в 3,8 раз. Вероятно, у пациентов с БП, в отличие от ЭТ, нарушена утилизация пирувата. Действительно, в условиях неправильного

функционирования комплексов цепи переноса электронов митохондрий некоторых клеток, в оставшихся митохондриях будет возрастать утилизация глюкозы, а значит и увеличится продукция пирувата. При гипоксических состояниях (наблюдаемых, в том числе, и при БП) пируват будет преобразовываться в лактат, что приведёт к увеличению лактата в крови. У пациентов с ЭТ подобные изменения отсутствуют, что может быть следствием активации путей компенсации нарушений энергетического обмена, например, за счет активации адениннуклеотидтрансферазы и креатинкиназы. Несмотря на то, что определить происхождение кальпаинов (тромбоцитарное, лейкоцитарное и/или центральное) плазмы крови при таком дизайне эксперимента было невозможно, полученные нами данные указывают на вовлечение кальпаинов в развитие окислительного стресса, одного из звеньев сложного патогенеза БП.

В последнее время все больше внимания уделяется изучению иммунологических основ развития нейродегенеративного процесса при заболеваниях нервной системы. В частности, исследуется связь концентрации про- и противовоспалительных цитокинов в крови пациентов с различной выраженностью патологического процесса. Поскольку повышенная активация кальпаинов наблюдается и при развитии ряда воспалительных процессов, мы сопоставили данные об активности кальпаинов в плазме крови пациентов с БП и ЭТ с концентрацией основного провоспалительного цитокина – ИЛ1 β . Данные приведены на рис. 3.6.4.

А.



Б.

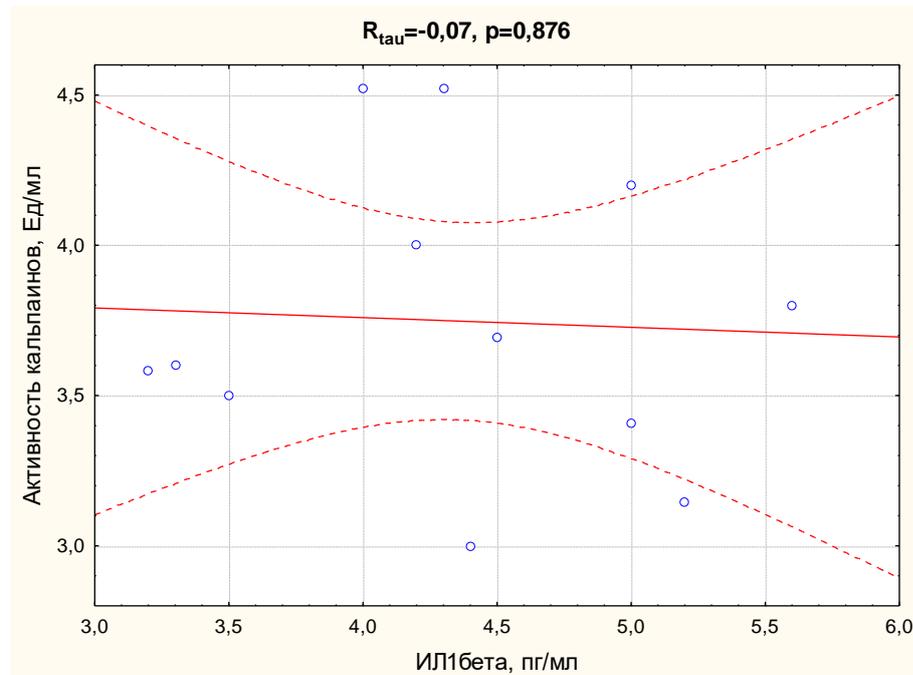


Рисунок 3.6.4 – Диаграмма рассеяния активности кальцаинов плазмы крови на концентрации ИЛ-1β в крови пациентов с БП (А) и ЭТ (Б). Сплошной красной линией показана линия регрессии, пунктиром – доверительный интервал. Коэффициент корреляции Кендалла (R_{τ}) и соответствующий уровень значимости (p) указан над каждым графиком.

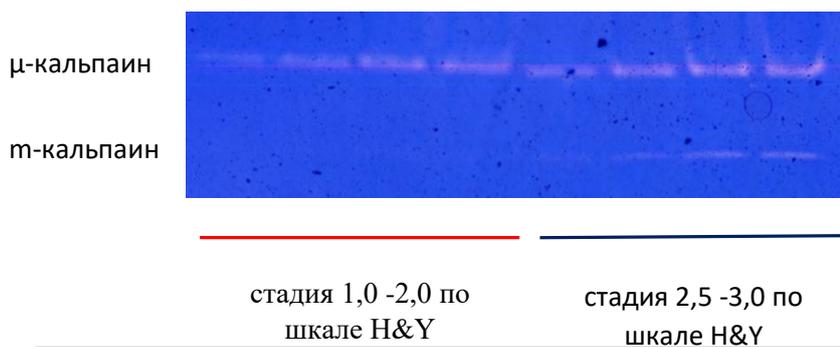
Как видно из диаграмм рассеяния, представленных на рис. 3.6.4, обнаруживается сильная прямая корреляционная связь между уровнем ИЛ-1β и активностью кальцаинов в плазме крови пациентов с БП (коэффициент детерминации составил 0,61), для пациентов с ЭТ такой зависимости обнаружено не было. В одном из наших исследований при оценке уровня ИЛ-

1β у пациентов с разным темпом прогрессирования БП нами было обнаружено, что у больных с высокой скоростью прогрессирования уровень ИЛ- 1β в крови выше, чем у пациентов с медленным темпом прогрессирования БП [366]; содержание ИЛ- 1β в крови пациентов со стадией 3,0-4,0 (в соответствии с классификацией Хен и Яра) значимо выше по сравнению с пациентами, находящимися на 1,0-2,0 стадии [367], при этом, как видно из рис. 3.6.1, активность кальпаинов в плазме крови пациентов, находящихся на стадии 2,5-3,0, тоже была значимо выше, чем у пациентов 1,0-2,0 стадии. Следовательно, в совокупности эти показатели обладают прогностической силой и, вероятно, отражают этиологические механизмы развития БП, в частности, вклад нейровоспаления в патогенез БП. Действительно, нейродегенеративные изменения в черной субстанции пациентов с БП сопровождаются нейровоспалением, ключевую роль в инициации и развитии которого играют активированные клетки микроглии [368, 369]. Они секретируют провоспалительные факторы (например, ИЛ- 1β и, вероятно, μ - t -кальпаины), которые способны индуцировать окислительный стресс и/или другие изменения в нейронах, ведущие к их гибели. ИЛ- 1β , а возможно и кальпаины, проходят сквозь нарушенный ГЭБ [370], попадают в кровоток, где подвергаются деградации. Однако периферический пул цитокинов/кальпаинов постоянно пополняется (по описанному выше механизму) и таким образом обеспечивается повышение их содержания в крови.

Возможной причиной отсутствия изменений в уровнях лактата, пирувата, ИЛ- 1β , и менее выраженного увеличения активности кальпаинов в крови пациентов с ЭТ (в отличие от БП) является различная локализация и скорость прогрессирования дегенеративных изменений в ЦНР. В настоящее время не вызывает сомнений тот факт, что паркинсонический тремор является центральным по своей природе, а наиболее вероятной локализацией осцилляций представляются базальные ядра. Эссенциальный тремор тоже имеет центральный механизм развития, однако, в большей степени механизм

ЭТ связан с функциональными нарушениями оливоцереbellарных и церебеллокортикальных кругов и вызван дефицитом ГАМК-ергической, а не ДА-ергической передачи. В базальных ганглиях плотность глиальных клеток значительно выше, чем в мозжечке [371], следовательно, во внеклеточное пространство секретируется больше провоспалительных агентов, кальпаинов и пр., больше клеток переходит на анаэробный путь утилизации глюкозы, чем и определяется более выраженное повышение содержания ИЛ-1 β , лактата и кальпаинов в крови. Для дифференциации вклада различных изоформ кальпаинов в общую активность кальпаинов плазмы крови пациентов с различной стадией БП мы определили активность кальпаинов методом зимографии в геле. Данные приведены на рис. 3.6.5.

А.



Б.

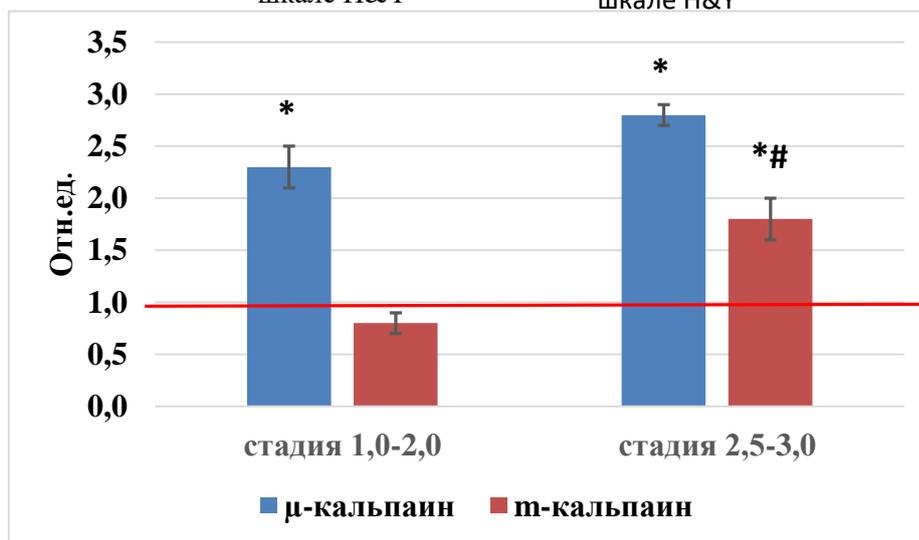


Рисунок 3.6.5 – Активность μ - и m-кальпаина в плазме крови пациентов, находящихся на различных стадиях БП А. Репрезентативная зимограмма (контрольные образцы не приведены). Б. Результаты измерения площадей обесцвеченных зон, нормированные на контроль, n=6. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего, красной линией обозначен уровень контрольных значений. Дисперсионный анализ с последующим применением post hoc критерия Тьюки, *- $p < 0,05$ по сравнению с контролем, #- $p < 0,05$ по сравнению с группой «Стадия 1,0-2,0».

Оказалось, что в плазме крови пациентов на начальных стадиях БП активность μ -кальпаина в 2,3 раза превышает данный показатель контрольной группы, а активность m -кальпаина не отличается от контроля (рис.3.6.5). Однако на развернутых стадиях заболевания в плазме крови наблюдается увеличение активности обоих кальпаинов (в 2,8 и в 1,8 раз для μ - и m -кальпаина соответственно). Следовательно, на ранних стадиях болезни в крови пациентов с БП повышение активности кальпаинов относительно контрольной группы определяется гиперактивацией или повышением содержания с последующей активацией исключительно μ -кальпаина; на развернутых стадиях заболевания дополнительное увеличение активности кальпаинов в плазме крови определяется уже увеличением активности или увеличением содержания и активности m -кальпаина. Эти данные указывают на дифференциальный вклад μ - и m -кальпаина в патогенез БП: повышение активности кальпаинов крови, вероятнее всего, является неспецифическим для БП и отражает универсальное для нейродегенеративных заболеваний звено патогенеза, увеличение активности m -кальпаина, наблюдаемое при БП, - более специфический показатель, связанный с процессом перехода с начальных на развернутые стадии заболевания. *Таким образом, m -кальпаин обладает прогностическим потенциалом при определении вероятности перехода с начальных на развернутые стадии БП.*

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фундаментальной задачей биологии и медицины является раскрытие механизмов адаптивных реакций организма, развивающихся в условиях изменения внешней и/или внутренней среды. Поскольку центральная роль в реализации адаптации принадлежит мозгу, успешность решения данной задачи зависит от полноты наших представлений об изменениях метаболизма нейронов, вызванных, в частности, действием биологически активных веществ, а также понимания причин, обуславливающих переход нормальной реакции клеток ЦНС в патологическую.

В реализации адаптивных реакций мозга принимают участие различные нейрогуморальные факторы. Среди них особая роль принадлежит нейромедиаторным системам, цитокинам и протеолитическим ферментам ([4, 8–14] и мн. др), поэтому получение новых данных об изменении функциональной активности нейрохимических систем позволяет расширить понимание закономерностей и механизмов поддержания постоянства внутренней среды организма. В частности, выявленное в данном исследовании включение кальпаиновой системы клеток ЦНС в механизмы регуляции ответа клетки на бактериальные и химические токсины дополняет представление о физиологических функциях кальпаинов и открывает новые мишени для фармакологического воздействия с целью повышения адаптационного потенциала клеток ЦНР.

Проведенные исследования показывают, что при действии на организм бактериальных или химических токсинов различной природы изменяется локализация, а также продукция мРНК/белка, и активность внутриклеточных цистеиновых протеаз семейства кальпаинов, причем временная динамика и выраженность изменений данных показателей специфичны для каждого вида воздействия и для каждого отдела мозга.

Мы обнаружили, что после однократного интраперитонеального введения крысам субсептической дозы ЛПС (бактериальный эндотоксин) в клетках стриатума наблюдается усиление продукции мРНК ИЛ-1 β , ФНО α и

мРНК маркера активации микроглии IBA-1, причем со временем содержание мРНК IBA-1 увеличивается, что свидетельствует о все нарастающей активации микроглиоцитов (см. рис. 3.4.4). Данные изменения сопровождаются повышением содержания дофамина, вызванным снижением скорости его внеклеточного метаболизма, что может быть следствием развития компенсаторных процессов, в том числе опосредованных действием кальпаинов. Действительно, несмотря на увеличение содержания мРНК обеих протеаз, активность m-кальпаина увеличена не была, а у μ -кальпаина была даже снижена (на 7-й день после введения ЛПС, см. рис. 3.4.12). Частично следствием такого снижения могло быть наблюдаемое нами на выделенных нервных окончаниях компенсаторное повышение уровня внеклеточного дофамина (см. рис. 3.1.5).

Другая причина повышения содержания дофамина в стриатуме – выявленное нами повышение содержания норадреналина (см. рис. 3.4.8), который, высвобождаясь в синаптическую щель, связывается со своими рецепторами на нейронах и клетках микроглии, и замедляет скорость развития нейровоспаления [305], тем самым способствуя «выживаемости» ДАНейронов и повышению уровня дофамина. Однако обращает на себя внимание тот факт, что со временем в клетках стриатума усиливается продукция мРНК m-кальпаина, а продукция мРНК кальпастина, наоборот, снижается, следовательно, весьма велика вероятность повышения активности данной изоформы кальпаинов в отсроченном периоде. Действительно, через 180 дней после введения ЛПС в стриатуме наблюдается: многократное увеличение продукции мРНК IBA1 и ФНО α (см. рис. 3.4.17); двукратное снижение содержание дофамина и его внутриклеточного метаболита ДОФУК с одновременным увеличением содержания ГВК (см. рис. 3.4.18); в компактной части ЧС выявляются дегенерирующие нейроны (рис.3.4.22); более чем в четыре раза увеличивается содержание мРНК обеих протеаз, но продукция и активность повышается только у m-кальпаина (см. рис. 3.4.19-3.4.21), причем именно в нервных окончаниях (рис. 3.4.23). Гиперактивация m-кальпаина по

принципу положительной обратной связи приводит к интенсификации нейровоспаления, а именно: μ -кальпаин, расщепляя белок-ингибитор транскрипционного фактора NF- κ B, вызывает транслокацию NF- κ B в ядро, тем самым способствуя продукции провоспалительных медиаторов [310], что мы и наблюдаем. Возможен еще один путь включения μ -кальпаина в реализацию нейротоксических эффектов ЛПС – через активацию каспаз-опосредованных проапоптотических путей [313]. Так или иначе, процесс хронитизируется и распространяется, у животных проявляются двигательные нарушения (см. рис. 3.4.15).

При хроническом интраназальном введении $MnCl_2$ крысам в стриатуме процесс перехода физиологической реакции клеток ЦНС в патологическую протекает по похожей схеме, однако в этом случае длительность переходного состояния (отличающегося и от нормы, и от патологии) значительно короче. Попадая в организм, марганец преимущественно накапливается в клетках стриопаллидарной системы (см. рис. 3.4.30 и 3.5.6), причем, согласно данным [372], в большей степени секвестрируется астроцитами, чем нейронами. Накопление марганца в астроцитах приводит к их активации, повышению продукции и секреции ими провоспалительных цитокинов (рис. 3.5.8 и 3.4.32), а также вызывает непосредственную активацию μ -кальпаина (см. рис. 3.1.1), который, в свою очередь, расщепляет PHLPP1 (но не PHLPP2) фосфатазу (leucine-rich repeat Protein Phosphatase 1) и снимает блок с Akt- и ERK1/2-зависимых сигнальных путей, определяющих выживание астроцитов [20, 373]. Таким образом, прямая активация астроцитарного μ -кальпаина марганцем стимулирует их выживание, обеспечивая поддержание воспалительной реакции в мозге, выполняющей изначально защитную функцию. Следует обратить внимание, что при введении ЛПС таких изменений не происходит, активность μ -кальпаина не только не увеличивается, но даже снижается.

Со временем продукция цитокинов и других медиаторов воспаления усиливается (рис. 3.5.8), в том числе за счет увеличения продукции транскрипционного фактора NF κ B (и снижения I κ B), под контролем которого

находится экспрессия многих генов, вовлечённых в регуляцию воспалительного ответа [374]. Вероятнее всего, на начальном этапе марганцевой интоксикации провоспалительные агенты продуцируются клетками астроглии, а позже (в период с 30-го по 90-й день введения $MnCl_2$) происходит активация микроглиальных клеток, которые вносят дополнительный вклад в продукцию провоспалительных агентов. В пользу этого предположения свидетельствует тот факт, что на 30-й день воздействия уровень мРНК IBA1 (маркер активированной микроглии) в стриатуме экспериментальных животных ниже показателей контрольной группы, а к 90-му дню воздействия уже в несколько раз превышает нормальные показатели (рис 3.5.8 и 3.4.32). Однако при введении ЛПС активация микроглии происходит почти сразу (содержание мРНК IBA-1 увеличивается, начиная с первых суток после введения токсина) и продолжает усиливаться со временем (к 180-му дню уже в 12 раз превышает показатели контрольной группы).

В совокупности эти данные свидетельствуют о развитии адаптивных/компенсаторных процессов в первый месяц введения $MnCl_2$, однако в условиях хронического токсического воздействия, вероятно, происходит истощение физиологических резервов и нарушение взаимодействия метаболических механизмов адаптации, что приводит к неконтролируемому развитию воспалительного процесса (в случае введения ЛПС процесс хронитизируется значительно быстрее). Со временем марганец начинает накапливаться не только астроцитами, но и нейронами, что приводит к активации m-кальпаина в нервных окончаниях (см. рис. 3.1.4 (Б)). С одной стороны, активированный m-кальпаин может расщеплять белок p35 с образованием p25; в результате образуется комплекс Cdk5-p25, который инактивирует белок MEF (myocyte enhancer factor), важнейший для выживаемости дофаминергических нейронов фактор [198], и усиливает продукцию белка p53, способствуя активации каспазы-3 [199]. Следовательно, активация m-кальпаина в нервных окончаниях вызывает гибель преимущественно ДА-нейронов, которые особо чувствительны к повышению

содержания в них марганца [375] (это же рассуждение справедливо в случае, когда в качестве повреждающего фактора выступает токсин бактериального происхождения).

С другой стороны, активированный *m*-кальпаин в условиях избытка марганца в среде высвобождается нервными окончаниями в интерстициальную жидкость (рис. 3.2.8), где он сохраняет свою протеолитическую активность и может расщеплять ряд внеклеточных и/или трансмембранных белков, модулируя их функции. Например, с высокой вероятностью субстратом *m*-кальпаина может быть мембранная форма катехол-О-метилтрансферазы (КОМТ). Наиболее предпочтительный сайт расщепления КОМТ кальпаином находится между глутаматом 107 и лейцином 108 (для аминокислотной последовательности КОМТ крысы). В результате такого расщепления разрушается сайт связывания фермента с донором метильной группы - S-аденозилметионином. Следовательно, после расщепления кальпаином КОМТ утратит свою ферментативную активность, что приведет к снижению скорости катаболизма дофамина и увеличению его содержания в синаптической щели. В условиях марганцевой интоксикации, когда ДА-нейроны черной субстанции погибают, что выражается общим снижением содержания дофамина и его метаболитов в стриатуме (см. рис. 3.4.33(Б) и 3.5.9 (Б)), внеклеточный *m*-кальпаин может способствовать частичной компенсации утрачиваемых функций за счет предотвращения метилирования дофамина.

Таким образом, в клетках стриатума при действии на организм бактериальных (ЛПС) или химических токсинов ($MnCl_2$) переходное состояние от нормы к патологии характеризуется фактор-специфичным вовлечением различных изоформ кальпаинов; при развитии нейродегенеративного процесса вне зависимости от типа повреждающего действия происходит гиперактивация исключительно *m*-кальпаина.

В ответ на введение крысам субсептической дозы ЛПС в клетках гиппокампа наблюдается усиление продукции основных провоспалительных

цитокинов без признаков активации микроглии (см. рис. 3.4.3), снижение содержания дофамина и увеличение содержания норадреналина (см. рис. 3.4.5 и 3.4.6), сопровождаемое усилением продукции мРНК и активности μ - и m -кальпаина с последующим восстановлением данных показателей до нормы, за исключением сохранения повышенной активности m -кальпаина на 30-й день после введения эндотоксина.

В отдаленном периоде (180 дней после введения ЛПС) в клетках гиппокампа наблюдается усиление продукции мРНК ФНО α без признаков активации микроглии, сопровождаемое усилением продукции мРНК, белка и активности μ -кальпаина (но не m -кальпаина) при неизменном относительно контроле содержания и скорости метаболизма дофамина и норадреналина (см. рис. 3.4.17-3.4.21); в поле CA1 гиппокампа выявляются многочисленные сморщенные нейроны палочковидной и треугольной формы, в которых не просматриваются ядра (см. рис. 3.4.22). Можно заключить, что в ответ на введение субсептической дозы ЛПС в клетках гиппокампа активируется и μ -кальпаин, и m -кальпаин, которые, расщепляя свои субстраты, оказывают на клетки гиппокампа модулирующее действие: инициируют синаптические перестройки, подавляют активность NMDA рецепторов глутамата, предотвращая развитие эксайтотоксичности [219]. Действительно, подавление активности кальпаинов, в особенности μ -кальпаина, приводит к предотвращению индукции LTP, нарушению гиппокамп-зависимой пространственной памяти, обусловленное неспособностью нейронов в отсутствие кальпаинов к функциональной и морфологической реорганизации синаптических контактов [211, 212, 316]. Сохранение повышенной активности m -кальпаина в отсроченном периоде приводит к расщеплению некоторых цитоплазматических белков и изменению морфологии клетки – мы наблюдаем «сморщенные» нейроны. Данные изменения со временем компенсируются, в частности, за счет повышения продукции/активности μ -кальпаина и активации сигнальных путей, определяющих выживание клетки.

В гиппокампе крыс, хронически получающих $MnCl_2$, мы видим несколько другие изменения. Накопление марганца в клетках гиппокампа значительно менее выражено по сравнению с клетками стриатума (см. рис. 3.4.30 и 3.5.6), однако мы полагаем, что содержание марганца 0,5 мкг/г ткани достаточно для активации μ -кальпаина со всеми описанными выше последствиями. Действительно, через 30 дней введения токсина мы, также как и в клетках стриатума, видим в гиппокампе признаки развития воспалительной реакции: увеличение продукции мРНК ФНО α , ИЛ-1 β и даже NF κ B (рис. 3.5.7), при этом продукция мРНК μ - и m -кальпаина снижается, а на уровне белка детектируется компенсаторное снижение содержания m -кальпаина при неизменном относительно контроля уровне μ -кальпаина (см. рис. 3.5.12, 3.5.13) (в отличие от клеток стриатума, где на базовом уровне поддерживается содержание m -кальпаина, а уровень μ -кальпаина снижается, а также в отличие от последствий введения ЛПС, когда наблюдается увеличение продукции и активности кальпаинов). Любопытно, что в клетках гиппокампа мы наблюдаем повышение содержания дофамина и его метаболитов (а не снижение, как в случае введения ЛПС), что свидетельствует об интенсификации его синтеза, например, клетками голубого пятна, имеющими окончания в гиппокампе, из-за нарушения функционирования β -дофамингидроксилазы (рис. 3.5.9). Поскольку данные изменения частично купировались введением ингибитора кальпаина Cast (184-210), вероятно они были вызваны именно усилением активности кальпаинов.

К 90-му дню введения $MnCl_2$ в клетках гиппокампа, в отличие от клеток стриатума, выраженность всех выявленных ранее изменений частично снижалась. Например, уровень мРНК ИЛ-1 β хоть и превышал контрольные значения, но был значимо ниже показателя, наблюдаемого на 30-й день введения токсина, а содержание мРНК NF κ B (субъединица p65) и I κ B вообще не отличалось от показателей контрольной группы. Поскольку под контролем транскрипционного фактора NF κ B находится продукция основных цитокинов, а его активация является цитокин-зависимой, вероятно, на 90-й день после

начала введения $MnCl_2$ все адаптационные перестройки в гиппокампе уже завершены. Обращает на себя внимание тот факт, что продукция мРНК ФНО α со временем в клетках гиппокампа не изменилась. Вероятно, это связано с репаративной функцией данного цитокина [376, 377]. Сопоставление данных рис. 3.5.9 (А) и рис. 3.4.33 (А) показало, что на 90-й день введения $MnCl_2$ в клетках гиппокампа наблюдается и менее выраженный, по сравнению с 30-м днем, подъем уровня дофамина и его метаболита ДОФУК (в случае введения ЛПС мы также наблюдали нормализацию содержания дофамина), что также свидетельствует о завершении компенсаторных процессов.

Все выявленные нами последствия однократного введения субсептической дозы ЛПС и хронического введения $MnCl_2$ суммированы на рис. 4.1.- рис. 4.4.

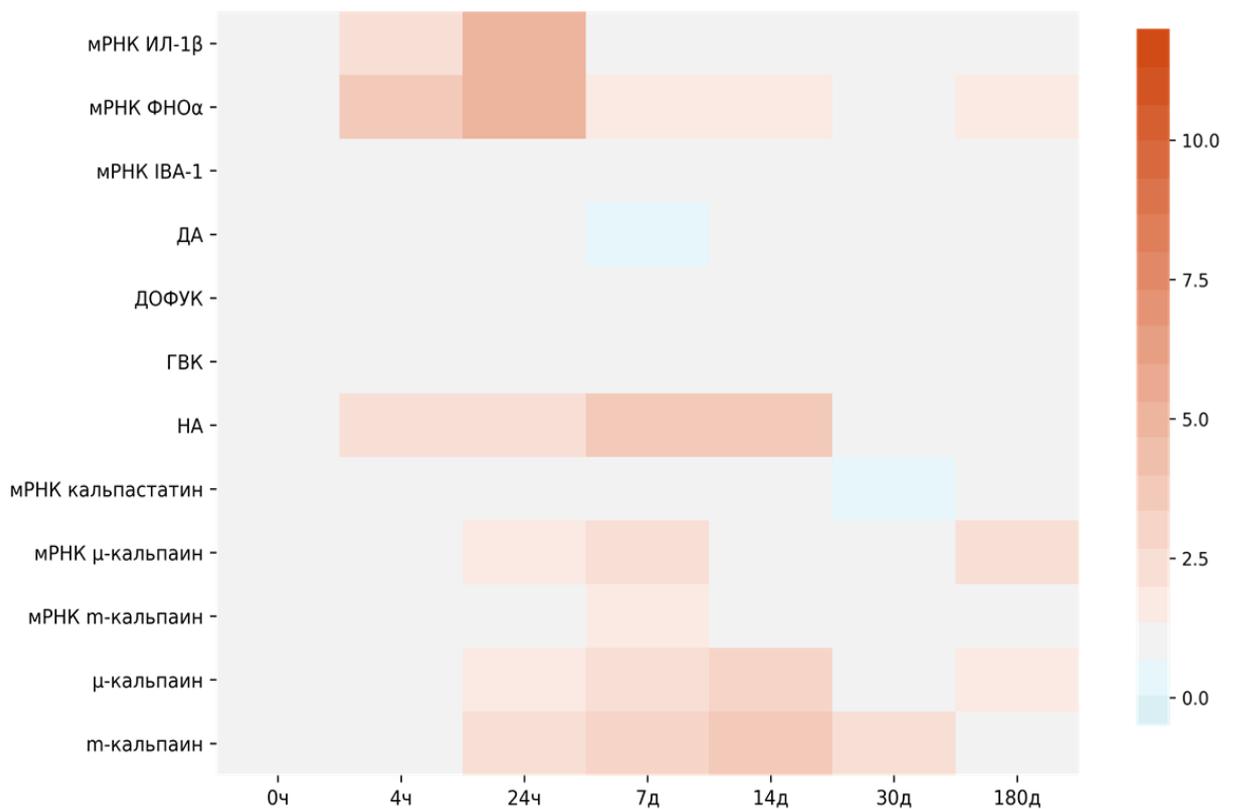


Рисунок 4.1 – Изменения в клетках гиппокампа, вызванные однократным внутрибрюшинным введением ЛПС в дозе 1 мг/кг крысам. На оси ординат (слева) обозначены изучаемые показатели, на оси абсцисс – время после воздействия; цветом представлена (согласно оси ординат справа) выраженность выявленных изменений, за единицу приняты показатели контрольной группы.

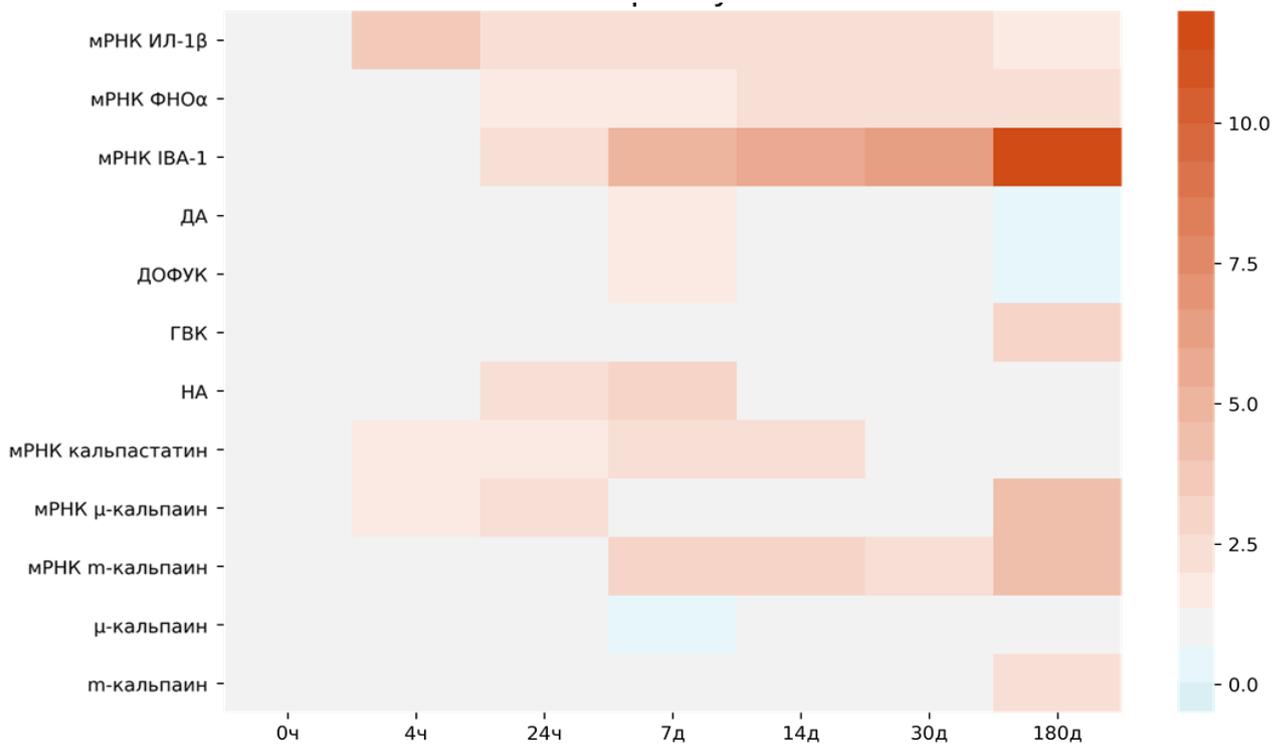


Рисунок 4.2 – Изменения в клетках стриатума, вызванные однократным внутрибрюшинным введением ЛПС в дозе 1 мг/кг крысам. На оси ординат (слева) обозначены изучаемые показатели, на оси абсцисс – время после воздействия; цветом представлена (согласно оси ординат справа) выраженность выявленных изменений, за единицу приняты показатели контрольной группы.

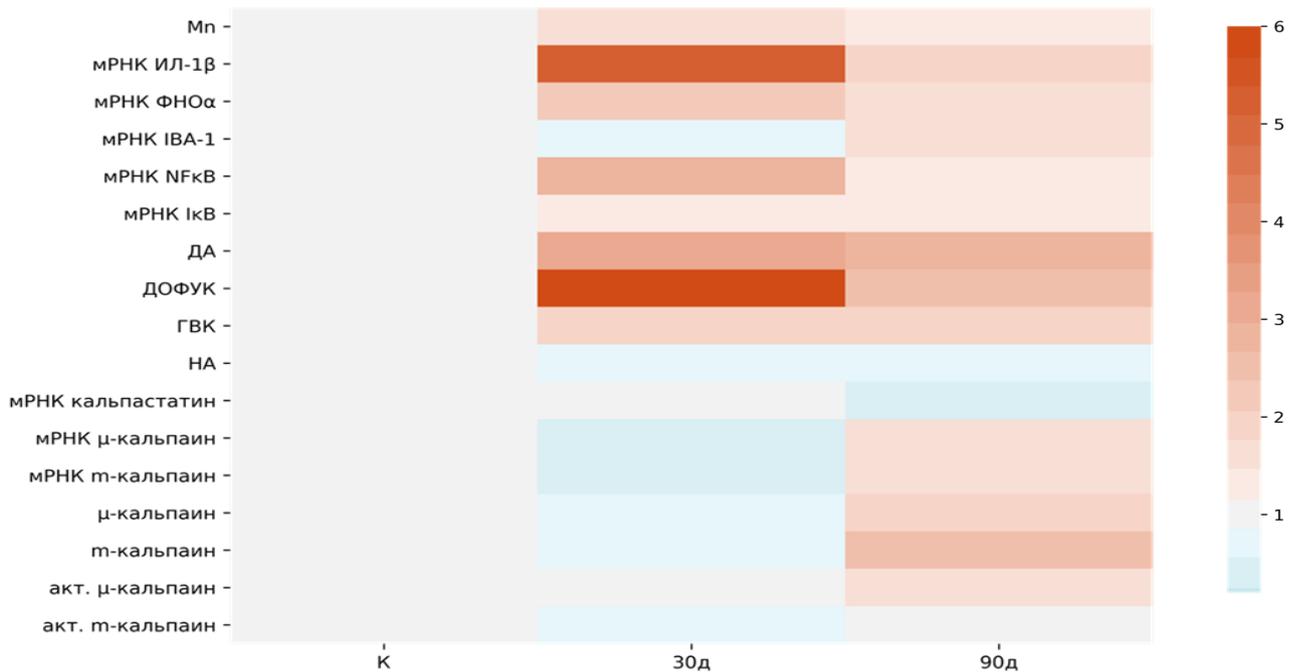


Рисунок 4.3 – Изменения в клетках гиппокампа, вызванные хроническим интраназальным введением $MnCl_2$ в дозе 1 мг/животное. На оси ординат (слева) обозначены изучаемые показатели, на оси абсцисс – время после воздействия; цветом представлена (согласно оси ординат справа) выраженность выявленных изменений, за единицу приняты показатели контрольной группы.

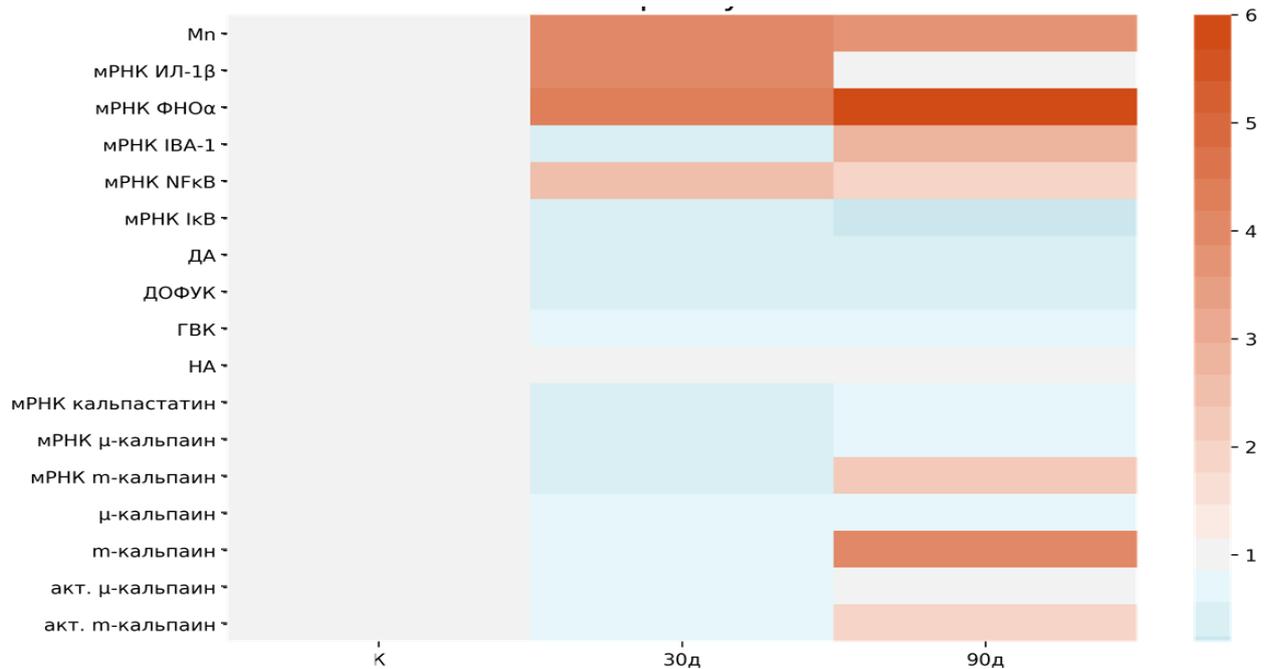


Рисунок 4.4 – Изменения в клетках стриатума, вызванные хроническим интраназальным введением $MnCl_2$ в дозе 1 мг/животное. На оси ординат (слева) обозначены изучаемые показатели, на оси абсцисс – время после воздействия; цветом представлена (согласно оси ординат справа) выраженность выявленных изменений, за единицу приняты показатели контрольной группы.

Интересно, что применение ингибитора кальпаина приводит к снижению содержания дофамина в клетках гиппокампа до нормы. Принимая во внимание тот факт, что введение мышам 3xTgAD (модель болезни Альцгеймера) ингибитора кальпаина A-705253 снижает скорость нарастания выраженности когнитивных нарушений, в том числе за счет повышения экспрессии в клетках гиппокампа транспортера ABCA1 [349], через который, по нашим данным, m-кальпаин может высвобождаться из клетки. Мы полагаем, что протективная роль ингибиторов кальпаина связана с перераспределением под его влиянием пула внутри-/внеклеточного m-кальпаина. Действительно, в клетках гиппокампа активация внесинаптических NMDA рецепторов приводит к активации внутриклеточного m-кальпаина, расщеплению им STEP-фосфатазы (striatal-enriched protein tyrosine phosphatase) и, как следствие, к смерти нервной клетки [224], а внеклеточный m-кальпаин лишается такой активности. Обращает на себя внимание еще и тот факт, что при более длительном воздействии $MnCl_2$

в клетках гиппокампа увеличивается продукция обоих кальпаинов, а активность увеличивается только у μ -кальпаина. Мы полагаем, что благодаря гиперактивации μ -кальпаина дегенеративный процесс в гиппокампе развивается с меньшей интенсивностью (как в случае воздействия на организм как ЛПС, так и $MnCl_2$). В клетках стриатума увеличивается продукция и активность исключительно m -кальпаина, что интенсифицирует течение дегенеративного процесса.

На основании этих данных мы полагаем, что при разработке схем протективной терапии, направленной на подавление активности кальпаинов, следует обратить особое внимание на ингибиторы, обладающие преимущественным действием на m -кальпаин. Действительно, нами было показано, что курсовое интраназальное введение Cast (184-210), преимущественно подавляющее активность m -кальпаина (см. рис. 3.5.1 и 3.5.2) в условиях интоксикации $MnCl_2$, в клетках гиппокампа и стриатума снижает выраженность воспалительного процесса, что проявляется в уменьшении содержания мРНК основных провоспалительных цитокинов, NF κ B и ИВА-1 (рис. 3.5.7. и 3.5.8); способствует выживаемости дофаминергических нейронов за счет нормализации содержания дофамина, его метаболитов, нормализации скорости внеклеточного метаболизма дофамина, в том числе за счет увеличения содержания тирозингидроксилазы (3.5.9 – 3.5.11); не приводит к снижению содержания марганца в анализируемых структурах мозга и не влияет на содержание мРНК и белка μ -/ m -кальпаина (рис. 3.5.6, 3.5.12, 3.5.13). Следовательно, данный ингибитор является потенциальным терапевтическим агентом способным снизить выраженность и/или подавить развитие дегенеративного процесса в ЦНР.

Нами была определена активность кальпаинов в плазме крови пациентов с заболеваниями экстрапирамидной системы (БП и ЭТ). Оказалось, что развитие БП и ЭТ характеризуется повышением активности кальпаинов в плазме крови (см. таб. 3.6.2). При БП повышение активности кальпаинов в плазме крови возрастает при переходе от ранних к развернутым стадиям

заболевания: на ранних стадиях развития БП повышение активности кальпаинов плазмы крови определяется вкладом μ -кальпаина, а на развернутых стадиях заболевания - m -кальпаином (см. рис. 3.6.1 и 3.6.5), для ЭТ такой зависимости обнаружено не было (см. рис. 3.6.1).

Нами также обнаружена положительная корреляционная зависимость между активностью кальпаинов в плазме крови и содержанием лактата, а также ИЛ-1 β (рис. 3.6.2 и 3.6.4), поэтому весьма вероятно, что увеличение активности кальпаинов в плазме крови вызвано развитием метаболических нарушений, наблюдающихся при БП (в патогенезе нейродегенеративного процесса при БП основное значение имеет нарушение протеолитической деградации белков, в частности, α -синуклеина; развитие нейровоспаления; нарушение работы митохондрий) [378, 379]. Мы полагаем, что в области повреждения активированные микроглиальные клетки секретируют провоспалительные факторы (например, ИЛ-1 β) и, вероятно, μ -/ m -кальпаины, которые способны индуцировать окислительный стресс и/или другие изменения в нейронах, ведущие к их гибели. ИЛ-1 β , а возможно, и кальпаины проходят сквозь нарушенный ГЭБ [370], попадают в кровоток, где подвергаются деградации. Однако периферический пул цитокинов/кальпаинов постоянно пополняется (по описанному выше механизму), обеспечивая повышение их содержания в крови. В пользу данного предположения свидетельствует тот факт, что в плазме крови животных с ЛПС-индуцированной нейродегенерацией (животная модель БП [380]) мы также обнаружили повышение активности кальпаинов (см. рис. 3.4.25), которое было пропорционально увеличению активности m -кальпаина в стриатарных нервных окончаниях (см. рис. 3.4.26).

В совокупности, полученные нами данные указывают на дифференциальный вклад внутриклеточных μ - и m -кальпаина в регуляцию ответных реакций клеток ЦНС на повреждающее действие: увеличение активности μ -кальпаина способствует интенсификации защитных механизмов, а m -кальпаина - переходу с начальных на развернутые стадии

дегенеративного процесса. Высвобождение кальпаинов во внеклеточную среду приводит к изменению спектра доступных им субстратов и, как следствие, вклад обеих форм кальпаинов в регуляцию адаптивных реакций клеток ЦНС, опосредуемый их способностью к ограниченному протеолизу, изменяется, в некоторых случаях даже на противоположный.

Таким образом, выявленные в данной работе закономерности позволили расширить понимание механизмов развития метаболических и функциональных изменений в ЦНС при воздействии на организм повреждающих факторов бактериальной и химической природы. Полученные знания в дальнейшем могут быть использованы для разработки терапевтических схем, позволяющих предупредить развитие патологического процесса и/или увеличить длительность переходного состояния от нормы к патологии за счет повышения адаптационного потенциала клеток ЦНС.

ВЫВОДЫ

1. Кальпаины вовлечены в регуляцию ответа клеток ЦНС на действие повреждающих факторов бактериальной и химической природы.
2. Хлорид марганца в концентрации 2 мМ и выше обладает прямым активирующим действием на μ -кальпаин; хлорид марганца (2 мМ), МФТП (0,5 мМ), 3-НПК (1 мМ) вызывают активацию m -кальпаина в нервных окончаниях (синапсосомах), ЛПС (5 мкг/мл) такого эффекта не оказывает. Подавление активности синапсосомального m -кальпаина вызывает увеличение уровня внеклеточного дофамина.
3. m -кальпаин высвобождается из нервных окончаний (синапсосом) в активной или в способной к активации форме, данный процесс является кальций-зависимым; хлорид марганца (2 мМ), МФТП (0,5 мМ) способствуют, а глибенкламид (100 мкМ) подавляет высвобождение m -кальпаина из синапсосом. Среди внеклеточных и трансмембранных белков есть потенциальные субстраты кальпаинов (матриксная металлопротеаза 2, матриксная металлопротеаза 9, внеклеточный домен D(1A) рецептора дофамина, КОМТ, MAO-B).
4. В ответ на однократное внутрибрюшинное введение крысам субсептической дозы ЛПС клетки гиппокампа и стриатума реагируют по-разному: для клеток гиппокампа характерно отсутствие «перестроек» метаболизма дофамина и повышение продукции мРНК ФНО α , сопряженное с повышением содержания и активности μ -кальпаина; в клетках стриатума наблюдаются признаки активации микроглиацитов, повышение продукции мРНК ФНО α , признаки деструкции нейронов черной субстанции, повышение содержания и активности m -кальпаина в нервных окончаниях.
5. В ответ на хроническое интраназальное введение хлорида марганца крысам происходит его преимущественное накопление в стриатуме, что вызывает развитие нейровоспаления (сопровождаемого усилением продукции мРНК ИЛ-1 β , IBA-1, NF κ B), деструкцию дофаминергических нейронов с интенсификацией внеклеточного метаболизма дофамина, сопровождающееся увеличением продукции и активности m -кальпаина. В гиппокампе, где накопление марганца значительно менее выражено, наблюдаются признаки нейровоспаления (усиление продукции мРНК ИЛ-1 β , ФНО α , IBA-1, без изменений продукции мРНК NF κ B), усиление синтеза дофамина и повышение мРНК, белка и активности исключительно μ -кальпаина.
6. На фоне интоксикации MnCl $_2$ курсовое интраназальное введение Cast (184-210) в дозе 50 мкг/кг в день нормализует походку животных, но не восстанавливает двигательную активность крыс. Защитный эффект Cast (184-210) реализуется через:
 - а) снижение выраженности воспалительного процесса в клетках гиппокампа и стриатума, что проявляется в уменьшении содержания мРНК основных провоспалительных цитокинов, NF κ B и IBA-1;

- б) нормализацию содержания дофамина и его метаболитов за счет снижения скорости внеклеточного метаболизма дофамина и увеличения содержания тирозингидроксилазы.
7. Развитие БП и ЭТ характеризуется повышением активности кальпаинов в плазме крови; при БП активность кальпаинов в плазме крови возрастает при переходе от ранних к развернутым стадиям заболевания: на ранних стадиях БП повышение активности кальпаинов плазмы крови определяется вкладом μ -кальпаина, а на развернутых - m -кальпаина.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БАВ — биологически активное вещество

БП — болезнь Паркинсона

БТШ – белки теплового шока

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

ГЭБ — гематоэнцефалический барьер

ДА - дофамин

ДОФУК – 3,4-диоксифенилуксусная кислота

ГВК - гомованилиновая кислота

ИЛ-1 β – интерлейкин -1 β

КОМТ - катехол-О-метилтрансфераза

ЛДГ — лактатдегидрогеназа

ЛПС — липополисахарид

МАО-А (В) — моноаминоксидаза типа А (В)

МФП+ — 1-метил-4-фенилпиридиния

МФТП (МРТР) — 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин

ПААГ – полиакриламидный гель

ОТ-ПЦР — обратная транскрипция, сопряженная с полимеразной цепной реакцией

ПВМ – позиционно весовая матрица

ПКГ – протеинкиназа G

ПКА – протеинкиназа A

ПКМ – протеинкиназа M

ПКС — протеинкиназа C

СКО — среднеквадратическое отклонение

СМЖ — спинномозговая жидкость

ТГ — тирозингидроксилаза
ФНО- α – фактор некроза опухоли α
ФРН – фактор роста нервов
ФРФ – фактор роста фибробластов
ЦНС – центральная нервная система
ЭТ — эссенциальный тремор
3-НПК — 3-нитропропионовая
AIF – apoptosis-inducing factor
АМРА – α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
AP-1 – activator protein 1
Bad – Bcl-2-associated death promoter
Bak – Bcl-2 homologous antagonist killer
Bax – Bcl-2-associated X protein
BDNF – brain-derived neurotrophic factor
Calpain – calcium-dependent papain like enzyme
CAM — calmodulin
CANP – calcium-activated neutral protease
CBSW – calpain-type beta-sandwich
CDK5 – cyclin-dependent kinase 5
CHO – Chinese Hamster Ovary
CSS – calpain small subunit
DAT – dopamine transporter
EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR – epidermal growth factor receptor
EGTA – ethylene glycol tetraacetic acid
ФАК – focal adhesion kinase
FITC – fluorescein isothiocyanate
FTM - Fahn-Tolosa-Marin - шкала оценки тяжести тремора

GAD – glutamate decarboxylase

GAP-43 – growth associated protein

GRIP – glutamate receptor-interacting protein

HASPB — Hydrophilic acylated surface protein B

HIF-1 α – hypoxia-inducible factor 1-alpha

JIP1 – JNK interacting protein 1

JNK-1 – c-Jun N-terminal kinases

Kd – константа диссоциации

LAMP2 – lysosomal membrane permeabilization protein 2

LTP – long-temp potentiation

MCF-7 – Michigan Cancer Foundation-7

MEF – myocyte enhancer factor

MEK/ERK

MELAS — Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes

MAP2 – microtubule-associated protein-2

MPTP – 1-methyl-4-phenylpyridinium

mTOR – mammalian target of rapamycin

NF κ B – nuclear factor κ B

NMDA – N-methyl-D-aspartate

NMDAR – N-methyl-D-aspartate receptor

NRF-1 – nuclear respiratory factor

NSC – neural stem cells

PEF – penta-EF-hand

PHLPP1 – leucine-rich repeat Protein Phosphatase 1

PSD-95 – postsynaptic density protein of 95 kDa

PTP-1B – protein-tyrosine phosphatase 1B

Rac – Rat sarcoma

RhoA – Ras homology

RIP – receptor-interacting protein

SEM- standard error of the mean, ошибка среднего

SNAP-25 – synaptosomal-associated protein of 25 kDa

SNP – single nucleotide polymorphism

Sp1 – specificity protein1

STEP-фосфатаза – striatal-enriched protein tyrosine phosphatase

SUR — sulfonylurea receptors

TLR — Toll-like receptor

TRPC1 – Transient receptor potential canonical 1

VGAT – vesicular inhibitory amino acid transporter

VGCCs каналы – voltage-gate calcium channels

XIAP – X-linked inhibitor of apoptosis protein

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Светлов П.Г. Теория критических периодов развития и ее значение для понимания принципов действия среды на онтогенез / П. Г. Светлов – Вопр. цитологии и общей физиологии. - М.: Л.: Изд-во АН СССР, 1966.– 263–274с.
2. Анохин П.К. Биология и нейрофизиология условного рефлекса: монография / П. К. Анохин – Москва: Медицина, 1968.
3. Аршавский И.А. Физиологические механизмы и закономерности индивидуального развития : Основы негэнтропийн. теории онтогенеза / И. А. Аршавский – М. : Наука, 1982.– 270с.
4. Kryzhanovskii G.N. [Disregulatory pathology]. / Kryzhanovskii G.N. // *Patologicheskaia fiziologiiia i eksperimental'naia terapiia* – № 3 – P.2–19.
5. Меерсон Ф.З. Общий механизм адаптации и профилактики / Ф. З. Меерсон – Москва : Медицина, 1973.– 360с.
6. Панин Л.Е. Энергетические аспекты адаптации / Л. Е. Панин – Ленинград : Медицина. Ленингр. отд-ние, 1978.– 191с.
7. Самойлов М.О. Мозг и адаптация молекулярно-клеточные механизмы / М. О. Самойлов – СПб. : Ин-т физиологии им. И. П. Павлова, 1999.– 272с.
8. Huesmann G.R. Dynamic role of postsynaptic caspase-3 and BIRC4 in zebra finch song-response habituation. / Huesmann G.R., Clayton D.F. // *Neuron* – 2006. – V. 52 – № 6 – P.1061–72.
9. Zubareva O.E. Behavioral, hormonal, and neurotransmitter reactions to stress in adult rats with a history of high IL-1 β content in the early postnatal ontogeny. / Zubareva O.E., Schwartz A.P., Khnychenko L.K., Ishchenko A.M., Simbirtsev A.S., Klimenko V.M. // *Bulletin of experimental biology and medicine* – 2015. – V. 158 – № 5 – P.607–10.
10. Sokolova E.S. The psychomodulatory action of subpyrogenic doses of interleukin-1beta in conditions of chronic administration to rats. / Sokolova E.S., Lyudyno V.I., Simbirtsev A.S., Klimenko V.M. // *Neuroscience and behavioral physiology* – 2007. – V. 37 – № 5 – P.499–504.

11. Gorbunova A.A. Effects of individual stressors used in a battery of “chronic unpredictable stress” on long-term plasticity in the hippocampus of juvenile rats. / Gorbunova A.A., Kudryashova I. V, Manolova A.O., Novikova M.R., Stepanichev M.Y., Gulyaeva N. V // *Acta neurobiologiae experimentalis* – 2017. – V. 77 – № 3 – P.244–253.
12. Gulyaeva N. V Caspase activity is essential for long-term potentiation. / Gulyaeva N. V, Kudryashov I.E., Kudryashova I. V // *Journal of neuroscience research* – 2003. – V. 73 – № 6 – P.853–64.
13. Gomazkov O.A. [The systems of neurochemical regulation at brain pathologies]. / Gomazkov O.A. // *Biomeditsinskaia khimiia* – V. 50 – № 4 – P.322–43.
14. Kryzhanovskii G.N. [Dysregulatory pathology of the nervous system, pathological disinhibition and mitotic catastrophe of the neuron]. / Kryzhanovskii G.N., Merkulov I.A. // *Zhurnal nevrologii i psikhiiatrii imeni S.S. Korsakova* – 2006. – V. 106 – № 7 – P.73–4.
15. Марьянович А.Т.Общая теория пептидной регуляции физиологических функций: Гематоэнцефалический барьер и эволюция связей между периферией и мозгом. / А. Т. Марьянович – СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2014.– 578с.
16. Ашмарин И.П. Регуляторные пептиды, функционально-непрерывная совокупность / Ашмарин И.П., Обухова М.. // *Биохимия*. – 1986. – Т. 51 – № 4 – P.3–8.
17. Gulyaeva N. V. Non-apoptotic functions of caspase-3 in nervous tissue. / Gulyaeva N. V. // *Biochemistry. Biokhimiia* – 2003. – V. 68 – № 11 – P.1171–80.
18. Нурмагомедова П.М. Активность нейтральной протеазы в тканях и сыворотке крови гомойотермного организма при охлаждении // Нурмагомедова П.М., Омарова М.М. // *Известия вузов. Северо-Кавказский регион естественные науки. Приложение*. – 2006. – Т. 11.
19. Немова Н.Н. Механизмы протеолитической регуляции в развитии гидробионтов / Немова Н.Н., Клявьярйнен, Е.И., Крупнова М.Ю., Бондарева

- Л.А., Богдан В.В., Мухин В.А. // ВОПРОСЫ РЫБОЛОВСТВА – 2001. – P.189–192.
20. Baudry M. Calpain-1 and Calpain-2: The Yin and Yang of Synaptic Plasticity and Neurodegeneration. / Baudry M., Bi X. // Trends in neurosciences – 2016. – V. 39 – № 4 – P.235–245.
21. Guroff G. A neutral, calcium-activated proteinase from the soluble fraction of / Guroff G. // The Journal of biological chemistry – 1964. – V. 239 – P.149–155.
22. Huston R.B. Activation of Skeletal Muscle Phosphorylase Kinase by Ca²⁺. II. Identification of the Kinase Activating Factor as a Proteolytic Enzyme / Huston R.B., Krebs E.G. // Biochemistry – 1968. – V. 7 – № 6 – P.2116–2122.
23. Murachi T. Intracellular Ca²⁺-dependent protease (CALPAIN) and its high-molecular-weight endogenous inhibitor (CALPASTATIN) / Murachi T., Tanaka K., Hatanaka M., Murakami T. // Advances in Enzyme Regulation – 1981. – V. 19 – № C – P.407–424.
24. Wheelock M.J. Evidence for two structurally different forms of skeletal muscle Ca²⁺-activated protease. / Wheelock M.J. // The Journal of biological chemistry – 1982. – V. 257 – № 21 – P.12471–4.
25. Goll D.E. The calpain system // Physiol. Rev. – 2003. – V. 83. – № 3. – 731–801c.
26. Miyake S. Gene organization of the small subunit of human calcium-activated neutral protease / Miyake S., Emori Y., Suzuki K. // Nucleic Acids Research – 1986. – V. 14 – № 22 – P.8805–8817.
27. Asangani I.A. NRF-1, and AP-1 regulate the promoter of the human calpain small subunit 1 (CAPNS1) gene. / Asangani I.A., Rasheed S.A.K., Leupold J.H., Post S., Allgayer H. // Gene – 2008. – V. 410 – № 1 – P.197–206.
28. Hata A. Transcriptional activation of the gene for the large subunit of human m-calpain by 12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. / Hata A., Ohno S., Suzuki K. // FEBS letters – 1992. – V. 304 – № 2–3 – P.241–4.
29. Cui X. A g.-1256 A>C in the promoter region of CAPN1 is associated with semen quality traits in Chinese Holstein bulls. / Cui X., Sun Y., Wang X., Yang C.,

- Ju Z., Jiang Q., Zhang Y., Huang J., Zhong J., Yin M., Wang C. // *Reproduction* (Cambridge, England) – 2016. – V. 152 – № 1 – P.101–9.
30. Li X. An association between the calpastatin (CAST) gene and keratoconus. / Li X., Bykhovskaya Y., Tang Y.G., Picornell Y., Haritunians T., Aldave A.J., Szczotka-Flynn L., Iyengar S.K., Rotter J.I., Taylor K.D., Rabinowitz Y.S. // *Cornea* – 2013. – V. 32 – № 5 – P.696–701.
31. Temel Ş.G. A novel homozygous nonsense mutation in CAST associated with PLACK syndrome. / Temel Ş.G., Karakaş B., Şeker Ü., Turkgenç B., Zorlu Ö., Sarıcaoğlu H., Oğur Ç., Kütük Ö., Kelsell D.P., Yakıcıer M.C. // *Cell and tissue research* – 2019. – V. 378 – № 2 – P.267–277.
32. Ishida S. Rat calpastatin has diverged primary sequence from other mammalian calpastatins but retains functionally important sequences. / Ishida S., Emori Y., Suzuki K. // *Biochimica et biophysica acta* – 1991. – V. 1088 – № 3 – P.436–8.
33. Tullio R. De Multiple rat brain calpastatin forms are produced by distinct starting points and alternative splicing of the N-terminal exons. / Tullio R. De, Averna M., Stifanese R., Parr T., Bardsley R.G., Pontremoli S., Melloni E. // *Archives of biochemistry and biophysics* – 2007. – V. 465 – № 1 – P.148–56.
34. Wendt A. Interaction of calpastatin with calpain: a review. / Wendt A., Thompson V.F., Goll D.E. // *Biological chemistry* – 2004. – V. 385 – № 6 – P.465–72.
35. Hosfield C.M. Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca(2+)-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. / Hosfield C.M., Elce J.S., Davies P.L., Jia Z. // *The EMBO journal* – 1999. – V. 18 – № 24 – P.6880–9.
36. Strobl S. The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. / Strobl S., Fernandez-Catalan C., Braun M., Huber R., Masumoto H., Nakagawa K., Irie A., Sorimachi H., Bourenkow G., Bartunik H., Suzuki K., Bode W. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2000. – V. 97 – № 2 – P.588–92.

37. Suzuki K. Structure, activation, and biology of calpain. / Suzuki K., Hata S., Kawabata Y., Sorimachi H. // *Diabetes* – 2004. – V. 53 Suppl 1 – P.S12-8.
38. Masumoto H. Crystallization and preliminary X-ray analysis of recombinant full-length human m-calpain. / Masumoto H., Nakagawa K., Irie S., Sorimachi H., Suzuki K., Bourenkov G.P., Bartunik H., Fernandez-Catalan C., Bode W., Strobl S. // *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* – 2000. – V. 56 – № Pt 1 – P.73–5.
39. Moldoveanu T. A Ca(2+) switch aligns the active site of calpain. / Moldoveanu T., Hosfield C.M., Lim D., Elce J.S., Jia Z., Davies P.L. // *Cell* – 2002. – V. 108 – № 5 – P.649–60.
40. Sondermann H. C2 can do it, too. / Sondermann H., Kuriyan J. // *Cell* – 2005. – V. 121 – № 2 – P.158–60.
41. Farah C.A. The role of C2 domains in PKC signaling. / Farah C.A., Sossin W.S. // *Advances in experimental medicine and biology* – 2012. – V. 740 – P.663–83.
42. Fernández-Montalván A. Electrostatic interactions of domain III stabilize the inactive conformation of mu-calpain. / Fernández-Montalván A., Assfalg-Machleidt I., Pfeiler D., Fritz H., Jochum M., Machleidt W. // *The Biochemical journal* – 2004. – V. 382 – № Pt 2 – P.607–17.
43. Campbell R.L. Structure-function relationships in calpains. / Campbell R.L., Davies P.L. // *The Biochemical journal* – 2012. – V. 447 – № 3 – P.335–51.
44. Vilei E.M. Functional properties of recombinant calpain I and of mutants lacking domains III and IV of the catalytic subunit. / Vilei E.M., Calderara S., Anagli J., Berardi S., Hitomi K., Maki M., Carafoli E. // *The Journal of biological chemistry* – 1997. – V. 272 – № 41 – P.25802–8.
45. Villalobo A. Proteins with calmodulin-like domains: structures and functional roles. / Villalobo A., González-Muñoz M., Berchtold M.W. // *Cellular and molecular life sciences : CMLS* – 2019. – V. 76 – № 12 – P.2299–2328.
46. Dennison S.R. Investigations into the membrane interactions of m-calpain domain V. / Dennison S.R., Dante S., Hauss T., Brandenburg K., Harris F.,

- Phoenix D.A. // *Biophysical journal* – 2005. – V. 88 – № 4 – P.3008–17.
47. Schád E. A novel human small subunit of calpains. / Schád E., Farkas A., Jékely G., Tompa P., Friedrich P. // *The Biochemical journal* – 2002. – V. 362 – № Pt 2 – P.383–8.
48. Friedrich P. Differential distribution of calpain small subunit 1 and 2 in rat brain. / Friedrich P., Papp H., Halasy K., Farkas A., Farkas B., Tompa P., Kása P. // *The European journal of neuroscience* – 2004. – V. 19 – № 7 – P.1819–25.
49. Maki M. A growing family of the Ca²⁺-binding proteins with five EF-hand motifs. / Maki M., Narayana S. V, Hitomi K. // *The Biochemical journal* – 1997. – V. 328 (Pt 2 – P.718–20.
50. Inomata M. Activation mechanism of calcium-activated neutral protease. Evidence for the existence of intramolecular and intermolecular autolyses. / Inomata M., Kasai Y., Nakamura M., Kawashima S. // *The Journal of biological chemistry* – 1988. – V. 263 – № 36 – P.19783–7.
51. Moldoveanu T. Calpain activation by cooperative Ca²⁺ binding at two non-EF-hand sites. / Moldoveanu T., Jia Z., Davies P.L. // *The Journal of biological chemistry* – 2004. – V. 279 – № 7 – P.6106–14.
52. Nakagawa K. Dissociation of m-calpain subunits occurs after autolysis of the N-terminus of the catalytic subunit, and is not required for activation. / Nakagawa K., Masumoto H., Sorimachi H., Suzuki K. // *Journal of biochemistry* – 2001. – V. 130 – № 5 – P.605–11.
53. Hanna R.A. Calcium-bound structure of calpain and its mechanism of inhibition by calpastatin. / Hanna R.A., Campbell R.L., Davies P.L. // *Nature* – 2008. – V. 456 – № 7220 – P.409–12.
54. Chakraborti S. Implications of calpains in health and diseases. / Chakraborti S., Alam M.N., Paik D., Shaikh S., Chakraborti T. // *Indian journal of biochemistry & biophysics* – 2012. – V. 49 – № 5 – P.316–28.
55. Cong J. The role of autolysis in activity of the Ca²⁺-dependent proteinases (mu-calpain and m-calpain). / Cong J., Goll D.E., Peterson A.M., Kapprell H.P. // *The Journal of biological chemistry* – 1989. – V. 264 – № 17 – P.10096–103.

56. Chakrabarti A.K. Regulation of brain m-calpain Ca^{2+} sensitivity by mixtures of membrane lipids: activation at intracellular Ca^{2+} level. / Chakrabarti A.K., Dasgupta S., Gadsden R.H., Hogan E.L., Banik N.L. // *Journal of neuroscience research* – 1996. – V. 44 – № 4 – P.374–80.
57. Fernández-Montalván A. Mu-calpain binds to lipid bilayers via the exposed hydrophobic surface of its Ca^{2+} -activated conformation. / Fernández-Montalván A., Assfalg-Machleidt I., Pfeiler D., Fritz H., Jochum M., Machleidt W. // *Biological chemistry* – 2006. – V. 387 – № 5 – P.617–27.
58. Hood J.L. Differential compartmentalization of the calpain/calpastatin network with the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. / Hood J.L., Brooks W.H., Roszman T.L. // *The Journal of biological chemistry* – 2004. – V. 279 – № 41 – P.43126–35.
59. Alexa A. Contribution of distinct structural elements to activation of calpain by Ca^{2+} ions. / Alexa A., Bozóky Z., Farkas A., Tompa P., Friedrich P. // *The Journal of biological chemistry* – 2004. – V. 279 – № 19 – P.20118–26.
60. Baki A. Autolysis parallels activation of mu-calpain. / Baki A., Tompa P., Alexa A., Molnár O., Friedrich P. // *The Biochemical journal* – 1996. – V. 318 (Pt 3 – P.897–901.
61. Elce J.S. Autolysis, Ca^{2+} requirement, and heterodimer stability in m-calpain. / Elce J.S., Hegadorn C., Arthur J.S. // *The Journal of biological chemistry* – 1997. – V. 272 – № 17 – P.11268–75.
62. Cottin P. Autolysis of mu- and m-calpain from bovine skeletal muscle. / Cottin P., Thompson V.F., Sathe S.K., Szpacenko A., Goll D.E. // *Biological chemistry* – 2001. – V. 382 – № 5 – P.767–76.
63. Guttman R.P. Oxidation inhibits substrate proteolysis by calpain I but not autolysis. / Guttman R.P., Elce J.S., Bell P.D., Isbell J.C., Johnson G. V // *The Journal of biological chemistry* – 1997. – V. 272 – № 3 – P.2005–12.
64. Dutt P. m-Calpain subunits remain associated in the presence of calcium. / Dutt P., Arthur J.S., Croall D.E., Elce J.S. // *FEBS letters* – 1998. – V. 436 – № 3 – P.367–71.

65. Tullio R. De Unexpected role of the L-domain of calpastatin during the autoproteolytic activation of human erythrocyte calpain. / Tullio R. De, Franchi A., Martines A., Averna M., Pedrazzi M., Melloni E., Sparatore B. // *Bioscience reports* – 2018. – V. 38 – № 2.
66. Sparatore B. A new human calpastatin skipped of the inhibitory region protects calpain-1 from inactivation and degradation. / Sparatore B., Pedrazzi M., Garuti A., Franchi A., Averna M., Ballestrero A., Tullio R. De // *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research* – 2019. – V. 1866 – № 8 – P.1260–1271.
67. Glading A. Epidermal growth factor activates m-calpain (calpain II), at least in part, by extracellular signal-regulated kinase-mediated phosphorylation. / Glading A., Bodnar R.J., Reynolds I.J., Shiraha H., Satish L., Potter D.A., Blair H.C., Wells A. // *Molecular and cellular biology* – 2004. – V. 24 – № 6 – P.2499–512.
68. Zadran S. Brain-derived neurotrophic factor and epidermal growth factor activate neuronal m-calpain via mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation. / Zadran S., Jourdi H., Rostamiani K., Qin Q., Bi X., Baudry M. // *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* – 2010. – V. 30 – № 3 – P.1086–95.
69. Smith S.D. Glutamate substitutions at a PKA consensus site are consistent with inactivation of calpain by phosphorylation. / Smith S.D., Jia Z., Huynh K.K., Wells A., Elce J.S. // *FEBS letters* – 2003. – V. 542 – № 1–3 – P.115–8.
70. Du M. Effects of phosphorylation on μ -calpain activity at different incubation temperature. / Du M., Li X., Li Z., Shen Q., Wang Y., Li G., Zhang D. // *Food research international (Ottawa, Ont.)* – 2017. – V. 100 – № Pt 2 – P.318–324.
71. Du M. Phosphorylation regulated by protein kinase A and alkaline phosphatase play positive roles in μ -calpain activity. / Du M., Li X., Li Z., Shen Q., Wang Y., Li G., Zhang D. // *Food chemistry* – 2018. – V. 252 – P.33–39.
72. Averna M. Interaction between calpain-1 and HSP90: new insights into the regulation of localization and activity of the protease. / Averna M., Tullio R. De, Pedrazzi M., Bavestrello M., Pellegrini M., Salamino F., Pontremoli S., Melloni E. // *PloS one* – 2015. – V. 10 – № 1 – P.e0116738.

73. Melloni E. Association of calpastatin with inactive calpain: a novel mechanism to control the activation of the protease? / Melloni E., Averna M., Stifanese R., Tullio R. De, Defranchi E., Salamino F., Pontremoli S. // *The Journal of biological chemistry* – 2006. – V. 281 – № 34 – P.24945–54.
74. Kent M.P. Postmortem proteolysis is reduced in transgenic mice overexpressing calpastatin. / Kent M.P., Spencer M.J., Koohmaraie M. // *Journal of animal science* – 2004. – V. 82 – № 3 – P.794–801.
75. Du M. Calpastatin inhibits the activity of phosphorylated μ -calpain in vitro. / Du M., Li X., Li Z., Shen Q., Ren C., Zhang D. // *Food chemistry* – 2019. – V. 274 – P.743–749.
76. Tompa P. Calpastatin subdomains A and C are activators of calpain. / Tompa P., Mucsi Z., Orosz G., Friedrich P. // *The Journal of biological chemistry* – 2002. – V. 277 – № 11 – P.9022–6.
77. Tullio R. De Differential degradation of calpastatin by μ - and m -calpain in $\text{Ca}(2+)$ -enriched human neuroblastoma LAN-5 cells. / Tullio R. De, Averna M., Salamino F., Pontremoli S., Melloni E. // *FEBS letters* – 2000. – V. 475 – № 1 – P.17–21.
78. Sato K. Calpain function in the modulation of signal transduction molecules. / Sato K., Kawashima S. // *Biological chemistry* – 2001. – V. 382 – № 5 – P.743–51.
79. Stabach P.R. Site-directed mutagenesis of alpha II spectrin at codon 1175 modulates its μ -calpain susceptibility. / Stabach P.R., Cianci C.D., Glantz S.B., Zhang Z., Morrow J.S. // *Biochemistry* – 1997. – V. 36 – № 1 – P.57–65.
80. DuVerle D.A. Calpain cleavage prediction using multiple kernel learning. / DuVerle D.A., Ono Y., Sorimachi H., Mamitsuka H. // *PloS one* – 2011. – V. 6 – № 5 – P.e19035.
81. Sorimachi H. Understanding the substrate specificity of conventional calpains. / Sorimachi H., Mamitsuka H., Ono Y. // *Biological chemistry* – 2012. – V. 393 – № 9 – P.853–71.
82. McCartney C.-S.E. An easy-to-use FRET protein substrate to detect calpain

- cleavage in vitro and in vivo. / McCartney C.-S.E., MacLeod J.A., Greer P.A., Davies P.L. // *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research* – 2018. – V. 1865 – № 2 – P.221–230.
83. McCartney C.-S.E. FRET-Based Assays to Determine Calpain Activity. / McCartney C.-S.E., Davies P.L. // *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* – 2019. – V. 1915 – P.39–55.
84. Cuerrier D. Determination of peptide substrate specificity for mu-calpain by a peptide library-based approach: the importance of primed side interactions. / Cuerrier D., Moldoveanu T., Davies P.L. // *The Journal of biological chemistry* – 2005. – V. 280 – № 49 – P.40632–41.
85. Shinkai-Ouchi F. Predictions of Cleavability of Calpain Proteolysis by Quantitative Structure-Activity Relationship Analysis Using Newly Determined Cleavage Sites and Catalytic Efficiencies of an Oligopeptide Array. / Shinkai-Ouchi F., Koyama S., Ono Y., Hata S., Ojima K., Shindo M., DuVerle D., Ueno M., Kitamura F., Doi N., Takigawa I., Mamitsuka H., Sorimachi H. // *Molecular & cellular proteomics : MCP* – 2016. – V. 15 – № 4 – P.1262–80.
86. Gu X. Capillary electrophoretic analysis of mu- and m-calpain using fluorescently labeled casein substrates. / Gu X., Whipple-VanPatter G., O'Dwyer M., Zeece M. // *Electrophoresis* – 2001. – V. 22 – № 11 – P.2336–42.
87. Lisa F. Di Specific degradation of troponin T and I by mu-calpain and its modulation by substrate phosphorylation. / Lisa F. Di, Tullio R. De, Salamino F., Barbato R., Melloni E., Siliprandi N., Schiaffino S., Pontremoli S. // *The Biochemical journal* – 1995. – V. 308 (Pt 1 – P.57–61.
88. Morford L.A. Calpain II colocalizes with detergent-insoluble rafts on human and Jurkat T-cells. / Morford L.A., Forrest K., Logan B., Overstreet L.K., Goebel J., Brooks W.H., Roszman T.L. // *Biochemical and biophysical research communications* – 2002. – V. 295 – № 2 – P.540–6.
89. Bartoli M. Calpains in muscle wasting. / Bartoli M., Richard I. // *The international journal of biochemistry & cell biology* – 2005. – V. 37 – № 10 – P.2115–33.

90. Ma X. Differential activation of the calpain system involved in individualized adaptation of different fast-twitch muscles in hibernating Daurian ground squirrels. / Ma X., Chang H., Wang Z., Xu S., Peng X., Zhang J., Yan X., Lei T., Wang H., Gao Y. // *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985) – 2019. – V. 127 – № 2 – P.328–341.
91. Takano J. Vital role of the calpain-calpastatin system for placental-integrity-dependent embryonic survival. / Takano J., Mihira N., Fujioka R., Hosoki E., Chishti A.H., Saido T.C. // *Molecular and cellular biology* – 2011. – V. 31 – № 19 – P.4097–106.
92. Li J. Regional differences in gene expression for calcium activated neutral proteases (calpains) and their endogenous inhibitor calpastatin in mouse brain and spinal cord. / Li J., Grynspan F., Berman S., Nixon R., Bursztajn S. // *Journal of neurobiology* – 1996. – V. 30 – № 2 – P.177–91.
93. Goto K. Localization of mRNAs for calpain and calpastatin in the adult rat brain by in situ hybridization histochemistry. / Goto K., Iwamoto T., Kondo H. // *Brain research. Molecular brain research* – 1994. – V. 23 – № 1–2 – P.40–6.
94. Shields D.C. Calpain expression varies among different rat and bovine central nervous system regions. / Shields D.C., Ray S.K., Gantt-Wilford G., Banik N.L. // *Journal of neuroscience research* – 1998. – V. 53 – № 4 – P.482–9.
95. Li Y. Calpain 1 and Calpastatin expression is developmentally regulated in rat brain. / Li Y., Bondada V., Joshi A., Geddes J.W. // *Experimental neurology* – 2009. – V. 220 – № 2 – P.316–9.
96. Perlmutter L.S. Distribution of calcium-activated protease calpain in the rat brain. / Perlmutter L.S., Gall C., Baudry M., Lynch G. // *The Journal of comparative neurology* – 1990. – V. 296 – № 2 – P.269–76.
97. Baudry M. Learning and memory: an emergent property of cell motility. / Baudry M., Bi X. // *Neurobiology of learning and memory* – 2013. – V. 104 – P.64–72.
98. Dong Z. Long-term potentiation decay and memory loss are mediated by AMPAR endocytosis. / Dong Z., Han H., Li H., Bai Y., Wang W., Tu M., Peng Y.,

- Zhou L., He W., Wu X., Tan T., Liu M., Wu X., Zhou W., Jin W., Zhang S., Sacktor T.C., Li T., Song W., Wang Y.T. // *The Journal of clinical investigation* – 2015. – V. 125 – № 1 – P.234–47.
99. Gil-Parrado S. Subcellular localization and in vivo subunit interactions of ubiquitous mu-calpain. / Gil-Parrado S., Popp O., Knoch T.A., Zahler S., Bestvater F., Felgenträger M., Holloschi A., Fernández-Montalván A., Auerswald E.A., Fritz H., Fuentes-Prior P., Machleidt W., Spiess E. // *The Journal of biological chemistry* – 2003. – V. 278 – № 18 – P.16336–46.
100. Rock M.T. Calcium-dependent signaling pathways in T cells. Potential role of calpain, protein tyrosine phosphatase 1b, and p130Cas in integrin-mediated signaling events. / Rock M.T., Brooks W.H., Roszman T.L. // *The Journal of biological chemistry* – 1997. – V. 272 – № 52 – P.33377–83.
101. Duquette P.M. The calcium-activated protease calpain regulates netrin-1 receptor deleted in colorectal cancer-induced axon outgrowth in cortical neurons. / Duquette P.M., Lamarche-Vane N. // *Journal of neurochemistry* – 2020. – V. 152 – № 3 – P.315–332.
102. Hood J.L. Association of the calpain/calpastatin network with subcellular organelles. / Hood J.L., Logan B.B., Sinai A.P., Brooks W.H., Roszman T.L. // *Biochemical and biophysical research communications* – 2003. – V. 310 – № 4 – P.1200–12.
103. Hood J.L. Subcellular mobility of the calpain/calpastatin network: an organelle transient. / Hood J.L., Brooks W.H., Roszman T.L. // *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* – 2006. – V. 28 – № 8 – P.850–9.
104. Tavares A. Demonstration of three calpains in the matrix of rat liver mitochondria. / Tavares A., Duque-Magalhães M.C. // *Biomedica biochimica acta* – 1991. – V. 50 – № 4–6 – P.523–9.
105. Joshi A. Mitochondrial micro-calpain is not involved in the processing of apoptosis-inducing factor. / Joshi A., Bondada V., Geddes J.W. // *Experimental neurology* – 2009. – V. 218 – № 2 – P.221–7.

106. Cao T. Increased calpain-1 in mitochondria induces dilated heart failure in mice: role of mitochondrial superoxide anion. / Cao T., Fan S., Zheng D., Wang G., Yu Y., Chen R., Song L.-S., Fan G.-C., Zhang Z., Peng T. // *Basic research in cardiology* – 2019. – V. 114 – № 3 – P.17.
107. Ozaki T. Mitochondrial m-calpain plays a role in the release of truncated apoptosis-inducing factor from the mitochondria. / Ozaki T., Yamashita T., Ishiguro S.-I. // *Biochimica et biophysica acta* – 2009. – V. 1793 – № 12 – P.1848–59.
108. Shintani-Ishida K. Mitochondrial m-calpain opens the mitochondrial permeability transition pore in ischemia-reperfusion. / Shintani-Ishida K., Yoshida K.-I. // *International journal of cardiology* – 2015. – V. 197 – P.26–32.
109. Ozaki T. Characteristics of mitochondrial calpains. / Ozaki T., Tomita H., Tamai M., Ishiguro S.-I. // *Journal of biochemistry* – 2007. – V. 142 – № 3 – P.365–76.
110. Kar P. Submitochondrial localization of associated mu-calpain and calpastatin. / Kar P., Chakraborti T., Samanta K., Chakraborti S. // *Archives of biochemistry and biophysics* – 2008. – V. 470 – № 2 – P.176–86.
111. Kosenko E. Subcellular compartmentalization of proteolytic enzymes in brain regions and the effects of chronic β -amyloid treatment. / Kosenko E., Poghosyan A., Kaminsky Y. // *Brain research* – 2011. – V. 1369 – P.184–93.
112. Deshpande R. V Calpain secreted by activated human lymphoid cells degrades myelin. / Deshpande R. V, Goust J.M., Hogan E.L., Banik N.L. // *Journal of neuroscience research* – 1995. – V. 42 – № 2 – P.259–65.
113. Xu L. Tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone induces phosphorylation of mu- and m-calpain in association with increased secretion, cell migration, and invasion. / Xu L., Deng X. // *The Journal of biological chemistry* – 2004. – V. 279 – № 51 – P.53683–90.
114. Levesque S. Reactive microgliosis: extracellular micro-calpain and microglia-mediated dopaminergic neurotoxicity. / Levesque S., Wilson B., Gregoria V., Thorpe L.B., Dallas S., Polikov V.S., Hong J.-S., Block M.L. // *Brain : a journal of*

neurology – 2010. – V. 133 – № Pt 3 – P.808–21.

115. Fushimi K. Implication of prostaglandin E(2) in TNF-alpha-induced release of m-calpain from HCS-2/8 chondrocytes. Inhibition of m-calpain release by NSAIDs. / Fushimi K., Nakashima S., Banno Y., Akaike A., Takigawa M., Shimizu K. // Osteoarthritis and cartilage – 2004. – V. 12 – № 11 – P.895–903.

116. Nishihara H. Matrix vesicles and media vesicles as nonclassical pathways for the secretion of m-Calpain from MC3T3-E1 cells. / Nishihara H., Nakagawa Y., Ishikawa H., Ohba M., Shimizu K., Nakamura T. // Biochemical and biophysical research communications – 2001. – V. 285 – № 3 – P.845–53.

117. Perez J. Calpains Released by T Lymphocytes Cleave TLR2 To Control IL-17 Expression. / Perez J., Dansou B., Hervé R., Levi C., Tamouza H., Vandermeersch S., Demey-Thomas E., Haymann J.-P., Zafrani L., Klatzmann D., Boissier M.-C., Letavernier E., Baud L. // Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) – 2016. – V. 196 – № 1 – P.168–81.

118. Fukui I. Extracellular appearance of calpain and calpastatin in the synovial fluid of the knee joint. / Fukui I., Tanaka K., Murachi T. // Biochemical and biophysical research communications – 1989. – V. 162 – № 2 – P.559–66.

119. Mortensen A.M. Dynamic changes in the distribution of the calcium-activated neutral protease in human red blood cells following cellular insult and altered Ca²⁺ homeostasis. / Mortensen A.M., Novak R.F. // Toxicology and applied pharmacology – 1992. – V. 117 – № 2 – P.180–8.

120. Laske C. Increased cerebrospinal fluid calpain activity and microparticle levels in Alzheimer's disease. / Laske C., Stellos K., Kempter I., Stransky E., Maetzler W., Fleming I., Randriamboavonjy V. // Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association – 2015. – V. 11 – № 5 – P.465–74.

121. Huttenlocher A. Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain. / Huttenlocher A., Palecek S.P., Lu Q., Zhang W., Mellgren R.L., Lauffenburger D.A., Ginsberg M.H., Horwitz A.F. // The Journal of biological chemistry – 1997. – V. 272 – № 52 – P.32719–22.

122. Flevaris P. A molecular switch that controls cell spreading and retraction. /

Flevaris P., Stojanovic A., Gong H., Chishti A., Welch E., Du X. // *The Journal of cell biology* – 2007. – V. 179 – № 3 – P.553–65.

123. Dourdin N. Reduced cell migration and disruption of the actin cytoskeleton in calpain-deficient embryonic fibroblasts. / Dourdin N., Bhatt A.K., Dutt P., Greer P.A., Arthur J.S., Elce J.S., Huttenlocher A. // *The Journal of biological chemistry* – 2001. – V. 276 – № 51 – P.48382–8.

124. Croce K. Inhibition of calpain blocks platelet secretion, aggregation, and spreading. / Croce K., Flaumenhaft R., Rivers M., Furie B., Furie B.C., Herman I.M., Potter D.A. // *The Journal of biological chemistry* – 1999. – V. 274 – № 51 – P.36321–7.

125. Randriamboavonjy V. The role of calpain in diabetes-associated platelet hyperactivation. / Randriamboavonjy V., Fleming I. // *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)* – 2010. – V. 59 – P.235–57.

126. Carragher N.O. Degraded collagen fragments promote rapid disassembly of smooth muscle focal adhesions that correlates with cleavage of pp125(FAK), paxillin, and talin. / Carragher N.O., Levkau B., Ross R., Raines E.W. // *The Journal of cell biology* – 1999. – V. 147 – № 3 – P.619–30.

127. Farmer L.K. TRPC6 Binds to and Activates Calpain, Independent of Its Channel Activity, and Regulates Podocyte Cytoskeleton, Cell Adhesion, and Motility. / Farmer L.K., Rollason R., Whitcomb D.J., Ni L., Goodliff A., Lay A.C., Birnbaumer L., Heesom K.J., Xu S.-Z., Saleem M.A., Welsh G.I. // *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* – 2019. – V. 30 – № 10 – P.1910–1924.

128. Calle Y. Inhibition of calpain stabilises podosomes and impairs dendritic cell motility. / Calle Y., Carragher N.O., Thrasher A.J., Jones G.E. // *Journal of cell science* – 2006. – V. 119 – № Pt 11 – P.2375–85.

129. Parnaud G. Inhibition of calpain blocks pancreatic beta-cell spreading and insulin secretion. / Parnaud G., Hammar E., Rouiller D.G., Bosco D. // *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* – 2005. – V. 289 – № 2 – P.E313-21.

130. Robles E. Filopodial calcium transients regulate growth cone motility and

- guidance through local activation of calpain / Robles E., Huttenlocher A., Gomez T.M. // *Neuron* – 2003. – V. 38 – № 4 – P.597–609.
131. Kerstein P.C. Mechanosensitive TRPC1 channels promote calpain proteolysis of talin to regulate spinal axon outgrowth. / Kerstein P.C., Jacques-Fricke B.T., Rengifo J., Mogen B.J., Williams J.C., Gottlieb P.A., Sachs F., Gomez T.M. // *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* – 2013. – V. 33 – № 1 – P.273–85.
132. Kerstein P.C. Calpain-Mediated Proteolysis of Talin and FAK Regulates Adhesion Dynamics Necessary for Axon Guidance. / Kerstein P.C., Patel K.M., Gomez T.M. // *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* – 2017. – V. 37 – № 6 – P.1568–1580.
133. Rock M.T. Beta1 integrin-mediated T cell adhesion and cell spreading are regulated by calpain. / Rock M.T., Dix A.R., Brooks W.H., Roszman T.L. // *Experimental cell research* – 2000. – V. 261 – № 1 – P.260–70.
134. Trager N. The Involvement of Calpain in CD4+ T Helper Cell Bias in Multiple Sclerosis. / Trager N., Butler J.T., Haque A., Ray S.K., Beeson C., Banik N.L. // *Journal of clinical & cellular immunology* – 2013. – V. 4 – № 4 – P.1000153.
135. Butler J.T. Involvement of calpain in the process of Jurkat T cell chemotaxis. / Butler J.T., Samantaray S., Beeson C.C., Ray S.K., Banik N.L. // *Journal of neuroscience research* – 2009. – V. 87 – № 3 – P.626–35.
136. Mikosik A. Roles of calpain-calpastatin system (CCS) in human T cell activation. / Mikosik A., Jasiulewicz A., Daca A., Henc I., Frąckowiak J.E., Ruckemann-Dziurdzińska K., Foerster J., Page A. Le, Bryl E., Fulop T., Witkowski J.M. // *Oncotarget* – 2016. – V. 7 – № 47 – P.76479–76495.
137. Lokuta M. a Calpain regulates neutrophil chemotaxis. / Lokuta M. a, Nuzzi P. a, Huttenlocher a // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2003. – V. 100 – № 7 – P.4006–11.
138. Nuzzi P.A. Asymmetric localization of calpain 2 during neutrophil chemotaxis. / Nuzzi P.A., Senetar M.A., Huttenlocher A. // *Molecular biology of the cell* – 2007. – V. 18 – № 3 – P.795–805.

139. Ishak R. Defective rapid cell shape and transendothelial migration by calpain-1 null neutrophils. / Ishak R., Hallett M.B. // *Biochemical and biophysical research communications* – 2018. – V. 506 – № 4 – P.1065–1070.
140. Potter D.A. Calpain regulates actin remodeling during cell spreading. / Potter D.A., Tirnauer J.S., Janssen R., Croall D.E., Hughes C.N., Fiacco K.A., Mier J.W., Maki M., Herman I.M. // *The Journal of cell biology* – 1998. – V. 141 – № 3 – P.647–62.
141. Perrin B.J. Proteolysis of cortactin by calpain regulates membrane protrusion during cell migration. / Perrin B.J., Amann K.J., Huttenlocher A. // *Molecular biology of the cell* – 2006. – V. 17 – № 1 – P.239–50.
142. Undyala V. V The calpain small subunit regulates cell-substrate mechanical interactions during fibroblast migration. / Undyala V. V, Dembo M., Cembrola K., Perrin B.J., Huttenlocher A., Elce J.S., Greer P.A., Wang Y.-L., Beningo K.A. // *Journal of cell science* – 2008. – V. 121 – № Pt 21 – P.3581–8.
143. Lane R.D. A comparison of the intracellular distribution of mu-calpain, m-calpain, and calpastatin in proliferating human A431 cells. / Lane R.D., Allan D.M., Mellgren R.L. // *Experimental cell research* – 1992. – V. 203 – № 1 – P.5–16.
144. Mellgren R.L. Isolation of a Chinese hamster ovary cell clone possessing decreased mu-calpain content and a reduced proliferative growth rate. / Mellgren R.L., Lu Q., Zhang W., Lakkis M., Shaw E., Mericle M.T. // *The Journal of biological chemistry* – 1996. – V. 271 – № 26 – P.15568–74.
145. Zhang W. Inhibition of the growth of WI-38 fibroblasts by benzyloxycarbonyl-Leu-Leu-Tyr diazomethyl ketone: evidence that cleavage of p53 by a calpain-like protease is necessary for G1 to S-phase transition. / Zhang W., Lu Q., Xie Z.J., Mellgren R.L. // *Oncogene* – 1997. – V. 14 – № 3 – P.255–63.
146. Choi Y.H. Regulation of cyclin D1 by calpain protease. / Choi Y.H., Lee S.J., Nguyen P., Jang J.S., Lee J., Wu M.L., Takano E., Maki M., Henkart P.A., Trepel J.B. // *The Journal of biological chemistry* – 1997. – V. 272 – № 45 – P.28479–84.
147. Carragher N.O. v-Src-induced modulation of the calpain-calpastatin

- proteolytic system regulates transformation. / Carragher N.O., Westhoff M.A., Riley D., Potter D.A., Dutt P., Elce J.S., Greer P.A., Frame M.C. // *Molecular and cellular biology* – 2002. – V. 22 – № 1 – P.257–69.
148. Langenfeld J. Posttranslational regulation of cyclin D1 by retinoic acid: a chemoprevention mechanism. / Langenfeld J., Kiyokawa H., Sekula D., Boyle J., Dmitrovsky E. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 1997. – V. 94 – № 22 – P.12070–4.
149. Joy J. Identification of calpain cleavage sites in the G1 cyclin-dependent kinase inhibitor p19(INK4d). / Joy J., Nalabothula N., Ghosh M., Popp O., Jochum M., Machleidt W., Gil-Parrado S., Holak T.A. // *Biological chemistry* – 2006. – V. 387 – № 3 – P.329–35.
150. Jánossy J. Calpain as a multi-site regulator of cell cycle. / Jánossy J., Ubezio P., Apáti A., Magócsi M., Tompa P., Friedrich P. // *Biochemical pharmacology* – 2004. – V. 67 – № 8 – P.1513–21.
151. Lin C.-C. Crude extract of *Rheum palmatum* L. Induces cell cycle arrest S phase and apoptosis through mitochondrial-dependent pathways in U-2 OS human osteosarcoma cells. / Lin C.-C., Lee M.-H., Lin J.-H., Lin M.-L., Chueh F.-S., Yu C.-C., Lin J.-P., Chou Y.-C., Hsu S.-C., Chung J.-G. // *Environmental toxicology* – 2016. – V. 31 – № 8 – P.957–69.
152. Xu F. Calpain-2 Enhances Non-Small Cell Lung Cancer Progression and Chemoresistance to Paclitaxel via EGFR-pAKT Pathway. / Xu F., Gu J., Lu C., Mao W., Wang L., Zhu Q., Liu Z., Chu Y., Liu R., Ge D. // *International journal of biological sciences* – 2019. – V. 15 – № 1 – P.127–137.
153. Li P. Silencing CAPN2 Expression Inhibited Castration-Resistant Prostate Cancer Cells Proliferation and Invasion via AKT/mTOR Signal Pathway. / Li P., Miao C., Liang C., Shao P., Wang Z., Li J. // *BioMed research international* – 2017. – V. 2017 – P.2593674.
154. Ben-Aharon I. Expression and immunolocalization of the calpain-calpastatin system in the human oocyte. / Ben-Aharon I., Ben-Yosef D., Amit A., Shalgi R. // *Fertility and sterility* – 2005. – V. 83 – № 6 – P.1807–13.

155. Ben-Aharon I. Expression and possible involvement of calpain isoforms in mammalian egg activation. / Ben-Aharon I., Haim K., Shalgi R., Ben-Yosef D. // *Reproduction (Cambridge, England)* – 2005. – V. 130 – № 2 – P.165–75.
156. Ben-Aharon I. The expression of calpain 1 and calpain 2 in spermatogenic cells and spermatozoa of the mouse. / Ben-Aharon I., Brown P.R., Etkovitz N., Eddy E.M., Shalgi R. // *Reproduction (Cambridge, England)* – 2005. – V. 129 – № 4 – P.435–42.
157. Haim K. Expression and immunolocalization of the calpain-calpastatin system during parthenogenetic activation and fertilization in the rat egg. / Haim K., Ben-Aharon I., Shalgi R. // *Reproduction (Cambridge, England)* – 2006. – V. 131 – № 1 – P.35–43.
158. Nakamura M. Replacement of m-calpain by mu-calpain during maturation of megakaryocytes and possible involvement in platelet formation. / Nakamura M., Mori M., Nakazawa S., Tange T., Hayashi M., Saito Y., Kawashima S. // *Thrombosis research* – 1992. – V. 66 – № 6 – P.757–64.
159. Pintér M. Calpeptin, a calpain inhibitor, promotes neurite elongation in differentiating PC12 cells. / Pintér M., Aszódi A., Friedrich P., Ginzburg I. // *Neuroscience letters* – 1994. – V. 170 – № 1 – P.91–3.
160. Liang Y.-C. Involvement of mu- and m-calpains and protein kinase C isoforms in L8 myoblast differentiation. / Liang Y.-C., Yeh J.-Y., Forsberg N.E., Ou B.-R. // *The international journal of biochemistry & cell biology* – 2006. – V. 38 – № 4 – P.662–70.
161. Miyazaki T. Endothelial calpain systems orchestrate myofibroblast differentiation during wound healing. / Miyazaki T., Haraguchi S., Kim-Kaneyama J.-R., Miyazaki A. // *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* – 2019. – V. 33 – № 2 – P.2037–2046.
162. Zhang H. Calpain-2/p35-p25/Cdk5 pathway is involved in the neuronal apoptosis induced by polybrominated diphenyl ether-153. / Zhang H., Chang L., Zhang H., Nie J., Zhang Z., Yang X., Vuong A.M., Wang Z., Chen A., Niu Q. //

Toxicology letters – 2017. – V. 277 – P.41–53.

163. Shu Y. Wnt-5a Promotes Neural Development and Differentiation by Regulating CDK5 via Ca²⁺/Calpain Pathway. / Shu Y., Xiang M., Zhang P., Qi G., He F., Zhang Q., Zhang Z., Lv Z., Peng X., Cai H., Tian B. // Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology – 2018. – V. 51 – № 6 – P.2604–2615.

164. Liu Y. Calcium influx through L-type channels generates protein kinase M to induce burst firing of dopamine cells in the rat ventral tegmental area. / Liu Y., Dore J., Chen X. // The Journal of biological chemistry – 2007. – V. 282 – № 12 – P.8594–603.

165. Oda A. pp60src is an endogenous substrate for calpain in human blood platelets. / Oda A., Druker B.J., Ariyoshi H., Smith M., Salzman E.W. // The Journal of biological chemistry – 1993. – V. 268 – № 17 – P.12603–8.

166. Zhang Y. Protein Phosphotyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) in Calpain-dependent Feedback Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR2) in Endothelial Cells: IMPLICATIONS IN VEGF-DEPENDENT ANGIOGENESIS AND DIABETIC WOUND HEALING. / Zhang Y., Li Q., Youn J.Y., Cai H. // The Journal of biological chemistry – 2017. – V. 292 – № 2 – P.407–416.

167. Goff E. Le Characterization of L-plastin interaction with beta integrin and its regulation by micro-calpain. / Goff E. Le, Vallentin A., Harmand P.-O., Aldrian-Herrada G., Rebière B., Roy C., Benyamin Y., Lebart M.-C. // Cytoskeleton (Hoboken, N.J.) – 2010. – V. 67 – № 5 – P.286–96.

168. Salimi R. Blocking the Cleavage of Filamin A by Calpain Inhibitor Decreases Tumor Cell Growth. / Salimi R., Bandaru S., Devarakonda S., Gökalp S., Ala C., Alvandian A., Yener N., Akyürek L.M. // Anticancer research – 2018. – V. 38 – № 4 – P.2079–2085.

169. Zheng X. Hypoxia-induced and calpain-dependent cleavage of filamin A regulates the hypoxic response. / Zheng X., Zhou A.-X., Rouhi P., Uramoto H.,

- Borén J., Cao Y., Pereira T., Akyürek L.M., Poellinger L. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – 2014. – V. 111 – № 7 – P.2560–5.
170. Kulkarni S. Calpain cleaves RhoA generating a dominant-negative form that inhibits integrin-induced actin filament assembly and cell spreading. / Kulkarni S., Goll D.E., Fox J.E.B. // The Journal of biological chemistry – 2002. – V. 277 – № 27 – P.24435–41.
171. Briz V. Activity-dependent rapid local RhoA synthesis is required for hippocampal synaptic plasticity. / Briz V., Zhu G., Wang Y., Liu Y., Avetisyan M., Bi X., Baudry M. // The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience – 2015. – V. 35 – № 5 – P.2269–82.
172. Chua B.T. Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. / Chua B.T., Guo K., Li P. // The Journal of biological chemistry – 2000. – V. 275 – № 7 – P.5131–5.
173. Blomgren K. Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of “pathological apoptosis”? / Blomgren K., Zhu C., Wang X., Karlsson J.O., Leverin A.L., Bahr B.A., Mallard C., Hagberg H. // The Journal of biological chemistry – 2001. – V. 276 – № 13 – P.10191–8.
174. Hosseini M. Calpains: Diverse Functions but Enigmatic. / Hosseini M., Najmabadi H., Kahrizi K. // Archives of Iranian medicine – 2018. – V. 21 – № 4 – P.170–179.
175. Wang K.K. Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis. / Wang K.K., Posmantur R., Nadimpalli R., Nath R., Mohan P., Nixon R.A., Talanian R. V, Keegan M., Herzog L., Allen H. // Archives of biochemistry and biophysics – 1998. – V. 356 – № 2 – P.187–96.
176. Chen Y. [Calpain-I, calpastatin, caspase-3 and apoptosis in the human left atrium in rheumatic atrial fibrillation]. / Chen Y., Wang L., Su X., Tao L., Chen X. // Zhonghua xin xue guan bing za zhi – 2006. – V. 34 – № 4 – P.303–7.
177. Moretti D. Calpains and cancer: friends or enemies? / Moretti D., Bello B. Del, Allavena G., Maellaro E. // Archives of biochemistry and biophysics – 2014.

– V. 564 – P.26–36.

178. Łopatniuk P. Conventional calpains and programmed cell death. / Łopatniuk P., Witkowski J.M. // *Acta biochimica Polonica* – 2011. – V. 58 – № 3 – P.287–96.

179. Cao X. Cleavage of Bax to p18 Bax accelerates stress-induced apoptosis, and a cathepsin-like protease may rapidly degrade p18 Bax. / Cao X., Deng X., May W.S. // *Blood* – 2003. – V. 102 – № 7 – P.2605–14.

180. Mandic A. Calpain-mediated Bid cleavage and calpain-independent Bak modulation: two separate pathways in cisplatin-induced apoptosis. / Mandic A., Viktorsson K., Strandberg L., Heiden T., Hansson J., Linder S., Shoshan M.C. // *Molecular and cellular biology* – 2002. – V. 22 – № 9 – P.3003–13.

181. Liu L. Calpain-mediated pathway dominates cisplatin-induced apoptosis in human lung adenocarcinoma cells as determined by real-time single cell analysis. / Liu L., Xing D., Chen W.R., Chen T., Pei Y., Gao X. // *International journal of cancer* – 2008. – V. 122 – № 10 – P.2210–22.

182. Rami A. Synergetic effects of caspase 3 and mu-calpain in XIAP-breakdown upon focal cerebral ischemia. / Rami A., Agarwal R., Spahn A. // *Neurochemical research* – 2007. – V. 32 – № 12 – P.2072–9.

183. Huang W. Decreased calpain activity in chronic myeloid leukemia impairs apoptosis by increasing survivin in myeloid progenitors and xiap1 in differentiating granulocytes. / Huang W., Bei L., Hjort E.E., Eklund E.A. // *Oncotarget* – 2017. – V. 8 – № 31 – P.50629–50641.

184. Bello B. Del Cross-talk between calpain and caspase-3/-7 in cisplatin-induced apoptosis of melanoma cells: a major role of calpain inhibition in cell death protection and p53 status. / Bello B. Del, Moretti D., Gamberucci A., Maellaro E. // *Oncogene* – 2007. – V. 26 – № 19 – P.2717–26.

185. Ma J.-Q. Protective effect of rutin against carbon tetrachloride-induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in mouse kidney associated with the ceramide, MAPKs, p53 and calpain activities. / Ma J.-Q., Liu C.-M., Yang W. // *Chemico-biological interactions* – 2018. – V. 286 – P.26–33.

186. Atencio I.A. Calpain inhibitor 1 activates p53-dependent apoptosis in tumor

- cell lines. / Atencio I.A., Ramachandra M., Shabram P., Demers G.W. // *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* – 2000. – V. 11 – № 5 – P.247–53.
187. Neumar R.W. Cross-talk between calpain and caspase proteolytic systems during neuronal apoptosis. / Neumar R.W., Xu Y.A., Gada H., Guttmann R.P., Siman R. // *The Journal of biological chemistry* – 2003. – V. 278 – № 16 – P.14162–7.
188. Lu T. Participation of the conventional calpains in apoptosis. / Lu T., Xu Y., Mericle M.T., Mellgren R.L. // *Biochimica et biophysica acta* – 2002. – V. 1590 – № 1–3 – P.16–26.
189. Baudry M. Calpain-1 and Calpain-2 in the Brain: Dr. Jekyll and Mr Hyde? / Baudry M. // *Current neuropharmacology* – 2019. – V. 17 – № 9 – P.823–829.
190. Cheng S.-Y. Regulatory role of calpain in neuronal death. / Cheng S.-Y., Wang S.-C., Lei M., Wang Z., Xiong K. // *Neural regeneration research* – 2018. – V. 13 – № 3 – P.556–562.
191. Chemaly E.R. SERCA control of cell death and survival. / Chemaly E.R., Troncone L., Lebeche D. // *Cell calcium* – 2018. – V. 69 – P.46–61.
192. Imai T. Protective effect of S-allyl-L-cysteine against endoplasmic reticulum stress-induced neuronal death is mediated by inhibition of calpain. / Imai T., Kosuge Y., Endo-Umeda K., Miyagishi H., Ishige K., Makishima M., Ito Y. // *Amino acids* – 2014. – V. 46 – № 2 – P.385–93.
193. Boehmerle W. Salinomycin induces calpain and cytochrome c-mediated neuronal cell death. / Boehmerle W., Endres M. // *Cell death & disease* – 2011. – V. 2 – P.e168.
194. Yamada K.H. Targeted gene inactivation of calpain-1 suppresses cortical degeneration due to traumatic brain injury and neuronal apoptosis induced by oxidative stress. / Yamada K.H., Kozlowski D.A., Seidl S.E., Lance S., Wieschhaus A.J., Sundivakkam P., Tiruppathi C., Chishti I., Herman I.M., Kuchay S.M., Chishti A.H. // *The Journal of biological chemistry* – 2012. – V. 287 – № 16 – P.13182–93.

195. Wang Y. Differential roles for caspase-mediated and calpain-mediated cell death in 1- and 3-week-old rat cortical cultures. / Wang Y., Zyskind J.W., Colacurcio D.J., Lindl K.A., Ting J.H., Grigoriev G., Jordan-Sciutto K.L. // *Neuroreport* – 2012. – V. 23 – № 18 – P.1052–8.
196. Ghavami S. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. / Ghavami S., Shojaei S., Yeganeh B., Ande S.R., Jangamreddy J.R., Mehrpour M., Christoffersson J., Chaabane W., Moghadam A.R., Kashani H.H., Hashemi M., Owji A.A., Łos M.J. // *Progress in neurobiology* – 2014. – V. 112 – P.24–49.
197. Matsumori Y. Hsp70 overexpression sequesters AIF and reduces neonatal hypoxic/ischemic brain injury. / Matsumori Y., Hong S.M., Aoyama K., Fan Y., Kayama T., Sheldon R.A., Vexler Z.S., Ferriero D.M., Weinstein P.R., Liu J. // *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* – 2005. – V. 25 – № 7 – P.899–910.
198. Zhang Q. Cdk5/p25 specific inhibitory peptide TFP5 rescues the loss of dopaminergic neurons in a sub-acute MPTP induced PD mouse model. / Zhang Q., Xie H., Ji Z., He R., Xu M., He Y., Huang J., Pan S., Hu Y. // *Neuroscience letters* – 2016. – V. 632 – P.1–7.
199. Alvira D. Activation of the calpain/cdk5/p25 pathway in the girus cinguli in Parkinson's disease. / Alvira D., Ferrer I., Gutierrez-Cuesta J., Garcia-Castro B., Pallàs M., Camins A. // *Parkinsonism & related disorders* – 2008. – V. 14 – № 4 – P.309–13.
200. Miao Y. Involvement of calpain/p35-p25/Cdk5/NMDAR signaling pathway in glutamate-induced neurotoxicity in cultured rat retinal neurons. / Miao Y., Dong L.-D., Chen J., Hu X.-C., Yang X.-L., Wang Z. // *PloS one* – 2012. – V. 7 – № 8 – P.e42318.
201. Menzies F.M. Calpain inhibition mediates autophagy-dependent protection against polyglutamine toxicity. / Menzies F.M., Garcia-Arencibia M., Imarisio S., O'Sullivan N.C., Ricketts T., Kent B.A., Rao M. V, Lam W., Green-Thompson

- Z.W., Nixon R.A., Saksida L.M., Bussey T.J., O’Kane C.J., Rubinsztein D.C. // *Cell death and differentiation* – 2015. – V. 22 – № 3 – P.433–44.
202. Weber J.J. A combinatorial approach to identify calpain cleavage sites in the Machado-Joseph disease protein ataxin-3. / Weber J.J., Golla M., Guaitoli G., Wanichawan P., Hayer S.N., Hauser S., Krahl A.-C., Nagel M., Samer S., Aronica E., Carlson C.R., Schöls L., Riess O., Gloeckner C.J., Nguyen H.P., Hübener-Schmid J. // *Brain : a journal of neurology* – 2017. – V. 140 – № 5 – P.1280–1299.
203. Russo R. Calpain-mediated cleavage of Beclin-1 and autophagy deregulation following retinal ischemic injury in vivo. / Russo R., Berliocchi L., Adornetto A., Varano G.P., Cavaliere F., Nucci C., Rotiroti D., Morrone L.A., Bagetta G., Corasaniti M.T. // *Cell death & disease* – 2011. – V. 2 – P.e144.
204. Gerónimo-Olvera C. Autophagy fails to prevent glucose deprivation/glucose reintroduction-induced neuronal death due to calpain-mediated lysosomal dysfunction in cortical neurons. / Gerónimo-Olvera C., Montiel T., Rincon-Heredia R., Castro-Obregón S., Massieu L. // *Cell death & disease* – 2017. – V. 8 – № 6 – P.e2911.
205. Chung K.M. Calpain Determines the Propensity of Adult Hippocampal Neural Stem Cells to Autophagic Cell Death Following Insulin Withdrawal. / Chung K.M., Park H., Jung S., Ha S., Yoo S.-J., Woo H., Lee H.J., Kim S.W., Kim E.-K., Moon C., Yu S.-W. // *Stem cells (Dayton, Ohio)* – 2015. – V. 33 – № 10 – P.3052–64.
206. Machado V.M. Involvement of calpains in adult neurogenesis: implications for stroke. / Machado V.M., Morte M.I., Carreira B.P., Azevedo M.M., Takano J., Iwata N., Saido T.C., Asmussen H., Horwitz A.R., Carvalho C.M., Araújo I.M. // *Frontiers in cellular neuroscience* – 2015. – V. 9 – P.22.
207. Baritaud M. Histone H2AX: The missing link in AIF-mediated caspase-independent programmed necrosis. / Baritaud M., Boujrad H., Lorenzo H.K., Krantic S., Susin S.A. // *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* – 2010. – V. 9 – № 16 – P.3166–73.
208. Prado Spalm F.H. Ceramide Induces the Death of Retina Photoreceptors

- Through Activation of Parthanatos. / Prado Spalm F.H., Vera M.S., Dibo M.J., Simón M.V., Politi L.E., Rotstein N.P. // *Molecular neurobiology* – 2019. – V. 56 – № 7 – P.4760–4777.
209. Saccà E. Assessment of calpain and caspase systems activities during ageing of two bovine muscles by degradation patterns of α II spectrin and PARP-1. / Saccà E., Pizzutti N., Corazzin M., Lippe G., Piasentier E. // *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho* – 2016. – V. 87 – № 3 – P.462–6.
210. Bollino D. Valproic acid induces neuronal cell death through a novel calpain-dependent necroptosis pathway. / Bollino D., Balan I., Aurelian L. // *Journal of neurochemistry* – 2015. – V. 133 – № 2 – P.174–86.
211. Amini M. Conditional disruption of calpain in the CNS alters dendrite morphology, impairs LTP, and promotes neuronal survival following injury. / Amini M., Ma C., Farazifard R., Zhu G., Zhang Y., Vanderluit J., Zoltewicz J.S., Hage F., Savitt J.M., Lagace D.C., Slack R.S., Beique J.-C., Baudry M., Greer P.A., Bergeron R., Park D.S. // *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* – 2013. – V. 33 – № 13 – P.5773–84.
212. Grammer M. Lack of phenotype for LTP and fear conditioning learning in calpain 1 knock-out mice. / Grammer M., Kuchay S., Chishti A., Baudry M. // *Neurobiology of learning and memory* – 2005. – V. 84 – № 3 – P.222–7.
213. Nakajima R. Comprehensive behavioral phenotyping of calpastatin-knockout mice. / Nakajima R., Takao K., Huang S.-M., Takano J., Iwata N., Miyakawa T., Saido T.C. // *Molecular brain* – 2008. – V. 1 – P.7.
214. Baudry M. Micromolar calcium stimulates proteolysis and glutamate binding in rat brain synaptic membranes. / Baudry M., Bundman M.C., Smith E.K., Lynch G.S. // *Science (New York, N.Y.)* – 1981. – V. 212 – № 4497 – P.937–8.
215. Siman R. Excitatory amino acids activate calpain I and induce structural protein breakdown in vivo. / Siman R., Noszek J.C. // *Neuron* – 1988. – V. 1 – № 4 – P.279–87.
216. Stasi A.M. Di Neuronal fodrin proteolysis occurs independently of excitatory amino acid-induced neurotoxicity. / Stasi A.M. Di, Gallo V., Ceccarini M.,

- Petrucci T.C. // *Neuron* – 1991. – V. 6 – № 3 – P.445–54.
217. Cerro S. del Stimulation of NMDA receptors activates calpain in cultured hippocampal slices. / Cerro S. del, Arai A., Kessler M., Bahr B.A., Vanderklish P., Rivera S., Lynch G. // *Neuroscience letters* – 1994. – V. 167 – № 1–2 – P.149–52.
218. Dong Y.N. Interactions of postsynaptic density-95 and the NMDA receptor 2 subunit control calpain-mediated cleavage of the NMDA receptor. / Dong Y.N., Waxman E.A., Lynch D.R. // *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* – 2004. – V. 24 – № 49 – P.11035–45.
219. Guttmann R.P. Proteolysis of the N-methyl-d-aspartate receptor by calpain in situ. / Guttmann R.P., Sokol S., Baker D.L., Simpkins K.L., Dong Y., Lynch D.R. // *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* – 2002. – V. 302 – № 3 – P.1023–30.
220. Yuen E.Y. Calpain regulation of AMPA receptor channels in cortical pyramidal neurons. / Yuen E.Y., Gu Z., Yan Z. // *The Journal of physiology* – 2007. – V. 580 – № Pt 1 – P.241–54.
221. Vinade L. Activation of calpain may alter the postsynaptic density structure and modulate anchoring of NMDA receptors. / Vinade L., Petersen J.D., Do K., Dosemeci A., Reese T.S. // *Synapse (New York, N.Y.)* – 2001. – V. 40 – № 4 – P.302–9.
222. Lu X. Proteolysis of glutamate receptor-interacting protein by calpain in rat brain: implications for synaptic plasticity. / Lu X., Wyszynski M., Sheng M., Baudry M. // *Journal of neurochemistry* – 2001. – V. 77 – № 6 – P.1553–60.
223. Xu W. Calpain-mediated mGluR1alpha truncation: a key step in excitotoxicity. / Xu W., Wong T.P., Chery N., Gaertner T., Wang Y.T., Baudry M. // *Neuron* – 2007. – V. 53 – № 3 – P.399–412.
224. Wang Y. Distinct roles for μ -calpain and m-calpain in synaptic NMDAR-mediated neuroprotection and extrasynaptic NMDAR-mediated neurodegeneration. / Wang Y., Briz V., Chishti A., Bi X., Baudry M. // *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* – 2013. – V. 33 – № 48 – P.18880–92.

225. Briz V. Calpains: Master Regulators of Synaptic Plasticity. / Briz V., Baudry M. // *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* – 2017. – V. 23 – № 3 – P.221–231.
226. Heysieattalab S. Impaired cerebellar plasticity and eye-blink conditioning in calpain-1 knock-out mice. / Heysieattalab S., Lee K.-H., Liu Y., Wang Y., Foy M.R., Bi X., Baudry M. // *Neurobiology of learning and memory* – 2019. – P.106995.
227. Ando K. Negative regulation of neurotransmitter release by calpain: a possible involvement of specific SNAP-25 cleavage. / Ando K., Kudo Y., Takahashi M. // *Journal of neurochemistry* – 2005. – V. 94 – № 3 – P.651–8.
228. Gomes J.R. Cleavage of the vesicular GABA transporter under excitotoxic conditions is followed by accumulation of the truncated transporter in nonsynaptic sites. / Gomes J.R., Lobo A.C., Melo C. V, Inácio A.R., Takano J., Iwata N., Saido T.C., Almeida L.P. de, Wieloch T., Duarte C.B. // *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* – 2011. – V. 31 – № 12 – P.4622–35.
229. Monnerie H. Glutamate alteration of glutamic acid decarboxylase (GAD) in GABAergic neurons: the role of cysteine proteases. / Monnerie H., Roux P.D. Le // *Experimental neurology* – 2008. – V. 213 – № 1 – P.145–53.
230. Specific proteolysis of neuronal protein GAP-43 by calpain: characterization, regulation, and physiological role.
231. Holahan M.R. A Shift from a Pivotal to Supporting Role for the Growth-Associated Protein (GAP-43) in the Coordination of Axonal Structural and Functional Plasticity. / Holahan M.R. // *Frontiers in cellular neuroscience* – 2017. – V. 11 – P.266.
232. Franekova V. Truncation of human dopamine transporter by protease calpain. / Franekova V., Baliova M., Jursky F. // *Neurochemistry international* – 2008. – V. 52 – № 8 – P.1436–41.
233. Yurko-Mauro K.A. Dopamine-stimulated changes in activated calpain I in rat hippocampal slices. / Yurko-Mauro K.A., Friedman E. // *Journal of neuroscience*

research – 1996. – V. 43 – № 4 – P.476–81.

234. Rudic B. Hypothermic preservation up-regulates calpain expression and increases ubiquitination in cultured vascular endothelial cells: influence of dopamine pretreatment. / Rudic B., Song H., Breedijk A., Brinkkoetter P., Beck G., Yard B., Ponelies N. // *The Journal of surgical research* – 2010. – V. 160 – № 2 – P.325–32.

235. Hassen G.W. Effects of Novel Calpain Inhibitors in Transgenic Animal Model of Parkinson's disease/dementia with Lewy bodies. / Hassen G.W., Kesner L., Stracher A., Shulman A., Rockenstein E., Mante M., Adame A., Overk C., Rissman R.A., Masliah E. // *Scientific reports* – 2018. – V. 8 – № 1 – P.18083.

236. Zhao J. Calpain inhibition reduces NMDA receptor rundown in rat substantia nigra dopamine neurons. / Zhao J., Baudry M., Jones S. // *Neuropharmacology* – 2018. – V. 137 – P.221–229.

237. Deuschl G. Consensus statement of the Movement Disorder Society on Tremor. Ad Hoc Scientific Committee. / Deuschl G., Bain P., Brin M. // *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* – 1998. – V. 13 Suppl 3 – P.2–23.

238. Stacy M.A. Assessment of interrater and intrarater reliability of the Fahn-Tolosa-Marin Tremor Rating Scale in essential tremor. / Stacy M.A., Elble R.J., Ondo W.G., Wu S.-C., Hulihan J., TRS study group // *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* – 2007. – V. 22 – № 6 – P.833–8.

239. Hughes A.J. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. / Hughes A.J., Daniel S.E., Kilford L., Lees A.J. // *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* – 1992. – V. 55 – № 3 – P.181–4.

240. Hoehn M.M. Parkinsonism: onset, progression and mortality. / Hoehn M.M., Yahr M.D. // *Neurology* – 1967. – V. 17 – № 5 – P.427–42.

241. Paxinos G. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - 6th Edition* / G. Paxinos, C. Watson – Elsevier, 2007.

242. Xu J. Synaptosomes secrete and uptake functionally active microRNAs via exocytosis and endocytosis pathways. / Xu J., Chen Q., Zen K., Zhang C., Zhang Q. // *Journal of neurochemistry* – 2013. – V. 124 – № 1 – P.15–25.
243. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. / Laemmli U.K. // *Nature* – 1970. – V. 227 – № 5259 – P.680–5.
244. Ni D. Immunoblotting and Immunodetection / Ni D., Xu P., Gallagher S. // *Current Protocols in Cell Biology* – 2017. – V. 74 – № 1 – P.6.2.1-6.2.37.
245. Schneider C.A. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis / Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. // *Nature Methods* – 2012. – V. 9 – № 7 – P.671–675.
246. Raser K.J. Casein zymography: a method to study mu-calpain, m-calpain, and their inhibitory agents. / Raser K.J., Posner A., Wang K.K. // *Archives of biochemistry and biophysics* – 1995. – V. 319 – № 1 – P.211–6.
247. Koressaar T. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. / Koressaar T., Remm M. // *Bioinformatics (Oxford, England)* – 2007. – V. 23 – № 10 – P.1289–91.
248. Altschul S.F. Basic local alignment search tool. / Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. // *Journal of molecular biology* – 1990. – V. 215 – № 3 – P.403–10.
249. Livak K.J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. / Livak K.J., Schmittgen T.D. // *Methods (San Diego, Calif.)* – 2001. – V. 25 – № 4 – P.402–8.
250. Коржевский Д.Э. Основы гистологической техники / Д. Э. Коржевский, А. . Гиляров – СПб: СпецЛит, 2010.– 95с.
251. Hiller K. PrediSi: prediction of signal peptides and their cleavage positions / Hiller K., Grote A., Scheer M., Munch R., Jahn D. // *Nucleic Acids Research* – 2004. – V. 32 – № Web Server – P.W375–W379.
252. Bendtsen J.D. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. / Bendtsen J.D., Jensen L.J., Blom N., Heijne G. Von, Brunak S. //

- Protein engineering, design & selection : PEDS – 2004. – V. 17 – № 4 – P.349–56.
253. duVerle D. CaMPDB: a resource for calpain and modulatory proteolysis. / duVerle D., Takigawa I., Ono Y., Sorimachi H., Mamitsuka H. // *Genome informatics. International Conference on Genome Informatics* – 2010. – V. 22 – P.202–13.
254. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. / Corpet F. // *Nucleic acids research* – 1988. – V. 16 – № 22 – P.10881–90.
255. Langston J.W. The MPTP Story. / Langston J.W. // *Journal of Parkinson's disease* – 2017. – V. 7 – № s1 – P.S11–S19.
256. Chen P. Manganese metabolism in humans. / Chen P., Bornhorst J., Aschner M. // *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* – 2018. – V. 23 – P.1655–1679.
257. Francis K. The biochemistry of the metabolic poison propionate 3-nitronate and its conjugate acid, 3-nitropropionate. / Francis K., Smitherman C., Nishino S.F., Spain J.C., Gadda G. // *IUBMB life* – 2013. – V. 65 – № 9 – P.759–68.
258. Lopes P.C. LPS and neuroinflammation: a matter of timing. / Lopes P.C. // *Inflammopharmacology* – 2016. – V. 24 – № 5 – P.291–293.
259. Batista C.R.A. Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation as a Bridge to Understand Neurodegeneration. / Batista C.R.A., Gomes G.F., Candelario-Jalil E., Fiebich B.L., Oliveira A.C.P. de // *International journal of molecular sciences* – 2019. – V. 20 – № 9.
260. Fonck C. Rapid reduction of ATP synthesis and lack of free radical formation by MPP⁺ in rat brain synaptosomes and mitochondria. / Fonck C., Baudry M. // *Brain research* – 2003. – V. 975 – № 1–2 – P.214–21.
261. Erecińska M. Effects of 3-nitropropionic acid on synaptosomal energy and transmitter metabolism: relevance to neurodegenerative brain diseases. / Erecińska M., Nelson D. // *Journal of neurochemistry* – 1994. – V. 63 – № 3 – P.1033–41.
262. Senguen F.T. X-ray structures of magnesium and manganese complexes with the N-terminal domain of calmodulin: insights into the mechanism and specificity of metal ion binding to an EF-hand. / Senguen F.T., Grabarek Z. // *Biochemistry* – 2012. – V. 51 – № 31 – P.6182–94.

263. Лысенко Л.А. Влияние Sr^{2+} на внутриклеточные Ca^{2+} -зависимые протеиназы рыб. / Лысенко Л.А., Канцерова Н.П., Кяйвярйнен Е.И., Немова Н.Н., Кашулин. Н.А. // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов Том I. Экологическая физиология и биохимия водных организмов. Сборник научных статей– Петрозаводск: КарНЦ РАН. – 2010. – P.127–136.
264. Evans G.J.O. The synaptosome as a model system for studying synaptic physiology. / Evans G.J.O. // Cold Spring Harbor protocols – 2015. – V. 2015 – № 5 – P.421–4.
265. Fukuda S. Postischemic reperfusion induces alpha-fodrin proteolysis by m-calpain in the synaptosome and nucleus in rat brain. / Fukuda S., Harada K., Kunimatsu M., Sakabe T., Yoshida K. // Journal of neurochemistry – 1998. – V. 70 – № 6 – P.2526–32.
266. Ahmad F. Isoform-specific hyperactivation of calpain-2 occurs presymptomatically at the synapse in Alzheimer's disease mice and correlates with memory deficits in human subjects. / Ahmad F., Das D., Kommaddi R.P., Diwakar L., Gowaikar R., Rupanagudi K.V., Bennett D.A., Ravindranath V. // Scientific reports – 2018. – V. 8 – № 1 – P.13119.
267. Koentges C. Impaired SIRT3 activity mediates cardiac dysfunction in endotoxemia by calpain-dependent disruption of ATP synthesis. / Koentges C., Cimolai M.C., Pfeil K., Wolf D., Marchini T., Tarkhnishvili A., Hoffmann M.M., Odening K.E., Diehl P., Zur Mühlen C. von, Alvarez S., Bode C., Zirlik A., Bugger H. // Journal of molecular and cellular cardiology – 2019. – V. 133 – P.138–147.
268. Túnez I. Treatment with dehydroepiandrosterone prevents oxidative stress induced by 3-nitropropionic acid in synaptosomes. / Túnez I., Muñoz M.C., Montilla P. // Pharmacology – 2005. – V. 74 – № 3 – P.113–8.
269. Herrera-Mundo N. Mechanisms underlying striatal vulnerability to 3-nitropropionic acid. / Herrera-Mundo N., Sitges M. // Journal of neurochemistry – 2010. – V. 114 – № 2 – P.597–605.

270. Wang C. Inhibition of Calpains Protects Mn-Induced Neurotransmitter release disorders in Synaptosomes from Mice: Involvement of SNARE Complex and Synaptic Vesicle Fusion. / Wang C., Xu B., Ma Z., Liu C., Deng Y., Liu W., Xu Z.-F. // *Scientific reports* – 2017. – V. 7 – № 1 – P.3701.
271. Leow-Dyke S. Neuronal Toll-like receptor 4 signaling induces brain endothelial activation and neutrophil transmigration in vitro. / Leow-Dyke S., Allen C., Denes A., Nilsson O., Maysami S., Bowie A.G., Rothwell N.J., Pinteaux E. // *Journal of neuroinflammation* – 2012. – V. 9 – P.230.
272. Yamamoto S. Calcium-dependent cysteine proteinase (calpain) in human arthritic synovial joints. / Yamamoto S., Shimizu K., Shimizu K., Suzuki K., Nakagawa Y., Yamamuro T. // *Arthritis and rheumatism* – 1992. – V. 35 – № 11 – P.1309–17.
273. Deshpande R. V Calpain expression in lymphoid cells. Increased mRNA and protein levels after cell activation. / Deshpande R. V, Goust J.M., Chakrabarti A.K., Barbosa E., Hogan E.L., Banik N.L. // *The Journal of biological chemistry* – 1995. – V. 270 – № 6 – P.2497–505.
274. Becker B. Alzheimer-associated cerebrospinal fluid fragments of neurogranin are generated by Calpain-1 and prolyl endopeptidase. / Becker B., Nazir F.H., Brinkmalm G., Camporesi E., Kvartsberg H., Portelius E., Boström M., Kalm M., Höglund K., Olsson M., Zetterberg H., Blennow K. // *Molecular neurodegeneration* – 2018. – V. 13 – № 1 – P.47.
275. Viotti C. ER to Golgi-Dependent Protein Secretion: The Conventional Pathway. / Viotti C. // *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* – 2016. – V. 1459 – P.3–29.
276. Rabouille C. Pathways of Unconventional Protein Secretion. / Rabouille C. // *Trends in cell biology* – 2017. – V. 27 – № 3 – P.230–240.
277. Koldamova R. ATP-binding cassette transporter A1: from metabolism to neurodegeneration. / Koldamova R., Fitz N.F., Lefterov I. // *Neurobiology of disease* – 2014. – V. 72 Pt A – P.13–21.
278. Deijk A.-L.F. van Astrocyte lipid metabolism is critical for synapse

- development and function in vivo. / Deijk A.-L.F. van, Camargo N., Timmerman J., Heistek T., Brouwers J.F., Mogavero F., Mansvelter H.D., Smit A.B., Verheijen M.H.G. // *Glia* – 2017. – V. 65 – № 4 – P.670–682.
279. Yvan-Charvet L. Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice. / Yvan-Charvet L., Ranalletta M., Wang N., Han S., Terasaka N., Li R., Welch C., Tall A.R. // *The Journal of clinical investigation* – 2007. – V. 117 – № 12 – P.3900–8.
280. Han X. Interleukin-10 facilitates both cholesterol uptake and efflux in macrophages. / Han X., Kitamoto S., Lian Q., Boisvert W.A. // *The Journal of biological chemistry* – 2009. – V. 284 – № 47 – P.32950–8.
281. Kim W.S. Increased ATP-binding cassette transporter A1 expression in Alzheimer's disease hippocampal neurons. / Kim W.S., Bhatia S., Elliott D.A., Agholme L., Kågedal K., McCann H., Halliday G.M., Barnham K.J., Garner B. // *Journal of Alzheimer's disease : JAD* – 2010. – V. 21 – № 1 – P.193–205.
282. Bryan J. Sulfonylurea receptors: ABC transporters that regulate ATP-sensitive K(+) channels. / Bryan J., Aguilar-Bryan L. // *Biochimica et biophysica acta* – 1999. – V. 1461 – № 2 – P.285–303.
283. Wang N. ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) functions as a cholesterol efflux regulatory protein. / Wang N., Silver D.L., Thiele C., Tall A.R. // *The Journal of biological chemistry* – 2001. – V. 276 – № 26 – P.23742–7.
284. Nieland T.J.F. Cross-inhibition of SR-BI- and ABCA1-mediated cholesterol transport by the small molecules BLT-4 and glyburide. / Nieland T.J.F., Chroni A., Fitzgerald M.L., Maliga Z., Zannis V.I., Kirchhausen T., Krieger M. // *Journal of lipid research* – 2004. – V. 45 – № 7 – P.1256–65.
285. Kurland D.B. The Sur1-Trpm4 channel regulates NOS2 transcription in TLR4-activated microglia. / Kurland D.B., Gerzanich V., Karimy J.K., Woo S.K., Vennekens R., Freichel M., Nilius B., Bryan J., Simard J.M. // *Journal of neuroinflammation* – 2016. – V. 13 – № 1 – P.130.
286. Schain M. Neuroinflammation in Neurodegenerative Disorders-a Review. / Schain M., Kreisl W.C. // *Current neurology and neuroscience reports* – 2017. – V.

17 – № 3 – P.25.

287. Heyer E.J. Inflammation and cognitive dysfunction in type 2 diabetic carotid endarterectomy patients. / Heyer E.J., Mergeche J.L., Bruce S.S., Connolly E.S. // *Diabetes care* – 2013. – V. 36 – № 10 – P.3283–6.

288. Simard J.M. Sulfonylurea receptor 1 in central nervous system injury: a focused review. / Simard J.M., Woo S.K., Schwartzbauer G.T., Gerzanich V. // *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* – 2012. – V. 32 – № 9 – P.1699–717.

289. Esmaeili M.H. Glibenclamide mitigates cognitive impairment and hippocampal neuroinflammation in rats with type 2 diabetes and sporadic Alzheimer-like disease. / Esmaeili M.H., Enayati M., Khabbaz Abkenar F., Ebrahimian F., Salari A.-A. // *Behavioural brain research* – 2020. – V. 379 – P.112359.

290. Xu F. Glibenclamide ameliorates the disrupted blood-brain barrier in experimental intracerebral hemorrhage by inhibiting the activation of NLRP3 inflammasome. / Xu F., Shen G., Su Z., He Z., Yuan L. // *Brain and behavior* – 2019. – V. 9 – № 4 – P.e01254.

291. Stokum J.A. Glibenclamide pretreatment protects against chronic memory dysfunction and glial activation in rat cranial blast traumatic brain injury. / Stokum J.A., Keledjian K., Hayman E., Karimy J.K., Pampori A., Imran Z., Woo S.K., Gerzanich V., Simard J.M. // *Behavioural brain research* – 2017. – V. 333 – P.43–53.

292. Ren Y. CD200 Inhibits Inflammatory Response by Promoting KATP Channel Opening in Microglia Cells in Parkinson's Disease. / Ren Y., Ye M., Chen S., Ding J. // *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* – 2016. – V. 22 – P.1733–41.

293. Sarookhani M.R. Involvement of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the neuroprotective activity of hydrogen sulfide in the 6-hydroxydopamine-induced animal model of Parkinson's disease. / Sarookhani

- M.R., Haghdoost-Yazdi H., Sarbazi-Golezari A., Babayan-Tazehkand A., Rastgoo N. // Behavioural pharmacology – 2018. – V. 29 – № 4 – P.336–343.
294. Dunn-Meynell A.A. Distribution and phenotype of neurons containing the ATP-sensitive K⁺ channel in rat brain. / Dunn-Meynell A.A., Rawson N.E., Levin B.E. // Brain research – 1998. – V. 814 – № 1–2 – P.41–54.
295. Avshalumov M. V Activation of ATP-sensitive K⁺ (K(ATP)) channels by H₂O₂ underlies glutamate-dependent inhibition of striatal dopamine release. / Avshalumov M. V, Rice M.E. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – 2003. – V. 100 – № 20 – P.11729–34.
296. Bao L. Partial mitochondrial inhibition causes striatal dopamine release suppression and medium spiny neuron depolarization via H₂O₂ elevation, not ATP depletion. / Bao L., Avshalumov M. V, Rice M.E. // The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience – 2005. – V. 25 – № 43 – P.10029–40.
297. Patel J.C. Subsecond regulation of striatal dopamine release by pre-synaptic KATP channels. / Patel J.C., Witkovsky P., Coetzee W.A., Rice M.E. // Journal of neurochemistry – 2011. – V. 118 – № 5 – P.721–36.
298. Hsieh M.-H. Blockade of metabotropic glutamate receptors inhibits cognition and neurodegeneration in an MPTP-induced Parkinson's disease rat model. / Hsieh M.-H., Ho S.-C., Yeh K.-Y., Pawlak C.R., Chang H.-M., Ho Y.-J., Lai T.-J., Wu F.-Y. // Pharmacology, biochemistry, and behavior – 2012. – V. 102 – № 1 – P.64–71.
299. Samantaray S. Inhibition of Calpain Activation Protects MPTP-Induced Nigral and Spinal Cord Neurodegeneration, Reduces Inflammation, and Improves Gait Dynamics in Mice. / Samantaray S., Knaryan V.H., Shields D.C., Cox A.A., Haque A., Banik N.L. // Molecular neurobiology – 2015. – V. 52 – № 2 – P.1054–66.
300. Chera B. Immunofluorescent labeling of increased calpain expression and neuronal death in the spinal cord of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice. / Chera B., Schaecher K.E., Rocchini A., Imam S.Z., Sribnick E.A.,

- Ray S.K., Ali S.F., Banik N.L. // Brain research – 2004. – V. 1006 – № 2 – P.150–6.
301. Brown G.C. The endotoxin hypothesis of neurodegeneration. / Brown G.C. // Journal of neuroinflammation – 2019. – V. 16 – № 1 – P.180.
302. Dauphinee S.M. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. / Dauphinee S.M., Karsan A. // Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology – 2006. – V. 86 – № 1 – P.9–22.
303. Luo R. Myocardial caspase-3 and NF- κ B activation promotes calpain-induced septic apoptosis: The role of Akt/eNOS/NO pathway. / Luo R., Chen X., Ma H., Yao C., Liu M., Tao J., Li X. // Life sciences – 2019. – V. 222 – P.195–202.
304. Benusa S.D. Acute neuroinflammation induces AIS structural plasticity in a NOX2-dependent manner. / Benusa S.D., George N.M., Sword B.A., DeVries G.H., Dupree J.L. // Journal of neuroinflammation – 2017. – V. 14 – № 1 – P.116.
305. Qian L. β 2-adrenergic receptor activation prevents rodent dopaminergic neurotoxicity by inhibiting microglia via a novel signaling pathway. / Qian L., Wu H., Chen S.-H., Zhang D., Ali S.F., Peterson L., Wilson B., Lu R.-B., Hong J.-S., Flood P.M. // Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) – 2011. – V. 186 – № 7 – P.4443–54.
306. Perry A.K. Differential Requirement for TANK-binding Kinase-1 in Type I Interferon Responses to Toll-like Receptor Activation and Viral Infection / Perry A.K., Chow E.K., Goodnough J.B., Yeh W.-C., Cheng G. // Journal of Experimental Medicine – 2004. – V. 199 – № 12 – P.1651–1658.
307. Qin L. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. / Qin L., Wu X., Block M.L., Liu Y., Breese G.R., Hong J.-S., Knapp D.J., Crews F.T. // Glia – 2007. – V. 55 – № 5 – P.453–62.
308. Ruetten H. Effect of calpain inhibitor I, an inhibitor of the proteolysis of I kappa B, on the circulatory failure and multiple organ dysfunction caused by endotoxin in the rat. / Ruetten H., Thiemeermann C. // British journal of pharmacology – 1997. – V. 121 – № 4 – P.695–704.
309. Curcio M. Calpains and neuronal damage in the ischemic brain: The swiss

- knife in synaptic injury / Curcio M., Salazar I.L., Mele M., Canzoniero L.M.T., Duarte C.B. // *Progress in Neurobiology* – 2016. – V. 143 – P.1–35.
310. Latour A. LPS-Induced Inflammation Abolishes the Effect of DYRK1A on IκB Stability in the Brain of Mice. / Latour A., Gu Y., Kassis N., Daubigney F., Colin C., Gausserès B., Middendorp S., Paul J.-L., Hindié V., Rain J.-C., Delabar J.-M., Yu E., Arbones M., Mallat M., Janel N. // *Molecular neurobiology* – 2019. – V. 56 – № 2 – P.963–975.
311. Gibbons H.M. Microglia induce neural cell death via a proximity-dependent mechanism involving nitric oxide. / Gibbons H.M., Dragunow M. // *Brain research* – 2006. – V. 1084 – № 1 – P.1–15.
312. Tufekci K.U. The endotoxin-induced neuroinflammation model of Parkinson's disease. / Tufekci K.U., Genc S., Genc K. // *Parkinson's disease* – 2011. – V. 2011 – P.487450.
313. Liu S.H. IL-13 downregulates PPAR-gamma/heme oxygenase-1 via ER stress-stimulated calpain activation: aggravation of activated microglia death. / Liu S.H., Yang C.N., Pan H.C., Sung Y.J., Liao K.K., Chen W.B., Lin W.Z., Sheu M.L. // *Cellular and molecular life sciences : CMLS* – 2010. – V. 67 – № 9 – P.1465–76.
314. He Q. Intranasal LPS-mediated Parkinson's model challenges the pathogenesis of nasal cavity and environmental toxins. / He Q., Yu W., Wu J., Chen C., Lou Z., Zhang Q., Zhao J., Wang J., Xiao B. // *PloS one* – 2013. – V. 8 – № 11 – P.e78418.
315. Zhao J. Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. / Zhao J., Bi W., Xiao S., Lan X., Cheng X., Zhang J., Lu D., Wei W., Wang Y., Li H., Fu Y., Zhu L. // *Scientific reports* – 2019. – V. 9 – № 1 – P.5790.
316. Seinfeld J. Differential Activation of Calpain-1 and Calpain-2 following Kainate-Induced Seizure Activity in Rats and Mice. / Seinfeld J., Baudry N., Xu X., Bi X., Baudry M. // *eNeuro* – V. 3 – № 4.
317. Umezawa M. High-linoleate and high-alpha-linolenate diets affect learning

- ability and natural behavior in SAMR1 mice. / Umezawa M., Kogishi K., Tojo H., Yoshimura S., Seriu N., Ohta A., Takeda T., Hosokawa M. // *The Journal of nutrition* – 1999. – V. 129 – № 2 – P.431–7.
318. Laohaudomchok W. Neuropsychological effects of low-level manganese exposure in welders. / Laohaudomchok W., Lin X., Herrick R.F., Fang S.C., Cavallari J.M., Shrairman R., Landau A., Christiani D.C., Weisskopf M.G. // *Neurotoxicology* – 2011. – V. 32 – № 2 – P.171–9.
319. Marreilha Dos Santos A.P. Prolactin is a peripheral marker of manganese neurotoxicity. / Marreilha Dos Santos A.P., Lopes Santos M., Batoréu M.C., Aschner M. // *Brain research* – 2011. – V. 1382 – P.282–90.
320. Hassani H. Relations of biomarkers of manganese exposure and neuropsychological effects among welders and ferroalloy smelters. / Hassani H., Golbabaei F., Shirkhanloo H., Tehrani-Doust M. // *Industrial health* – 2016. – V. 54 – № 1 – P.79–86.
321. Lodge D.J. Aberrant hippocampal activity underlies the dopamine dysregulation in an animal model of schizophrenia. / Lodge D.J., Grace A.A. // *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* – 2007. – V. 27 – № 42 – P.11424–30.
322. Vezér T. Behavioral effects of subchronic inorganic manganese exposure in rats. / Vezér T., Kurunczi A., Náray M., Papp A., Nagymajtényi L. // *American journal of industrial medicine* – 2007. – V. 50 – № 11 – P.841–52.
323. Long Z. Vulnerability of welders to manganese exposure--a neuroimaging study. / Long Z., Jiang Y.-M., Li X.-R., Fadel W., Xu J., Yeh C.-L., Long L.-L., Luo H.-L., Harezlak J., Murdoch J.B., Zheng W., Dydak U. // *Neurotoxicology* – 2014. – V. 45 – P.285–92.
324. Lee E.-Y. Higher Hippocampal Mean Diffusivity Values in Asymptomatic Welders. / Lee E.-Y., Flynn M.R., Du G., Lewis M.M., Kong L., Yanosky J.D., Mailman R.B., Huang X. // *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* – 2019. – V. 168 – № 2 – P.486–496.
325. Tjalkens R.B. Inflammatory Activation of Microglia and Astrocytes in

- Manganese Neurotoxicity. / Tjalkens R.B., Popichak K.A., Kirkley K.A. // *Advances in neurobiology* – 2017. – V. 18 – P.159–181.
326. Wang D. The role of NLRP3-CASP1 in inflammasome-mediated neuroinflammation and autophagy dysfunction in manganese-induced, hippocampal-dependent impairment of learning and memory ability. / Wang D., Zhang J., Jiang W., Cao Z., Zhao F., Cai T., Aschner M., Luo W. // *Autophagy* – 2017. – V. 13 – № 5 – P.914–927.
327. Perl D.P. The neuropathology of manganese-induced Parkinsonism. / Perl D.P., Olanow C.W. // *Journal of neuropathology and experimental neurology* – 2007. – V. 66 – № 8 – P.675–82.
328. Verina T. Manganese exposure induces microglia activation and dystrophy in the substantia nigra of non-human primates. / Verina T., Kiihl S.F., Schneider J.S., Guilarte T.R. // *Neurotoxicology* – 2011. – V. 32 – № 2 – P.215–26.
329. Popichak K.A. Glial-neuronal signaling mechanisms underlying the neuroinflammatory effects of manganese. / Popichak K.A., Afzali M.F., Kirkley K.S., Tjalkens R.B. // *Journal of neuroinflammation* – 2018. – V. 15 – № 1 – P.324.
330. Filipov N.M. Role of glial cells in manganese neurotoxicity. / Filipov N.M., Dodd C.A. // *Journal of applied toxicology : JAT* – 2012. – V. 32 – № 5 – P.310–7.
331. Zhang B. Spatial memory training induces morphological changes detected by manganese-enhanced MRI in the hippocampal CA3 mossy fiber terminal zone. / Zhang B., Chuang K.-H., Tjio C., Chen W.C., Sheu F.-S., Routtenberg A. // *NeuroImage* – 2016. – V. 128 – P.227–237.
332. Blecharz-Klin K. Effect of intranasal manganese administration on neurotransmission and spatial learning in rats. / Blecharz-Klin K., Piechal A., Joniec-Maciejak I., Pyrzanowska J., Widy-Tyszkiewicz E. // *Toxicology and applied pharmacology* – 2012. – V. 265 – № 1 – P.1–9.
333. Bowler R.M. Sequelae of fume exposure in confined space welding: a neurological and neuropsychological case series. / Bowler R.M., Nakagawa S., Drezgic M., Roels H.A., Park R.M., Diamond E., Mergler D., Bouchard M.,

- Bowler R.P., Koller W. // *Neurotoxicology* – 2007. – V. 28 – № 2 – P.298–311.
334. Wagatsuma A. Locus coeruleus input to hippocampal CA3 drives single-trial learning of a novel context. / Wagatsuma A., Okuyama T., Sun C., Smith L.M., Abe K., Tonegawa S. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2018. – V. 115 – № 2 – P.E310–E316.
335. Normandin L. Manganese neurotoxicity: an update of pathophysiologic mechanisms. / Normandin L., Hazell A.S. // *Metabolic brain disease* – 2002. – V. 17 – № 4 – P.375–87.
336. Ben-Shahar Y. The Impact of Environmental Mn Exposure on Insect Biology. / Ben-Shahar Y. // *Frontiers in genetics* – 2018. – V. 9 – P.70.
337. Kalia L. V Parkinson's disease. / Kalia L. V, Lang A.E. // *Lancet (London, England)* – 2015. – V. 386 – № 9996 – P.896–912.
338. Quintanar L. Calpain activation is involved in acute manganese neurotoxicity in the rat striatum in vivo. / Quintanar L., Montiel T., Márquez M., González A., Massieu L. // *Experimental neurology* – 2012. – V. 233 – № 1 – P.182–92.
339. Xu B. Alpha-synuclein oligomerization in manganese-induced nerve cell injury in brain slices: a role of NO-mediated S-nitrosylation of protein disulfide isomerase. / Xu B., Jin C.-H., Deng Y., Liu W., Yang T.-Y., Feng S., Xu Z.-F. // *Molecular neurobiology* – 2014. – V. 50 – № 3 – P.1098–110.
340. Sidoryk-Wegrzynowicz M. Role of astrocytes in manganese mediated neurotoxicity. / Sidoryk-Wegrzynowicz M., Aschner M. // *BMC pharmacology & toxicology* – 2013. – V. 14 – P.23.
341. Donkor I.O. An updated patent review of calpain inhibitors (2012 - 2014). / Donkor I.O. // *Expert opinion on therapeutic patents* – 2015. – V. 25 – № 1 – P.17–31.
342. Fiorino F. A new cell-permeable calpain inhibitor. / Fiorino F., Gil-Parrado S., Assfalg-Machleidt I., Machleidt W., Moroder L. // *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* – 2007. – V. 13 – № 1 – P.70–3.
343. Maki M. Inhibition of calpain by a synthetic oligopeptide corresponding to an

exon of the human calpastatin gene. / Maki M., Bagci H., Hamaguchi K., Ueda M., Murachi T., Hatanaka M. // *The Journal of biological chemistry* – 1989. – V. 264 – № 32 – P.18866–9.

344. Xu B. Inhibition of calpain prevents manganese-induced cell injury and alpha-synuclein oligomerization in organotypic brain slice cultures. / Xu B., Liu W., Deng Y., Yang T.-Y., Feng S., Xu Z.-F. // *PloS one* – 2015. – V. 10 – № 3 – P.e0119205.

345. Song Z.-J. Postnatal calpeptin treatment causes hippocampal neurodevelopmental defects in neonatal rats. / Song Z.-J., Yang S.-J., Han L., Wang B., Zhu G. // *Neural regeneration research* – 2019. – V. 14 – № 5 – P.834–840.

346. Tao X.-G. Protective Effects of Calpain Inhibition on Neurovascular Unit Injury through Downregulating Nuclear Factor- κ B-related Inflammation during Traumatic Brain Injury in Mice. / Tao X.-G., Shi J.-H., Hao S.-Y., Chen X.-T., Liu B.-Y. // *Chinese medical journal* – 2017. – V. 130 – № 2 – P.187–198.

347. Podbielska M. Neuron-microglia interaction induced bi-directional cytotoxicity associated with calpain activation. / Podbielska M., Das A., Smith A.W., Chauhan A., Ray S.K., Inoue J., Azuma M., Nozaki K., Hogan E.L., Banik N.L. // *Journal of neurochemistry* – 2016. – V. 139 – № 3 – P.440–455.

348. Trinchese F. Inhibition of calpains improves memory and synaptic transmission in a mouse model of Alzheimer disease. / Trinchese F., Fa' M., Liu S., Zhang H., Hidalgo A., Schmidt S.D., Yamaguchi H., Yoshii N., Mathews P.M., Nixon R.A., Arancio O. // *The Journal of clinical investigation* – 2008. – V. 118 – № 8 – P.2796–807.

349. Medeiros R. Calpain inhibitor A-705253 mitigates Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline in aged 3xTgAD mice. / Medeiros R., Kitazawa M., Chabrier M.A., Cheng D., Baglietto-Vargas D., Kling A., Moeller A., Green K.N., LaFerla F.M. // *The American journal of pathology* – 2012. – V. 181 – № 2 – P.616–25.

350. Crocker S.J. Inhibition of calpains prevents neuronal and behavioral deficits

- in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. / Crocker S.J., Smith P.D., Jackson-Lewis V., Lamba W.R., Hayley S.P., Grimm E., Callaghan S.M., Slack R.S., Melloni E., Przedborski S., Robertson G.S., Anisman H., Merali Z., Park D.S. // *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* – 2003. – V. 23 – № 10 – P.4081–91.
351. Li X. [Effects of arsenic poisoning on neuronal cell apoptosis and mRNA and protein expression of calpain 1, calpain 2, and cdk5/p25]. / Li X., Chan L., Zhang H., Zhang H., Niu Q. // *Zhonghua lao dong wei sheng zhi ye bing za zhi = Zhonghua laodong weisheng zhiyebing zazhi = Chinese journal of industrial hygiene and occupational diseases* – 2014. – V. 32 – № 3 – P.202–6.
352. Shanab A.Y. Metabolic stress response implicated in diabetic retinopathy: the role of calpain, and the therapeutic impact of calpain inhibitor. / Shanab A.Y., Nakazawa T., Ryu M., Tanaka Y., Himori N., Taguchi K., Yasuda M., Watanabe R., Takano J., Saido T., Minegishi N., Miyata T., Abe T., Yamamoto M. // *Neurobiology of disease* – 2012. – V. 48 – № 3 – P.556–67.
353. Lam P.M. Calpain activation during early epileptogenesis. / Lam P.M., González M.I. // *Neurobiology of disease* – 2019. – V. 124 – P.141–151.
354. Ray S.K. Calpain activity and translational expression increased in spinal cord injury. / Ray S.K., Shields D.C., Saido T.C., Matzelle D.C., Wilford G.G., Hogan E.L., Banik N.L. // *Brain research* – 1999. – V. 816 – № 2 – P.375–80.
355. Capriotti T. Parkinson Disease / Capriotti T., Terzakis K. // *Home Healthcare Now* – 2016. – V. 34 – № 6 – P.300–307.
356. Badugu R. N terminus of calpain 1 is a mitochondrial targeting sequence. / Badugu R., Garcia M., Bondada V., Joshi A., Geddes J.W. // *The Journal of biological chemistry* – 2008. – V. 283 – № 6 – P.3409–17.
357. Kruse S.E. Age modifies respiratory complex I and protein homeostasis in a muscle type-specific manner. / Kruse S.E., Karunadharma P.P., Basisty N., Johnson R., Beyer R.P., MacCoss M.J., Rabinovitch P.S., Marcinek D.J. // *Aging cell* – 2016. – V. 15 – № 1 – P.89–99.
358. Chou A.P. Mechanisms of rotenone-induced proteasome inhibition. / Chou

- A.P., Li S., Fitzmaurice A.G., Bronstein J.M. // *Neurotoxicology* – 2010. – V. 31 – № 4 – P.367–72.
359. Schildknecht S. Tipping Points and Endogenous Determinants of Nigrostriatal Degeneration by MPTP. / Schildknecht S., Monte D.A. Di, Pape R., Tieu K., Leist M. // *Trends in pharmacological sciences* – 2017. – V. 38 – № 6 – P.541–555.
360. Kotlyarov E. Guidelines for use of nonionic contrast media. / Kotlyarov E., Johnston G.S., Mirvis S. // *AJR. American journal of roentgenology* – 1991. – V. 156 – № 4 – P.865–6.
361. Esteves A.R. Mitochondrial respiration and respiration-associated proteins in cell lines created through Parkinson's subject mitochondrial transfer. / Esteves A.R., Lu J., Rodova M., Onyango I., Lezi E., Dubinsky R., Lyons K.E., Pahwa R., Burns J.M., Cardoso S.M., Swerdlow R.H. // *Journal of neurochemistry* – 2010. – V. 113 – № 3 – P.674–82.
362. Harmuth T. Mitochondrial Morphology, Function and Homeostasis Are Impaired by Expression of an N-terminal Calpain Cleavage Fragment of Ataxin-3. / Harmuth T., Prell-Schicker C., Weber J.J., Gellerich F., Funke C., Drießen S., Magg J.C.D., Krebiehl G., Wolburg H., Hayer S.N., Hauser S., Krüger R., Schöls L., Riess O., Hübener-Schmid J. // *Frontiers in molecular neuroscience* – 2018. – V. 11 – P.368.
363. Yoshino H. Mitochondrial complex I and II activities of lymphocytes and platelets in Parkinson's disease. / Yoshino H., Nakagawa-Hattori Y., Kondo T., Mizuno Y. // *Journal of neural transmission. Parkinson's disease and dementia section* – 1992. – V. 4 – № 1 – P.27–34.
364. Hipkiss A.R. On the Relationship between Energy Metabolism, Proteostasis, Aging and Parkinson's Disease: Possible Causative Role of Methylglyoxal and Alleviative Potential of Carnosine. / Hipkiss A.R. // *Aging and disease* – 2017. – V. 8 – № 3 – P.334–345.
365. Zhang J. Clinical features of MELAS and its relation with A3243G gene point mutation. / Zhang J., Guo J., Fang W., Jun Q., Shi K. // *International journal of clinical and experimental pathology* – 2015. – V. 8 – № 10 – P.13411–5.

366. Milyukhina I.V. Clinical parameters and the level of certain cytokines in blood and cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease / Milyukhina I.V., Karpenko M.N., Klimenko V.M. // *Klinicheskaja meditsina* – 2015. – V. 93 – № 1.
367. Karpenko M.N. Interleukin-1 β interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-6, interleukin-10, and tumor necrosis factor- α levels in CSF and serum in relation to the clinical diversity of Parkinson's disease / Karpenko M.N., Vasilishina A.A., Gromova E.A., Muruzheva Z.M., Bernadotte A. // *Cellular Immunology* – 2018. – V. 327.
368. Araújo Boleti A.P. de Neuroinflammation: An overview of neurodegenerative and metabolic diseases and of biotechnological studies. / Araújo Boleti A.P. de, Oliveira Flores T.M. de, Moreno S.E., Anjos L. Dos, Mortari M.R., Migliolo L. // *Neurochemistry international* – 2020. – V. 136 – P.104714.
369. Virgilio A. De Parkinson's disease: Autoimmunity and neuroinflammation. / Virgilio A. De, Greco A., Fabbrini G., Inghilleri M., Rizzo M.I., Gallo A., Conte M., Rosato C., Ciniglio Appiani M., Vincentiis M. de // *Autoimmunity reviews* – 2016. – V. 15 – № 10 – P.1005–11.
370. Gutierrez E.G. Blood-borne interleukin-1 receptor antagonist crosses the blood-brain barrier. / Gutierrez E.G., Banks W.A., Kastin A.J. // *Journal of neuroimmunology* – 1994. – V. 55 – № 2 – P.153–60.
371. Herculano-Houzel S. The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. / Herculano-Houzel S. // *Glia* – 2014. – V. 62 – № 9 – P.1377–91.
372. Morello M. Sub-cellular localization of manganese in the basal ganglia of normal and manganese-treated rats An electron spectroscopy imaging and electron energy-loss spectroscopy study. / Morello M., Canini A., Mattioli P., Sorge R.P., Alimonti A., Bocca B., Forte G., Martorana A., Bernardi G., Sancesario G. // *Neurotoxicology* – 2008. – V. 29 – № 1 – P.60–72.
373. Jackson T.C. Pharmacological inhibition of pleckstrin homology domain leucine-rich repeat protein phosphatase is neuroprotective: differential effects on

astrocytes. / Jackson T.C., Verrier J.D., Drabek T., Janesko-Feldman K., Gillespie D.G., Uray T., Dezfulian C., Clark R.S., Bayir H., Jackson E.K., Kochanek P.M. // *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* – 2013. – V. 347 – № 2 – P.516–28.

374. Lee M. Neurotransmitters and microglial-mediated neuroinflammation. / Lee M. // *Current protein & peptide science* – 2013. – V. 14 – № 1 – P.21–32.

375. Nelson M. Manganese toxicity is targeting an early step in the dopamine signal transduction pathway that controls lateral cilia activity in the bivalve mollusc *Crassostrea virginica*. / Nelson M., Adams T., Ojo C., Carroll M.A., Catapane E.J. // *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP* – 2018. – V. 213 – P.1–6.

376. Dolga A.M. TNF-alpha-mediates neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity via NF-kappaB-dependent up-regulation of K2.2 channels. / Dolga A.M., Granic I., Blank T., Knaus H.-G., Spiess J., Luiten P.G.M., Eisel U.L.M., Nijholt I.M. // *Journal of neurochemistry* – 2008. – V. 107 – № 4 – P.1158–67.

377. Scherbel U. Differential acute and chronic responses of tumor necrosis factor-deficient mice to experimental brain injury. / Scherbel U., Raghupathi R., Nakamura M., Saatman K.E., Trojanowski J.Q., Neugebauer E., Marino M.W., McIntosh T.K. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 1999. – V. 96 – № 15 – P.8721–6.

378. Han D. Proteostasis of α -Synuclein and Its Role in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. / Han D., Zheng W., Wang X., Chen Z. // *Frontiers in cellular neuroscience* – 2020. – V. 14 – P.45-56.

379. Tang B.L. Glucose, glycolysis, and neurodegenerative diseases. / Tang B.L. // *Journal of cellular physiology* – 2020. – V. 235 – № 11 – P. 7653-7662.

380. Burguillos M.A. Apoptosis-inducing factor mediates dopaminergic cell death in response to LPS-induced inflammatory stimulus: evidence in Parkinson's disease patients. / Burguillos M.A., Hajji N., Englund E., Persson A., Cenci A.M., Machado A., Cano J., Joseph B., Venero J.L. // *Neurobiology of disease* – 2011. – V. 41 – № 1 – P.177–88.