ОГЛЯДИ

УДК 577.156

КАЛЬПАЇНИ: ХАРАКТЕРИСТИКА ТА РОЛЬ ЗА РІЗНИХ СТАНІВ ОРГАНІЗМУ

М. Ф. СТАРОДУБ[1], Л. М. САМОХІНА[2], С. М. КОВАЛЬ[2], І. О. СНІГУРСЬКА[2]

[1]Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ;
e-mail: nikstarodub@yahoo.com;
[2]ДУ «Національний інститут терапії ім. Л. Т. Малої НАМН України», Харків;
e-mail: lub.samokhina@yandex.ua

Огляд присвячено кальпаїнам – сімейству цитоплазматичних кальційзалежних протеїназ з папаїноподібною активністю, які беруть участь у різноманітних процесах, що відбуваються в організмі: за вікових змін, у функціонуванні ендотелію та легеневої системи, регуляції апоптозу та некрозу, розвитку різних гіпометаболічних станів, гіпертензії, а також при діабеті, хронічній хворобі нирок і пухлинному рості. Дійшли висновку, що кальпаїни, спричиняючи обмежений протеоліз субстратів, відіграють важливу роль у реалізації широкого спектра біологічних явищ. Їх функціонування пов'язане з відповіддю на кальційзалежну сигналізацію. Пригнічення активності кальпаїнів сприяє гальмуванню розвитку дисфункції ендотелію, серцево-судинних ускладнень, формуванню структурних та функціональних змін у тканинах нирок, а також спричинює нейропротекторний ефект, запобігає саркопенії і послаблює запальні реакції, зумовлені гіпервентиляцією легенів.

Ключові слова: кальпаїни; вікові зміни; функціонування ендотелію; легенева функція; апоптоз; гіпометаболічні стани; кальпаїни за артеріальної гіпертензії, діабету, хронічної хвороби нирок, пухлинному рості.

Кальпаїни (3.4.22.17) – кальційзалежні протеїнази з папаїноподібною активністю – становлять сімейство цитоплазматичних цистеїнових ензимів, які активуються іонами кальцію. На сьогодні досягнуто значних успіхів у вивченні структурних, ензиматичних та функціональних характеристик кальпаїнів [1, 2]. Їх участь у клітинних процесах у нормі і за розвитку патології розглядається на різних рівнях функціонування живого – від молекулярних взаємодій до фізіологічних процесів в організмі. Однак існують невирішені питання, одним з яких є механізм активації кальпаїнів у живій клітині, в якій *in situ* рівень Ca^{2+} набагато нижчий, ніж це необхідно для виявлення основних властивостей цього типу ензимів: автолізу, протеолітичної активності та регуляції інгібітором. Невирішені питання пов'язані з необхідністю подальшого вивчення біологічної ролі великої кількості протеїнів сімейства кальпаїнів [3]. У літературі є значний об'єм інформації щодо цього сімейства, яка часто має суперечливий характер, а також є роздрібненою та невизначеною за низкою положень. Зважаючи на це, основною метою цього огляду було підсумувати наявні дані, провести їх аналіз, акцентуючи увагу на останніх досягненнях, що стосуються вивчення структури, властивостей, класифікації кальпаїнів, особливостей їх функціонування в організмі людини і тварин, а також ролі в настанні вікових змін та розвитку патології внутрішніх органів.

Загальна характеристика кальпаїнів

Кальпаїни – внутрішньоклітинні Ca^{2+}-залежні тіолові протеїнази [4–7]. Більшість кальпаїнів у клітині протеолітично неактивні [2]. Їх активність регулюється шляхом зміни концентрації Ca^{2+} та кальпастатину – їх основного інгібітору. За допомогою протеолізу

субстратів вони відіграють важливу роль у широкому спектрі біологічних явищ [5], здійснюють обмежене розщеплення протеїнів-мішеней у відповідь на кальційзалежну сигналізацію [4, 8, 9] та продукують не короткі пептиди або амінокислоти, а великі поліпептидні фрагменти [2].

Назва кальпаїни історично належить протеїназам, які активуються за участю Ca^{2+} і чия основна структура містить Ca^{2+}-зв'язуючу пента-EF-ланку, а також кальпаїновий домен цистеїнової протеїнази (CysPc) і C2-домен (C2L) [10]. У геномі людини CysPc кодується 15 генами, але тільки дев'ять із них кодують пента-EF-ланку [5, 10]. Генетичні дефекти в генах кальпаїнів призводять до летальності та/або функціонального дефіциту в багатьох організмів, включаючи людину [5].

Кальпаїни локалізовано в цитозолі і мітохондріях [11]. Вважають, що 93% їх кількості локалізовано в цитозолі еритроцитів людини, а 7% – зв'язано з плазматичною мембраною [2]. Останні якраз і є ензиматично активними. Значна частина кальпаїнів у цитоплазмі клітини зв'язана із субклітинними структурами. У скелетних м'язах – це міофібрили, тоді як в інших клітинах – волокна цитоскелета (актин).

Цікавим є те, що деякі кальпаїни людини, особливо з некласичною доменною структурою, дуже схожі на кальпаїни, виявлені в еволюційно далеких організмів [7]. Гриби і дріжджі мають кальпаїнподібні послідовності без пента-EF-ланки. Такі протеїни позначені, як PalB і Rim13 відповідно. Вони гомологічні до кальпаїну-7 людини, причому останній є еволюційно консервативнішим, ніж класичні кальпаїни, що містять пента-EF-ланку [10]. N-кінець кальпаїну-7 має тандемний повтор доменів, які взаємодіють з ендосомним комплексом, необхідним для транспортування протеїнів. Окрім кальпаїнів, пента-EF-ланки знайдено і в інших Ca^{2+}-зв'язуючих протеїнах, включаючи ALG-2 і ген сприйнятливості пухлин 101.

Тривимірний структурний аналіз допоміг визначити унікальний механізм активації кальпаїнів [7]. Вони складаються із двох основних областей, які взаємодіючи, утворюють функціональні протеїнази тільки тоді, коли зв'язуються з Ca^{2+}. Два найпоширеніших і дослідженіших члени цієї родини у ссавців відповідають μ- та m-кальпаїнам (або кальпаїнам 1 і 2), які є гетеродимерами та ізоформами у вигляді великої та малої субодиниць із масою 80 та 28 кДа [4, 12]. Останню називають «регуляторною», оскільки вона необхідна для правильного фолдінгу великої субодиниці [2].

Згідно із кристалографічним аналізом доменна структура кальпаїнів людини включає 6 EF-ланок у великій і 5 – у малій субодиниці (рис.). Одним є NH_2-кінцевий домен, другим – домен із Cys-залишком у положенні 115 (μ-кальпаїну) або 105 (m-кальпаїну), який є активним сайтом і з His у положенні 272 (μ-кальпаїну) або 262 (m-кальпаїну) і Asn у положенні 296 (μ-кальпаїну) або 286 (m-кальпаїну), утворюючи каталітичні тріади, такі як у папаїні або катепсинах B, L або S.

Схематична діаграма показує доменну структуру μ- і m-кальпаїнів людини згідно з їх амінокислотною послідовністю; для m-кальпаїну людини кристалографічним аналізом визначено шість EF-ланок в субодиниці 80 кДа і п'ять EF-ланок в субодиниці 28 кДа, які позначені у вигляді вертикальних стовпчиків. Кристалографічна структура m-кальпаїну вказує на те, що шоста EF-ланка відрізняється в амінокислотній послідовності, кордон доменів II/III не має EF-ланки.

Третій домен об'єднує Ca^{2+}-зв'язуючі ланки молекули в каталітичну область (II) і своєю участю в електростатичних взаємодіях може бути залучений до зв'язування фосфоліпідів і регулювання активності кальпаїну. Цей домен також містить дві EF-ланки. Четвертий домен незначно гомологічний кальмодуліну (24–44%) і має 51–54% подібності серед μ- і m-кальпаїнів. Він містить чотири набори послідовностей, які є предикторами EF-ланок Ca^{2+}-зв'язуючих сайтів. Цей домен у m-кальпаїну людини починається з 530 амінокислотного залишку і включає EF-ланки 541–552-залишків. У 80 кДа-субодиниці він має п'ять EF-ланок, причому COOH-кінцеві групи беруть участь у димеризації 28 і 80 кДа субодиниць.

Відзначено тканиноспецифічну локалізацію кальпаїнів, наприклад, m-кальпаїни не виявлено в тромбоцитах і еритроцитах людини, а μ-кальпаїни відсутні в тромбоцитах бика, гладких м'язах шлунка і судин індичок. Скелетні м'язи домашніх тварин містять приблизно однакову кількість μ- і m-кальпаїнів і надлишок

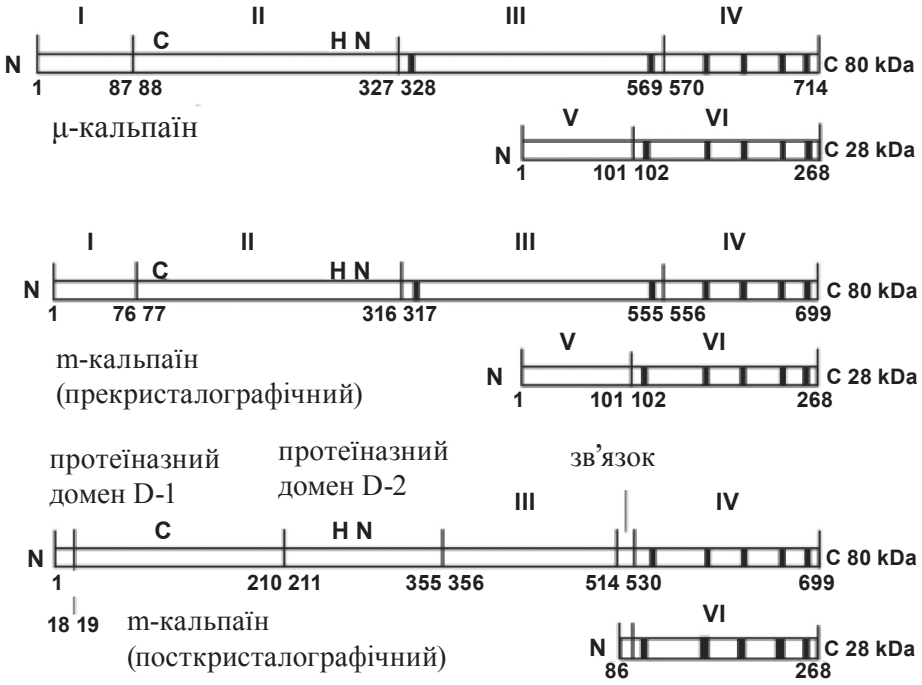

Схема доменної будови типових кальпаїнів людини [2, 9]

кальпастатину, який перевищує активність двох кальпаїнів разом, але не у всіх клітинах або тканинах.

У процесі активації кальпаїнів зв'язується до десяти іонів Са [4, 12]. При цьому окремі домени змінюють свою позицію по відношенню один до одного, оптимізуючи структуру активного центру. Взаємодія між різними регіонами всієї молекули кальпаїну потрібна для його повної протеолітичної активації [13]. С-кінці обох субодиниць, від послідовностей 503–506 і до кінця 80 кДа-субодиниці, а також від 85–88 до кінця 28 кДа-субодиниці, стійкі до деградації протеїназами в присутності або за відсутності Ca^{2+}, тобто ця частина молекули кальпаїну є компактною структурою.

Терміни μ-кальпаїн і m-кальпаїн використовують для характеристики мікро- і мілімолярних Ca^{2+}-залежних протеїназ відповідно [2]. Показано, що μ-кальпаїни фосфорильовані за дев'ятьма сайтами, а m-кальпаїни – за вісьмома, що має структурне значення, оскільки фосфо-Tyr-залишки можуть брати участь у передачі сигналів.

Повідомляється [4, 12], що для досягнення половини максимальної активації μ- і m-кальпаїни, або кальпаїни 1 і 2, потребують ~ 30 і ~ 350 мкМ Ca^{2+} відповідно. У клітинах, в яких вміст Ca^{2+} знаходиться в діапазоні наномолярних концентрацій, для активації ензимів необхідні автопротеоліз, дисоціація, посттрансляційна модифікація або наявність допоміжних протеїнів. За відсутністю цих механізмів вважають можливим, що за нормальних умов кальпаїни, які тимчасово активуються за високої концентрації Ca^{2+} в мікрооточенні, потім повертаються в неактивний стан.

У різних видів організмів, від найпростіших до ссавців, послідовності кальпаїнів дуже варіюють [14]. Кальпаїни присутні на всіх етапах еволюції; знаходяться майже в усіх евкаріотів і в низці бактерій, окрім архібактерій [7]. Рослини мають єдиний «кальпаїновий» ген і цей ген кодує поліпептид, що містить трансмембранний домен [2]. Кальпаїни тварин переміщуються до плазматичної мембрани, де вони розщеплюють асоційовані з мембранами субстрати.

Кальпаїни основних еволюційних груп є типові та атипові, їх класифікують за філогенетичним принципом і диференціюють за наявністю кальмодулінподібного Ca^{2+}-зв'язуючого домену [2, 14]. «Типові» кальпаїни мають кальмодулінподібний домен на COOH-кінці [2], «нетипові» не мають його. Кальпаїн 10, наприклад, є атиповим, подібним до кальпаїнів 5 і 6. Ген кальпаїну 10 людини картований на

хромосомі 2q і виявляється у восьми різних ізоформах, які мають назви: кальпаїн 10a, 10б і так далі до 10h. Кальпаїн 10a найпоширеніший і експресується в серці (його рівні там найвищі), головному мозку, плаценті, легенях, печінці, скелетних м'язах, нирках, підшлунковій залозі, кришталиках і сітківці.

Препарати кальпаїнів одержують із різних тканин, скелетних і серцевих м'язів бика, плаценти і тромбоцитів людини. При цьому слід зазначити, що виділення кальпаїнів має низку обмежень, включаючи такі, що стосуються гомогенізації зразків тканин [15]. Це перешкоджає вивченню просторового розташування протеїназ і передбачає можливість їх взаємодії з ендогенними інгібіторами, які були збережені та просторово розділені в природних умовах. Крім того, деякі кальпаїни, наприклад 3a, виявляють дуже низьку протеолітичну активність, що обумовлено малою кількістю їх або недостатністю кофакторів, які втрачаються під час гомогенізації тканин і фракціонування [2].

Вміст мРНК і кількість протеїну слабо корелюють з активністю кальпаїнів, обмежуючи використання генетичних методів або виміру їх концентрації [8]. Використання похідної пропіонової кислоти, пов'язаної з казеїном у співвідношенні 8:1 моль або вище, може забезпечити аналіз протеолітичної активності кальпаїнів [16]. Цей метод має низку переваг, його легко адаптувати до мікроаналізу, тому він може бути використаний для скринінгу великої кількості зразків. Зазначений метод дозволяє виявляти до 10 нг (близько 5 нМ) кальпаїну. Він також слугує для загального аналізу протеолітичної активності і може бути використаний для дослідження будь-якої протеїнази, що розщеплює казеїн. Протеїни цитоскелета, наприклад, спектрин та інші, також є відмінними субстратами для кальпаїнів, проте вони не так легко доступні і значно дорожче казеїну [2].

Не менш чутливим є мікрометод визначення активності кальпаїнів, який базується на використанні як субстрат у протеолітичній реакції маркерного ензиму (пероксидаза хрону), імобілізованого на поверхні полістиролу, та попередньо кон`югованого із протеїновим субстратом (альбумін сироватки бика) [17]. При цьому активність кальпаїнів визначають як різницю між активністю протеїназ із додаванням $CaCl_2$ і цистеїну проти етилендіамінтетраацетату [18].

Під час дослідження активності кальпаїнів слід пам'ятати, що обидва μ-і m-кальпаїни швидко втрачають протеолітичну активність при температурі вище 25 °С [2]. Відомо, що активність m-кальпаїнів виявлено в разі використання казеїну як субстрату в умовах інкубації протягом 50 хв при 0 °С. Протеолітична активність кальпаїнів втрачається протягом 10 хв при 37 °С. Зменшення їхньої активності також відбувається при 30 °С. Разом з тим, вони втрачають активність швидше за концентрацій Ca^{2+}, що перевищують ті, які потрібні для половини максимальної швидкості реакції, і це пов'язують із можливим їх автолізом. Вважають, що за концентрації Ca^{2+} 1–5 мМ аналізи потрібно проводити при температурі нижче 30 °С протягом 20–30 хв або менше. Аналізи ж при температурі 30 °С або вище і за концентрації Ca^{2+} 1–5 мМ не мають відбуватися протягом більш ніж 10–15 хв бо точність визначення активності кальпаїнів буде поставлена під загрозу.

Простий метод дослідження активності протеїназ базується на флуоресцентному аналізі зрізів тканин в агарозному гелі, що забезпечує просторовий їх скринінг і знімає протеїнові взаємодії в гомогенаті [15]. Цей метод зберігає анатомічні характеристики тканини і просторовий розділ, достатній для оцінки активності протеїназ у клітинах та кровоносних судинах в межах тканини.

Роль кальпаїнів за різних станів організму

Кальпаїни беруть активну участь у таких фізіологічних процесах, як ремоделювання цитоскелета, регуляція експресії генів, передача сигналів, клітинний цикл, апоптоз та інших [2, 8]. Окремі функціональні властивості кальпаїнів, їх роль в основних клітинних процесах представлені в табл. 1.

Кальпаїни можуть виконувати ідентичні фізіологічні функції, але здатні реагувати на різні клітинні сигнали: вони мають дуже схожі, якщо не ідентичні особливості. Тромбоцити людини містять тільки μ-кальпаїни, а бичачі тромбоцити мають лише m-кальпаїни, але вони виконують однакові функції в клітинах [2].

Кальпаїни знаходяться виключно внутрішньоклітинно, за винятком патологічних або пошкоджених тканин. Вони можуть розщеплювати спектрин, беруть участь у деградації

Таблиця 1. Роль кальпаїнів у клітинних процесах

Клітинний процес	Роль кальпаїнів
Передача сигналів	Беруть участь в інтегринопосередкованих сигнальних шляхах, розщеплюють протеїни цитоскелета β-інтегрини на декількох сайтах із COOH-кінця цитоплазматичних доменів, що задіяні в зв'язуванні інтегринів із цитоплазматичними протеїнами таліном і філаміном [2]. Дія кальпаїнів призводить до втрати субмембранної мережі актину, до клітинної рухливості, ретракції фібрину. Рецепторопосередкована рухливість епідермального фактора росту вимагає активації фібробластів за участю m-кальпаїнів (на мембрані). AII / AT1-рецептори/кальпаїн-сигналізація віддзеркалює дисфункцію ендотелію та є важливим і раннім показником ступеня розвитку судинної патології [19]. AII/AT1-рецептор-сигналізація переважно активує ізоформи μ-кальпаїнів і кальпаїнзалежну деградацію IκBα. Кальпаїни є посередниками ангіогенних сигналів судинного ендотеліального фактора росту [20] і можуть впливати на передачу сигналів у процесах ремоделювання міокарда [21].
Клітинний цикл	Швидка втрата циклiну D1, пригнічення G1-стадії мітозу, коли μ-кальпаїн з'являється тимчасово в ядрі в G1-кінці [2]. Зниження рівня μ-кальпаїнів без змін відносно m-кальпаїнів і кальпастатину призводить до 50%-го збільшення часу подвоєння, що пов'язано із тривалою фазою G1. Мікроін'єкції кальпаїнів у профазні ядра ооцитів індукують мейоз. Прискорюється перехід G1 в S. Гальмування активності кальпаїнів збільшує тривалість стадії G1 і сприяє нейронній диференціації стовбурових клітин [22]. На стадії G1 активність кальпаїнів регулюється коливаннями концентрації кальцію, сприяючи прогресії клітинного циклу шляхом модуляції протеїнів. Видалення малої субодиниці кальпаїну Capn4 призводить до порушення прогресії клітинного циклу в хондроцитах, накопичення певних протеїнів клітинного циклу, відомих як субстрати кальпаїнів, а саме, циклін D, циклін E, p27, при цьому також відбувається зниження фосфорилування протеїнів ретинобластоми і p27.
Проліферація	*In vitro* позаклітинні кальпаїни збільшують проліферацію ендотеліальних клітин, міграцію і формування капілярної трубки [20].
Диференціювання клітин	Впливають на диференціацію остеобластів і хондроцитів, преадіпоцитів, в останньому разі – за рахунок гальмування активності [22]. За диференціювання клітин м'язів переміщуються в клітинні мембрани міобластів у відповідь на потік кальцію і беруть участь у злитті пов'язаних деградацією протеїнів.

різних протеїнів цитоскелета, протеїнкіназ і т.д. (табл. 2).

Кальпаїни задіяні в розвитку багатьох патологічних станів, у тому числі у виникненні серцевої недостатності, появі артеріальної гіпертензії, цукрового діабету, атеросклерозу, ішемії-реперфузії, фібриляції передсердь, застійної серцевої недостатності та за механічного навантаження [21]. Токсичність надмірного надходження Ca^{2+} сприяє пошкодженню нейронів після інсульту, травми, судоми [6]. Кальпаїни задіяні в розвитку м'язової дистрофії, раку, хворобі Альцгеймера і розсіяного склерозу [8, 9]. При цьому виділяють

Таблиця 1. Продовження

Міграція клітин і злиття мембран	Розщеплюють α- і β- актин у клітинах міосаркоми (RMS) – саркоми м'яких тканин, яка часто зустрічається в дітей [23]. Дезорганізують цитоскелет RMS. Можуть бути залучені в анархічну адгезію, міграцію і вторгнення RMS і розглядаються як маркери агресивності пухлини і потенційних мішеней для обмеження її розвитку, інвазивної поведінки і метастазів. Є позитивна кореляція між активністю кальпаїнів і швидкістю міграції. Міграція міобластів є ключовим етапом у міогенезі і регенерації, сприяє їх злиттю [24]. Стимуляція міобластів інсуліноподібним фактором росту збільшує базальний приплив Ca^{2+}, активацію кальпаїнів і прискорення міграції. У клітинах Т24 раку сечового міхура нетрансмембранний протеїн тирозинфосфатаза піддається кальційзалежній деградації [25]. Його активність зв'язана з функціонуванням сигнальних шляхів, які беруть участь у регуляції клітинної міграції та вторгнення, що може призвести до придбання пухлинними клітинами агресивного фенотипу. Протеоліз актинзв'язуючого протеїну – багатої на аланін С-кінази є кальпаїнзалежним і може бути задіяний до процесу адгезії міобластів і міграції [26]. У злитті міобластів бере участь m-кальпаїн [27].
Апоптоз	Розщеплюють α-спектрин, каспази-7, -8, -9, разом з тим, розщеплення каспази-7 і -9 інактивує їх [2]. m-Кальпаїни генерують активну каспазу розщепленням прокаспази-12, змінюючи антиапоптотичну молекулу на проапоптотичну. Можуть виступати як негативні регулятори апоптозу шляхом інактивації каспаз і позитивного регулятора апоптозу на додаток до деградації протеїнів цитоскелета. Кальпаїни захищені від апоптозу, індукованого фактором некрозу пухлин-α. Апоптоз у тромбоцитах людини ініційований μ-кальпаїнами, а не каспазами.
Формування м'язових волокон	В умовах збиткової експресії μ-кальпаїнів міофібрили утворюються поблизу периферії клітин, як правило, орієнтовані вздовж продольної осі. Ця закономірність поступово втрачається до центру клітин, де збільшена дезорганізація цитоскелета. μ-Кальпаїни регулюють міогенез за рахунок дії на езрин, віментин, кавеолін 3 і міогенін, фактор транскрипції м'язів [27].

роль кальпаїну 3 в розвитку м'язової дистрофії кінцівок, кальпаїну 9 – в канцерогенезі і кальпаїну 10 – при діабеті 2-го типу [2].

Незважаючи на біологічне і патогенетичне значення кальпаїнів, механізми, що лежать в основі їх дії залишаються значною мірою невідомими. Але разом з тим вони приваблюють дослідників як потенційні фактори в терапевтичних процедурах [28]. Регуляція діяльності кальпаїнів є складним і не до кінця зрозумілим процесом [8]. Тому останнім часом особливу увагу приділяють вивченню клінічного значення активації кальпаїнів [4].

За останні роки відомості літератури поповнились даними про роль кальпаїнів за таких станів організму: за його вікових змін, у функціонуванні ендотелію та легеневої системи, регуляції апоптозу та некрозу, розвитку різних гіпометаболічних станів, артеріальної гіпертензії, діабету та хронічної хвороби нирок, за пухлинного росту. Такий різноманітний набір станів організму свідчить про всебічний характер участі кальпаїнів у забезпеченні його функціонування.

Кальпаїни за вікових змін організму

З віком поступово зменшується роль Ca^{2+}-АТРази плазматичної мембрани в синапсах [29]. Вона відіграє важливу роль у підтримці точного рівня внутрішньоклітинного Ca^{2+}, необхідного для функціонування нейронів. Ця АТРаза дуже чутлива до окислювального стре-

Таблиця 2. Деякі біологічні наслідки дії кальпаїнів на протеїни – мішені [58]

Протеїни – мішені кальпаїнів	Біологічні наслідки дії кальпаїнів
Анексин I	Підвищення чутливості до Ca^{2+}
Фібронектин	Утворення фрагментів із проангіогенною потужністю [20]
Зв'язуючий протеїн 4 інсулінподібного фактора росту (IGFBP4)	Зниження захвату інсулінподібного фактора росту [58]
Інтерлейкін 1α	Дозрівання і секреція
Спектрин α (α-фордін)	Старіння, хвороба Альцгеймера [30]
Спектрин β	Реорганізація цитоскелета [58]
Талін 1	Перерозподіл талінфункціонального домену
Тропоміозин	Деградаційні зміни в міофібрилах скелетних м'язів. Сприяє стійкості тонких і товстих ниток [2]
Тропонін Т і І	
С-протеїн	
Кінази і фосфатази саркоплазматичної фракції і деякі із сигнальних молекул строми	М'язова деградація
Каспаза 9	Інактивація [58]
Рецептор епідермального фактора росту	Down-регулювання
NFκB-інгібітор α (IκBα)	Активація NFκB
B1-Інтегрини 2, 3, 7	Дисоціація від цитоскелета
Тайтин і небулін	Руйнують їх спорідненість до протеїнів Z-диска, деградаційні зміни [2]
Десмін	Деградаційні зміни
Протеїни проміжних ниток десміну, протеїни Z-дисків	М'язова деградація
α-Актинін	Z-диск зникає, залишаючи простір у міофібрилах, що призводить до значної атрофії м'язів
Каспази 7, 9	Активація [58]
Міозин і актин	Деградаційні зміни в міофібрилах скелетних м'язів [2]
Віментин	Закріплення органел і підтримання їх положення в цитоплазмі, що забезпечує міцність клітин і їхню стійкість до механічного стресу. Регуляція міогенезу μ-кальпаїнами
Протеїнкінази С α, β, γ	Активація [58]
Na^+/Ca^{2+}-обмінник мітохондрій	Мітохондріальне накопичення Ca^{2+} [11]
Септин-5 тромбоцитів	Порушує його зв'язок із синтаксином-4 і сприяє змінам експресії і секреції Т-клітин [60]
Тирозинфосфатаза	Порушення функціонування сигнальних шляхів, які беруть участь у регуляції клітинної міграції та вторгнення, що може призвести до придбання агресивнішого фенотипу пухлинних клітин [25]
Езрин, кавеолін 3 і міогенін	Регуляція біогенезу [27]

су та функціонально і структурно змінюється під його впливом. Основною окислювальною модифікацією є її швидка інактивація, конформаційні зміни, агрегація, протеолітична деградація. Вважають, що функціонування цього ензиму опосередковано кальпаїнами і каспазами. При цьому слід відзначити, що кальпаїни поширені в тканині мозку й їхня діяльність сприяє і нормальній, і аномальній його функції [15]. Експериментальне зниження експресії Ca^{2+}-АТРази плазматичної мембрани не лише змінює динаміку клітинного захвату Ca^{2+}, але й саму функцію клітин. Вік і регулювання Ca^{2+}-АТРази, що пов'язано з окисленням, може відігравати важливу роль у порушенні функції нейронів у процесі старіння мозку і в підвищенні сприйнятливості до нейродегенеративних розладів, таких як хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона та інсульт. Вважають, що в мозку під час старіня та за хвороби Альцгеймера може відбуватися порушення протеїнового обміну в мембранах нейронів через кальційзалежний механізм і/або підвищення кальційчутливого протеолізу [2, 30]. Кальпаїни як і каспази можуть протеолітично руйнувати спектрини, протеїни внутрішньоклітинної поверхні плазмалеми, які відіграють важливу роль у підтримці стабільності і гнучкості цитоскелета [30]. Як наслідок утворюються продукти розпаду α-спектрину різних молекулярних розмірів. Продукти розпаду α-спектрину є передбачуваними біомаркерами черепно-мозкової травми. Вміст продуктів розпаду α-спектрину також підвищений в мозку за старіння, хвороби Альцгеймера. Розщеплюється α-спектрин (α-фордін) мозку μ-кальпаїнами [2]. Блокування активації кальпаїнів із використанням інгібітору А-705253 зменшує залежно від дози реакцію астроцитів і мікроглії, пов'язану з патологічними характеристиками хвороби Альцгеймера в старих мишей [31]. Показано, що в умовах β-амілоїдіндукованої нейродегенерації в щурів, пригнічення активності кальпаїнів має нейропротекторний ефект [32].

Старіння також пов'язане із прогресивною і ненавмисною втратою м'язової маси, відомою як саркопенія [33, 34]. Це серйозна проблема для її терапії [34]. Молекулярні механізми цього захворювання до сьогодні залишаються неясними. Саркопенія значно знижується у разі м'язової специфічної гіперекспресії кальпастатину, ендогенного інгібітору кальпаїнів [33]. Відомо, що кальпаїни залучені як до фізіологічних процесів м'язового росту і диференціації, так і до розвитку патологічних станів, таких як м'язова дистрофія [9, 34]. Внутрішньоклітинна концентрація вільного Ca^{2+} підвищена за м'язової дистрофії та інших патологій м'язів, і це стимулює активність кальпаїнів [9]. Кальпаїни зумовлюють деградаційні зміни в міофібрилах скелетних м'язів. Відомо також, що кальпаїни не руйнують міозин чи актин, два основних протеїни скелетних м'язів міофібрил, але m-кальпаїни розщеплюють тропоміозин, тропонін Т і І, а також С-протеїн [2]. Кальпаїни швидко здійснюють їх протеоліз і це сприяє стійкості тонких і товстих ниток відповідно. Вони, проте, розщеплюють міозин і актин, два основних протеїни у поперечно-смугастих м'язах.

М'язова тканина складається із протеїнів трьох класів: 1) саркоплазматичні або цитоплазматичні протеїни (~ 30–35% від загального протеїну м'язів), 2) міофібрилярні або скоротливі протеїни (~ 55–60%) 3) протеїни строми (10–15%) включені в мембрани і мембранні рецептори, в саркоплазматичну фракцію. Роль кальпаїнів в м'язовій деградації протеїнів пов'язують, головним чином, з міофібрилами або протеїнами цитоскелета. З відомих протеїнів міофібрил кальпаїни швидко розщеплюють тайтин і небулін на ділянках поблизу Z-диска в поперечно-смугастих м'язах, тим самим руйнуючи їх спорідненість до протеїнів Z-диска. Кальпаїни можуть розщеплювати багато кіназ і фосфатаз проміжних ниток десміну. Отже, протеїни Z-дисків, у тому числі α-актинін, вивільнюються, і Z-диск зникає, залишаючи простір у міофібрилах, що призводить до значної атрофії м'язів.

Віментин – протеїн проміжних філаментів сполучних тканин й інших тканин мезодермального походження, який прикріплюється до ядра, ендоплазматичного ретикулума та мітохондрій, і відіграє значну роль у закріпленні органел, підтриманні їх положення в цитоплазмі, забезпечує міцність клітин і їхню стійкість до механічного стресу. Він також є субстратом m-кальпаїнів.

Слід зазначити, що в літніх (106 тижнів) самців мишей лінії C57BL/6J після теплового стресу (41 °C протягом 60 хв без анестезії) вміст протеїну у відносному складі волокон II типу

скелетних камбаловидних м'язів задніх кінцівок нижче, ніж у молодих (7-тижнів) [35]. При цьому відсутні відмінності в рівнях експресії кальпаїнів 1 і 2, що пов'язують із терміном дослідження після стресу. За 7 днів зміни можуть набути зворотного характеру.

Ключовими партнерами кальпаїнів під час м'язового старіння є α-субодиниця АТР-синтази та α-актинін 3 [34]. Передбачаючи таку взаємодію можна допустити і те, що кальпаїни беруть участь у багатьох змінах під час старіння, в тому числі в дезорганізації цитоскелета і мітохондріальній дисфункції. Розщеплення кальпаїнами специфічних структурних та регуляторних протеїнів у міофібрилах перешкоджає ковалентній модифікації кальпаїнами оксиду азоту (NO) через S-нітрозилювання [33]. Вважають, що кальпаїни в м'язах дорослих S-нітрозильовані, але старіння призводить до втрати таких форм. Припускають, що зниження рівня S-нітрозилювання в процесі старіння призводить до збільшення кальпаїнопосередкованого протеолізу міофібрил. Крім того, старіння м'язів супроводжується втратою нейрональної NO-синтази. Її компенсація відновлює кальпаїн-S-нітрозилювання за старіння м'язів і запобігає саркопенії.

Слід відзначити, що м'язи, які розтягуються під час скорочення (ексцентричні скорочення), мають дефіцит сили і різні структурні зміни, в тому числі втрачають протеїни цитоскелета [36]. Після ексцентричних скорочень знижується жорсткість м'язів. При цьому відзначають роль надходження позаклітинного Ca^{2+} і активації кальпаїнів у клітинах. μ-Кальпаїни активуються з появою продуктів автолізу, що мають низьку молекулярну масу, вже через 30 хв після 10 ексцентричних скорочень, при цьому м'язоспецифічний кальпаїн-3 не детектується.

Молекули актину, міозину та поліпептидні фрагменти, одержані внаслідок деградації кальпаїнами тайтину, небуліну, десміну, тропоніну, тропоміозину і С-протеїну, можуть бути убіквітиновані і деградувати до амінокислот або, можливо, також безпосередньо погіршуватися лізосомальними катепсинами [2]. По-друге, незважаючи на порушення Ca^{2+} гомеостазу дистрофічних м'язів, ішемію або інше, кальпаїнзалежні патології призводять до збільшення внутрішньоклітинної концентрації цього катіона. Це збільшення не є достатнім для підтримки активності кальпаїнів безпосередньо. Внутрішньоклітинна концентрація вільного Ca^{2+} 10–50 мкМ (μ-кальпаїни) або 400–800 мкМ (m-кальпаїни) призведе до негайної смерті клітини незалежно від будь-якого впливу кальпаїнів.

Маркерний протеїн старіння (SMP30), також відомий як регукальцин (цитозольний протеїн з масою 34 кДа), відіграє важливу роль у гомеостазі внутрішньоклітинного Ca^{2+}, біосинтезі аскорбінової кислоти, окислювальному стресі та детоксикації отруйних речовин нервів [37]. Дослідження з використанням низькомолекулярних інгібіторів протеолізу виявили потенційну участь β і γ-секретаз, але не кальпаїнів, лізосомних протеїназ, протеасоми та каспаз у регуляції діяльності регукальцину.

Кальпаїни у функціонуванні ендотелію

Кальпаїни мають відношення і до судинного ремоделювання сигнальних рецепторів AII 1-го типу (AT_1-рецептори). AII/AT_1-рецептори/кальпаїн-сигналізація віддзеркалює також дисфункцію ендотелію та є важливим і раннім показником ступеня розвитку судинної патології [19]. Субхронічне введення AII в дозі, яка не призводить до патологічного звуження судин у щурів і мишей, значно збільшує судинну активність кальпаїнів через AT_1-рецептор-сигналізацію. Прижиттєві мікроскопічні дослідження показують, що активація судинних кальпаїнів спричинює дисфункцію ендотелію з підвищенням взаємодії лейкоцитів з ендотелієм і проникності альбуміну в мікроциркуляцію. Вестерн-блот і імуногістохімічне дослідження підтвердили, що AII/AT_1-рецептор-сигналізація переважно активує ізоформи μ-кальпаїнів і кальпаїнзалежну деградацію IκBα поряд з активацією ядерного чинника kB молекул адгезії ендотеліальних клітин. Ці фізіологічні та біохімічні показники майже нормуються в природних умовах наступним гальмуванням AT_1-рецепторів або кальпаїнів.

Кальпаїни слугують і посередниками ангіогенних сигналів судинного ендотеліального фактора росту [20]. Для створення нової судинної мережі необхідна інтеграція ендотеліальних клітин [38]. Разом з тим, за патологічного ангіогенезу характерними є архітектурно дефектні, недостатньо інтегровані судини зі сліпими кінцями. Ці зміни індуковані

судинним ендотеліальним фактором росту. Активація кальпаїнів пов'язана з індукованою неоваскуляризацією та інтеграцією. У мишей з таким індукованим ангіогенезом ретровірусна трансдукція домінантно-негативного кальпаїну-I сприяє неоваскулярній інтеграції та формуванню просвіту, зменшенню сліпих кінців і поліпшенню судинної перфузії. Аналогічним чином також поліпшується й індукований судинним ендотеліальним фактором росту ангіогенез за помірних доз інгібітору кальпаїнів. Навпаки, ретровірусна трансдукція кальпаїну 1 (дикого типу) скасовує неоваскулярну інтеграцію та формування просвіту.

У трансгенних мишей, що експресують високі рівні кальпаїнспецифічного інгібітору – кальпастатину, виявляють значне зниження і внутрішньоклітинної, і позаклітинної активності кальпаїнів [20]. При цьому проангіогенні фактори – судинний ендотеліальний фактор росту і норадреналін – збільшують екстеріоризацію кальпаїнів, тобто вихід із клітин. *In vitro* позаклітинний кальпаїн збільшує проліферацію ендотеліальних клітин, міграцію і формування капілярної трубки. Ендотеліальну клітинну відповідь на позаклітинні кальпаїни пов'язують із розщепленням фібронектину, утворенням фрагментів фібронектину із проангіогенною потужністю. У природних умовах позаклітинний кальпастатин гальмує ангіогенез, у кальпастатин-трансгенних мишей з нефритом нирок розщеплення фібронектину обмежено.

В ендотеліальних клітинах Ca^{2+} перевантаження спричинює розщеплення Na^+/Ca^{2+}-обмінника мітохондрій кальпаїном 1, що призводить до мітохондріального накопичення Ca^{2+} [11].

Кальпаїни за функціонування легеневої системи

Механічна вентиляція легень із високим дихальним об'ємом індукує швидку (протягом декількох хвилин) і стійку активацію кальпаїнів і запалення легень, про що свідчать захват нейтрофілів, вивільнення фактора некрозу пухлин α та інтерлейкіну 6, легенева судинна проникність і формування набряку тканини [39]. Кальпаїни опосередковують активацію раннього запалення легенів через NO-синтаза/NO-залежне фосфорилування внутрішньоклітинних молекул адгезії 1 і захват нейтрофілів. Разом з тим, фармакологічне їх гальмування значно послаблює запальні реакції, зумовлені гіпервентиляцією легенів.

У пацієнтів із хронічним обструктивним захворюванням легень активність кальпаїнів знижена, що пов'язують із можливим окисленням цистеїну в активному центрі, а також із порушенням діяльності м'язів, ефективністю використання кисню та розвитком гіпоксемії [40].

Кальпаїни в регуляції апоптозу та некрозу

Кальпаїни беруть участь в регуляції апоптозу і некрозу [11]. Кінцевий наслідок хімічної токсичності – некротичну загибель клітин – довго вважали результатом простого токсичного втручання в їх життєдіяльність [41]. Розробка концепції запрограмованої клітинної смерті, або апоптозу, змінило цю точку зору. Пригнічення клітинної загибелі хімічними речовинами може призвести до гострої або хронічної токсичності. У багатьох випадках такі ефекти токсичних речовин опосередковуються порушеннями модуляції клітинного Ca^{2+}-гомеостазу та підвищеним утворенням активних форм кисню в мітохондріях і в інших компартментах. Каспази, кальпаїни, лізосомні протеїнази, ендонуклеази є основними чинниками загибелі клітин і вони нерідко функціонують одночасно під час апоптозу.

Не дивлячись на те, що кількість даних щодо важливої ролі сімейства кальпаїнів у запрограмованій смерті клітин продовжує наростати, розуміння механізмів їхніх функцій в апоптозі є ще далеко неповним [28]. Відомо, що кальпаїни причетні як до фізіологічної, так і патологічної загибелі клітин, особливо за різних злоякісних новоутворень і за порушення діяльності імунної системи [21, 28]. Вони спричинюють розпад сарколеми та саркомерів [21]. Зростає також обсяг даних про участь кальпаїнів в апоптозі у разі патології центральної нервової системи, серцево-судинних захворювань тощо [28]. Втрата Ca^{2+} сприяє розвитку смерті клітин [42]. Один із механізмів цього процесу пов'язаний з нерегульованою активацією різних Ca^{2+}-залежних ензимів, у тому числі кальпаїнів. Вони беруть участь у смерті кардіоміоцитів, зумовленої реперфузією, оскільки до активації ці ензими є нективними у зв'язку з кислим pH. В ішемічному міокарді збільшується іонна сила, що призводить до активації кальпаїнів.

Однак під час інфаркту відбувається порушення активації кальпаїнів і залучення широкого спектра протеїнів до розвитку скоротливої дисфункції і некротичної загибелі клітин різними механізмами, включаючи збільшення мембранної крихкості, подальше знецінення Na^+ і Ca^{2+}-обміну, мітохондріальної дисфункції. Гальмування активності кальпаїнів за вказаних умов має кардіопротекторний ефект.

Кальпаїни беруть участь у регуляції апоптозу нейтрофілів, що здійснюється через активацію проапоптогенних факторів і деградацію антиапоптогенних протеїнів [43]. При цьому спонтанний апоптоз нейтрофілів пов'язаний з поступовим збільшенням позаклітинного Ca^{2+}. Низька активність кальпаїнів асоціюється зі зменшенням концентрації вільного Ca^{2+} і зниженням апоптозу нейтрофілів.

В ендотеліальних клітинах перевантаження іонами Ca^{2+} призводить до кальпаїн 1-залежного розщеплення Na^+/Ca^{2+}-обмінника в мітохондріях, наслідком чого є накопичення Ca^{2+} [11]. Активований кальпаїн 1 спричинює вивільнення цитохрому *c*. Крім того, активоване кальпаїном 1 розщеплення Bid, зумовлює вивільнення цитохрому *c* і апоптоз. Кальпаїн 10 розщеплює електронно-транспортний ланцюг протеїнів, внаслідок чого знижується мітохондріальне дихання. Надмірна активація або пригнічення кальпаїну 10 призводить до дисфункції мітохондрій і апоптозу.

У клітинах нирок кальпаїни 1 і 2 стимулюють апоптоз і некроз шляхом розщеплення протеїнів цитоскелета, що збільшує проникність мембран. В кардіоміоцитах під час апоптозу, індукованого фактором некрозу пухлин-α, після перевантаження іонами Са кальпаїн 1 активує каспазу 3 і полі-ADP-рибозилювання.

Кальпаїни активуються і під час Bax-залежного апоптозу [6]. Вони беруть участь в активації проапоптозного фактора Bax, подальшого виходу з мітохондрій цитохрому *c* і активації каспази 3 [44]. Кальпаїни інактивують пов'язаний з Х-хромосомою інгібітор апоптозу із сімейства інгібіторів апоптозних протеїнів, які блокують обидва шляхи активації апоптозу (мітохондріальний і Fas-рецептор-опосередкований), завдяки прямому зв'язуванню і пригніченню ініціюючих і ефекторних каспаз.

Екзогенне (забруднене повітря) або ж ендогенне (системне) перевантаження міддю залежно від концентрації спричинює загибель клітин через диференціальну активацію кальпаїнів 1 і 2, каспази-3 і змінює різні проліферативні індекси в клітинах людини, одержаних із печінки (HepG2) і легень (A-549) [45]. Враховуючи, що Cu є каталітичним кофактором багатьох ензимів і бере участь в реакції Фентона, а саме в генерації активних форм кисню, наведені вище дані свідчать про можливу участь кальпаїнів в окислювальному стресі. Активацію кальпаїнів за аналогічних умов встановлено і внаслідок дії хлориду кобальту [46]. Але відзначають і відмінний характер змін активності кальпаїнів в умовах дії іонів важких металів, наприклад за дієтарної інтоксикації щурів HgI_2 або $Hg(NO_3)_2$. Показано, що активність цитозольних Ca^{2+}-активованих протеїназ (кальпаїнів 1 і 2) в печінці та нирках знижується, що залежить від розчинності солей та тривалості впливу [47]. На фоні порушення активації кальпаїнів відбувається пригнічення клітинної загибелі або залучення широкого спектра протеїнів до розвитку некротичної загибелі клітин різними механізмами, знижується інтенсивність апоптозу нейтрофілів, активуються інгібітори апоптозу або блокуються шляхи активації апоптозу.

Протилежність прояву активності кальпаїнів в умовах впливу іонів важких металів може бути обумовлена специфічним виявленням біологічної ролі окремих представників великої кількості протеїнів сімейства кальпаїнів і потребує подальшого вивчення.

Кальпаїни за різних гіпометаболічних станів

Активність кальпаїнів зростає в умовах штучного гіпометаболічного стану (ШГМС) у стовбурі мозку дорослих хом'яків-самців [48], що пов'язують з розвитком гіпоксії і клітинного ушкодження, індукцією апоптозу, обумовленого розвитком оксидативного стресу. При цьому зростання активності кальпаїнів може впливати на структури (пейсмекери) дихального, серцево-судинного центрів, на висхідну активуючу систему, відповідальну за організацію свідомості, більшість сенсорних шляхів, усі рухові шляхи, що передають сигнали управління від регуляторів півкуль головного мозку, на функції симпатичних і парасимпатичних еферентних волокон нейронів неспецифічних нервових центрів, які кодують функції усіх систем

організму. На ранньому етапі відновлення після ШГМС активність кальпаїнів зростає в легенях, що пов'язують із можливим впливом гіпоксії на напруженість у діафрагмі та зі зміною сили дихальних м'язів, розвитком втоми за збільшеної активації м'язів. На пізньому етапі відновлення активність кальпаїнів зростає у серці. Це, можливо, має місце за участю кальпаїну 1, який залучається до протеосомної деградації міокардіальних протеїнів. Аномальна акумуляція таких форм призводить до утворення автофагосом і дегенерації кардіоміоцитів із функціональною декомпенсацією, внаслідок чого розвивається серцево-судинна дисфункція [49].

Активність кальпаїнів зростає за умов адаптації, а саме зимової сплячки або природної гібернації в хом'яків у стовбурі мозку, легенях, печінці та нирках, що також розглядають як наслідок оксидативного стресу. Вона знижується в серці, що, в свою чергу, пов'язують із послабленням серцевої діяльності, яка повністю нормалізується на етапі відновлення організму [50]. Зимова сплячка тварин характеризується зниженням метаболізму, потреби в кисні та різким уповільненням серцевого ритму, які є елементами адаптаційного механізму управління вегетативним балансом усього організму [51].

У хворих із серцевою недостатністю, навпаки, відзначають зниження активності кальпаїнів у сироватці крові, що, можливо, є наслідком розвитку апоптозу [52]. Ключову роль у механізмах поступового зношення міокарда і розвитку його недостатності грає порушення енергоутворення в мітохондріях [53]. Компенсаторне посилення анаеробного гліколізу підвищує концентрацію іонів H^+, що порушує зв'язування іонів Ca^{2+} з міофібрилами через кальцій-рецепторний протеїновий комплекс і призводить до зниження скорочувальної здатності міокарда. Знижується ефективність кальцієвого насоса саркоплазматичного ретикулума, Na/Ca-обміну, сповільнюється відтік Ca^{2+} з міоплазми. Це може призводити до зниження рівня кальцію в крові, що прямо корелює з активністю кальпаїнів.

Кальпаїни в умовах артеріальної гіпертензії

Зниження активності кальпаїнів відзначають і в сироватці крові при гіпертонічній хворобі II стадії, що пов'язують із прискоренням апоптозу [54]. При цьому в сечі активність кальпаїнів підвищена, можливо, внаслідок розвитку патогенетичних змін у тканинах нирок.

Істотно знижується активність кальпаїнів і в умовах тривалого вживання алкоголю, що супроводжується зростанням артеріального тиску. Це пов'язують із прискореним розвитком вазоконстрикторних змін [55]. Гендерні особливості проявлення активності кальпаїнів стосуються того, що в щурів-самців, порівняно із самками, активність кальпаїнів вище в сироватці крові, тканинах легень, печінки та нирок, що й обумовлює більшу виразність змін у разі тривалого вживання алкоголю саме в самців.

Цікавим є той факт, що кальпаїни здатні захищати серце від гемодинамічних навантажень, передусім підвищення тиску [56]. У цьому аспекті, окрім кальпаїнів 1 і 2, звертають увагу на роль регуляторного кальпаїну 4. У кальпаїн 4-дефіцитних мишей, виведених для з'ясування ролі кальпаїнів у серці, за гемодинамічного стресу виявляли зниження рівня кальпаїнів 1 і 2, інтерстиціальний фіброз після перевантаження тиском протягом одного тижня, руйнування плазматичних мембран у серці, розширення лівого шлуночка, скоротливу дисфункцію та серцеву недостатність. Основним механізмом прогресування останньої за різних патологій, включаючи гіпертонічну хворобу, кардіоміопатії й інфаркт міокарда, вважають, є ремоделювання серця, яке здійснюється за рахунок геометричних та структурних змін [57]. До такого ефекту може призводити збільшення активності кальпаїнів серед інших протеолітичних ензимів, таких як матриксні металопротеїнази, катепсини, каспази. Матриксні металопротеїнази і катепсини впливають на зміни позаклітинних структур, функціонування субклітинних органел в кардіоміоцитах, а активація каспаз, кальпаїнів спонукає субклітинні реконструкції поза серцем. Кальпаїни можуть впливати на передачу сигналів в процесах ремоделювання міокарда [21]. Внаслідок активації транскрипційних факторів, таких як ядерний фактор kB, кальпаїни можуть призводити до гіпертрофії міокарда і запалення. Активація кальпаїнів сприяє загостренню хвороби [58]. До того ж їх функціонування є важливим для процесу деградації протеїнів із підвищеною швидкістю [59]. І, навпаки, пригнічення активності кальпаїнів сприяє кардіопротекторному ефекту [42].

У кардіоміоцитах кальпаїн 1 активує каспазу 3 і полі-(ADP-рибоза)-полімеразу під час апоптозу, індукованого фактором некрозу пухлин-α, а кальпаїн 1 розщеплює апоптозіндукуючий фактор після Ca^{2+}-перевантаження [11].

Роль кальпаїнів у розвитку діабету та хронічної хвороби нирок

Активація кальпаїнів значною мірою опосередковує діабетіндуковану дисфункцію тромбоцитів [60]. Активація μ- і m-кальпаїнів у пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу призводить до зменшення кількості їх субстратів в тромбоцитах (септину-5 і інтегринпов'язаної кінази). Кальпаїнзалежне розщеплення септину-5 порушує його зв'язок із синтаксином-4 і сприяє змінам експресії і секреції Т-клітин.

Наявність вибіркової активації μ-кальпаїнів відзначають у щурів із діабетом 1-го типу, що пов'язують з участю протеїнкінази С [61]. Функціональними наслідками цієї активації є зростання ендотеліальної експресії молекул міжклітинної адгезії-1 і взаємодія лейкоцитів з ендотелієм. Поліморфізм генів кальпаїну 10 пов'язаний з резистентністю до інсуліну і діабетом 2-го типу [2]. Кальпаїн 10 впливає на секрецію інсуліну, його дію, виробництво глюкози в печінці – на процеси, що змінюються в пацієнтів із цукровим діабетом 2-го типу. Вказують на глюкозоіндуковану втрату кальпаїну 10, що в природних умовах призводить до апоптозу клітин нирок та органної недостатності, зумовленої накопиченням його субстратів у мітохондріях, і мітохондріальної дисфункції [62]. Можливо це обумовлено тим, що більшість кальпаїнів є цитозольними, а кальпаїн 10 – мітохондріальною протеїназою, яка відіграє важливу роль у гомеостазі цих органел.

У клітинах нирок, кальпаїни 1 і 2 стимулюють апоптоз і некроз шляхом розщеплення протеїнів цитоскелета, що збільшує проникність мембран плазми та розщеплення каспази [11].

При хронічній хворобі нирок активність кальпаїнів зростає і в сироватці крові, і в сечі, що вказує на інтенсивність протеолізу, розвиток і прогресування структурних і функціональних порушень в цих органах.

У людей із хронічною хворобою нирок підвищення активності кальпаїнів на фоні характерного для цих хворих зростання концентрації кальцію може обумовлювати збільшення інтенсивності і розмірів коронарної кальцифікації порівняно із серцево-судинними захворюваннями [63]. Відзначають також, що за дії хемотаксичних пептидів та інших стимуляторів кальпаїни здатні брати участь в активації нейтрофілів, що може сприяти розвитку тканинного ушкодження, обумовленого наявністю систем, які генерують супероксид-аніон і гідролітичні ензими. Зростання активності кальпаїнів у сироватці крові у хворих із діабетичною нефропатією пов'язують із переходом до формування структурних та функціональних змін у тканинах нирок, розвитком гломерулярних змін із потовщенням базальної мембрани, зростанням мезангіального матриксу, розвитком дифузного та вузликового інтеркапілярного гломерулонефриту, що чітко виявляється лише на протеїнурічній стадії захворювання [64]. Зростання активності кальпаїнів у сечі є характерним для хворих із хронічним гломерулонефритом, що обумовлено аномальною трансгломерулярною секрецією протеїнів плазми, тубулярною секрецією. Активність кальпаїнів може сприяти збільшенню протеїнурії, пригнічувати експресію нефрину, призводити до формування імунного гломерулярного пошкодження.

Використання інгібіторів ангіотензинперетворюючого ензиму та антагоністів рецепторів AII 1-го типу у хворих із хронічним пієлонефритом призводить до зниження активності кальпаїнів лише в сироватці крові [63]. Висока активність їх у сечі для цієї категорії хворих може свідчити про формування структурних та функціональних змін у ниркових тканинах, корекція яких потребує використання препаратів цитопротекторної дії. У хворих із хронічним гломерулонефритом ця терапія приводить до зростання активності кальпаїнів у сироватці крові та до зниження їх рівня в сечі, що може бути пов'язано зі зменшенням аномальної трансгломерулярної секреції протеїнів плазми та рівня тубулярної секреції.

Кальпаїни за пухлинного росту

Проточна цитометрія фіксованих і живих 32 DKIT лейкозних клітин мишей, поодинці або в загальному складі структурних елементів селезінки корелює з підвищеною активністю кальпаїнів порівняно з нормальними спленоцитами [8]. Враховуючи, що кальпаїни надмірно

експресуються в деяких пухлинах, особлива увага приділяється їх участі у деградації нетрансмембранного протеїну тирозинфосфатази [25]. Функціонування цього протеїну стосується сигнальних шляхів, які беруть участь у регуляції клітинної міграції та вторгнення, що може призвести до придбання агресивнішого фенотипу пухлинних клітин. У клітинах Т24 раку сечового міхура нетрансмембранний протеїн тирозинфосфатази піддається кальційзалежній деградації, і вона може бути відвернена дією специфічних інгібіторів. Обробка клітин інгібітором кальпаїнів – кальпептином призводить до перерозподілу ендогенного нетрансмембранного протеїну тирозинфосфатази до периферії клітин.

Підсумовуючи викладений матеріал, можна стверджувати, що кальпаїни за допомогою обмеженого протеолізу їхніх субстратів відіграють важливу роль у широкому спектрі біологічних явищ. Їх функціонування пов'язане з відповіддю на кальційзалежну сигналізацію з ефектами старіння. Пригнічення активності кальпаїнів сприяє гальмуванню розвитку дисфункції ендотелію, серцево-судинних ускладнень, формування структурних та функціональних змін у ниркових тканинах, має нейропротекторний ефект, запобігає саркопенії, послаблює запальні реакції, спричинені гіпервентиляцією легенів і сприяє запобіганню переродження пухлини на агресивнішу.

Ця інформація може бути основою для розробки терапевтичних підходів корекції кальпаїнопосередкованого протеолізу. Кальпаїни можуть бути потенційною мішенню для корегування розвитку різних патологічних станів організму.

Невирішені питання стосуються використання більшості інгібіторів кальпаїнів, які є не досить специфічними для конкретних представників цього сімейства, і, тим самим, створюють ще більше питань відносно їх біологічної ролі. Подальше вивчення факторів, що регулюють активність кальпаїнів 1 і 2 та деталізація їхніх специфічних субстратів буде сприяти поглибленню нашого уявлення щодо проявлення функцій кальпаїнів.

КАЛЬПАИНЫ: ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ИХ РОЛЬ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СОСТОЯНИЯХ ОРГАНИЗМА

Н. Ф. Стародуб[1], Л. М. Самохина[2], С. Н. Коваль[2], И. А. Снегурская[2]

[1]Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев;
e-mail: nikstarodub@yahoo.com;
[2]ГУ «Национальный институт терапии им. Л. Т. Малой НАМН Украины», Харьков;
e-mail: lub.samokhina@yandex.ua

Обзор посвящен кальпаинам – семейству цитоплазматических кальцийзависимых протеиназ с папаиноподобной активностью, которые принимают участие в разнообразных процессах в организме: возрастных изменениях, при функционировании эндотелия и легочной системы, регуляции апоптоза и некроза, развитии различных гипометаболических состояний, артериальной гипертензии, диабете, хронической болезни почек и опухолевом росте. Сделан вывод, что кальпаины с помощью ограниченного протеолиза своих субстратов играют важную роль в реализации широкого спектра биологических явлений. Их функционирование связано с ответом на кальцийзависимую сигнализацию и с эффектами старения. Угнетение активности кальпаинов способствует торможению развития дисфункции эндотелия, сердечно-сосудистых осложнений, формированию структурных и функциональных изменений в почечных тканях, имеет нейропротекторный эффект, предотвращает саркопению, ослабляет воспалительные реакции, вызванные гипервентиляцией легких.

Ключевые слова: кальпаины; возрастные изменения; функционирование эндотелия; легочная функция; апоптоз; гипометаболические состояния; кальпаины при артериальной гипертензии, диабете, хронической болезни почек, опухолевом росте.

CALPAINS: GENERAL CHARACTERISTICS AND ROLE IN VARIOUS STATES OF THE ORGANISM

N. F. Starodub[1], *L. M. Samokhina*[2], *S. N. Koval*[2], *I. A. Snegurskaya*[2]

[1]National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: nikstarodub@yahoo.com;
[2]GD L. T. Malaya National Institute of Therapy of NAMS of Ukraine, Kharkov;
e-mail: lub.samokhina@yandex.ua

Calpains are a family of cytoplasmic calcium-dependent proteinases with papain-like activity. They participate in a variety of processes in the body: age changes, functioning of endothelium and pulmonary system, regulation of apoptosis and necrosis, development of various hypometabolic states, arterial hypertension, diabetes and chronic kidney disease, tumor growth. It is concluded that calpains, causing limited proteolysis of substrates, play an important role in a wide range of biological phenomena. Their activity is associated with the response to the calcium-dependent signaling and the effects of aging. Inhibition of calpains activity contributes to inhibition of endothelial dysfunction, cardiovascular disease, formation of structural and functional changes in the kidney tissue, has neuroprotective effect, preventing sarcopenia, reduces inflammatory reactions caused by hyperventilation of the lungs.

K e y w o r d s: calpains, age changes, endothelial function, pulmonary function, apoptosis, hypometabolic status, calpains in arterial hypertension, diabetes, chronic kidney disease, tumor growth.

1. *Бондарева Л. А., Немова Н. Н., Кяйвяряйнен Е. И.* Внутриклеточная Ca^{2+}-зависимая протеолитическая система животных. – М.: Наука, 2006. – 294 с.
2. *Goll D. E., Thompson V. F., Li H. et al.* // Physiol. Rev. – 2003. – **83**, N 3. – P. 731–801.
3. *Немова Н. Н., Лысенко Л. А., Канцерова Н. П.* // Онтогенез. – 2010. – **41**, № 5. – С. 381–389.
4. *Campbell R. L., Davies P. L.* // Biochem J. – 2012. – **447**, N 3. – P. 335–351.
5. *Sorimachi H., Mamitsuka H., Ono Y.* // Biol. Chem. – 2012. – **393**, N 9. – P. 853–871.
6. *D'Orsi B., Bonner H., Tuffy L. P. et al.* // J. Neurosci. – 2012. – **32**, N 5. – P. 1847–1858.
7. *Ono Y., Sorimachi H.* // Biochim. Biophys. Acta. – 2012. – **1824**, N 1. – P. 224–236.
8. *Farr C., Berger S.* // J. Vis. Exp. – 2010. – N 41. pii: 2050.
9. *Neti G., Novak S. M., Thompson V. F., Goll D. E.* // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. – 2009. – **296**, N 6. – P. C1383–1390.
10. *Maki M., Maemoto Y., Osako Y., Shibata H.* // FEBS J. – 2012. – **279**, N 8. – P. 1414–1421.
11. *Smith M. A., Schnellmann R. G.* // Cardiovasc. Res. – 2012. – **96**, N 1. – P. 32–37.
12. *Maruyama K., Usami M., Kametani F.* // Int. J. Med. – 2000. – **5**, N 3. – P. 269–273.
13. *Thompson V. F., Lawson K. R., Barlow J., Goll D. E.* // Biochim. Biophys. Acta. – 2003. – **1648**, N 1–2. – P. 140–153.
14. *Бондарева Л. А., Немова Н. Н.* // Биоорган. хим. – 2008. – **34**, № 3. – С. 295–302.
15. *Duffy K. R, Duffy M. S.* // J. Neurosci. Methods. – 2011. – **201**, N 2. – P. 333–339.
16. *Thompson V. F., Saldaña S., Cong J., Goll D. E.* // Anal Biochem. – 2000. – **279**, N 2. – P. 170–178.
17. *Пат. 46357* A UA, МПК G 01 N33/48, A 61 B19/02. Набір для визначення активності кальпаїнів в біологічних рідинах / Самохіна Л. М., Самохін А. А. – Опубл. 15.05.2002, Бюл. № 5.
18. *Zalewska T., Domanska-Janik K.* // Praze z Biologii molekularney. – 1990. – **986**, N 19. – P. 103–115.
19. *Scalia R., Gong Y., Berzins B. et al.* // Circ. Res. – 2011. – **108**, N 9. – P. 1102–1111.
20. *Letavernier B., Zafrani L., Nassar D. et al.* // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2012. – **32**, N 2. – P. 335–342.
21. *Letavernier E., Zafrani L., Perez J. et al.* // Cardiovasc. Res. – 2012. – **96**, N 1. – P. 38–45.
22. *Santos D. M., Xavier J. M., Morgado A. L. et al.* // PLoS One. – 2012. – **7**, N 3. – P. e33468.
23. *Roumes H., Leloup L., Dargelos E. et al.* // Exp. Cell. Res. – 2010. – **316**, N 9. – P. 1587–1599.
24. *Louis M., Zanou N., Van Schoor M., Gailly P.* // J. Cell. Sci. – 2008. – **121**, Pt 23. – P. 3951–3959.
25. *Castiglioni S., Maier J. A. M.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2012. – **421**, N 2. – P. 380–383.
26. *Dedieu S., Poussard S., Mazères G. et al.* // Exp. Cell. Res. – 2004. – **292**, N 1. – P. 187–200.
27. *Moyen C., Goudenege S., Poussard S. et al.* // Int. J. Biochem. Cell. Biol. – 2004. – **36**, N 4. – P. 728–743.
28. *Łopatniuk P., Witkowski J. M.* // Acta Biochim. Pol. – 2011. – **58**, N 3. – P. 287–296.

29. *Zaidi A.* // World J. Biol. Chem. – 2010. – **1**, N 9. – P. 271–280.
30. *Cai Y., Zhu H. X., Li J. M. et al.* // PLoS One. – 2012. – **7**, N 6. – P. e37599.
31. *Medeiros R., Kitazawa M., Chabrier M. A. et al.* // Am. J. Pathol. – 2012. – **181**, N 2. – P. 616–625.
32. *Granic I., Nyakas C., Luiten G. et al.* // Neuropharmacology. – 2010. – **59**, N 4–5. – P. 334–342.
33. *Samengo G., Avik A., Fedor B. et al.* // Aging Cell. – 2012. – **11**, N 6.– P. 1036–1045.
34. *Brulé C., Dargelos E., Diallo R. et al.* // Biochimie. – 2010. – **92**, N 12. – P. 1923–1933.
35. *Ohno Y., Yamada S., Goto A. et al.* // Mol Cell Biochem. – 2012. – **369**, N 1–2. – P. 45–53.
36. *Zhang B. T., Whitehead N. P., Gervasio O. L. et al.* // J. Appl. Physiol. – 2012. – **112**, N 12. – P. 2077–2086.
37. *Arun P., Aleti V., Parikh K. et al.* // PLoS One. – 2011. – **6**, N 2. – P. e16545.
38. *Hoang M. V., Nagy J. A., Fox J. E., Senger D. R.* // PLoS One. – 2010. – **5**, N 10. – P. e13612.
39. *Liu D., Yan Z., Minshall R. D. et al.* // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. – 2012. – **302**, N 4. – P. L370–379.
40. *Самохіна Л. М., Єфімов В. В., Замазій А. Є., Воєйкова Л. С.* // Мед. хімія. – 2006. – **8**, № 2. – С. 19–22.
41. *Orrenius S., Nicotera P., Zhivotovsky B.* // Toxicol. Sci. – 2011. – **119**, N 1. – P. 3–19.
42. *Inserte J., Hernando V., Garcia-Dorado D.* // Cardiovasc Res. – 2012. – **96**, N 1. – P. 23–31.
43. *Raam B. J., Drewniak A., Groenewold V. et al.* // Blood. – 2008. – **112**, N 5. – P. 2046–2054.
44. *Винокуров М. Г., Юринская М. М.* // Биол. мембраны. – 2010. – **27**, № 1. – С. 18–27.
45. *Arnal N., de Alaniz M. J. T., Marra C. A.* // Biochim. Biophys. Acta. – 2012. – **1820**, N 7. – P. 931–939.
46. *Калиман П. А., Самохин А. А., Самохина Л. М.* // Укр. біохім. журн. – 2003. – **75**, № 1. – С. 104–106.
47. *Бондарева Л. А., Немова Н. Н., Кяйвяряйнен Е. И. и др.* // Изв. АН. Сер. Биол. – 2003. – № 1. – С. 37–40.
48. *Самохіна Л. М., Ломако В. В., Шило О. В.* // Проблеми кріобіології. – 2007. – **17**, № 4. – С. 347–355.
49. *McCollum A. T., Jafarifar F., Lynn B. C. et al.* // Exp. Neurol. – 2006. – **202**, N 2. – P. 506–513.
50. *Самохіна Л. М., Ломако В. В., Шило О. В.* // Досягнення біології та медицини. – 2010. – **16**, № 2. – С. 29–32.
51. *Andrews M. T.* // Bioessays. – 2007. – **29**, N 5. – P. 431–440.
52. *Самохіна Л. М., Лазарева С. О., Волков В. І.* // Досягнення біології та медицини. – 2007. – № 1. – С. 14–17.
53. *Целуйко В. И., Кравченко Н. А.* // Укр. терапевт. журн. – 2004. – № 4. – С. 70–76.
54. *Самохина Л. М., Топчий И. И., Несен А. А.* // Світ медицини та біології. – 2011. – № 3. – С. 116–121.
55. *Самохіна Л. М., Ломако В. В.* // Вестник Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина. – 2011. – **13**, № 947. – С. 23–28. – (Серия «Биология»).
56. *Taneike M., Mizote I., Morita T. et al.* // J. Biol. Chem. – 2011. – **286**, N 37. – P. 32170–32177.
57. *Müller A. L., Dhalla N. S.* // Heart Fail. Rev. – 2012. – **17**, N 3. – P. 395–409.
58. *Sorimachi H., Ono Y.* // Cardiovasc. Res. – 2012. – **96**, N 1. – P. 11–22.
59. *Chaudhary P., Suryakumar G., Prasad R. et al.* // Mol. Cell. Biochem. – 2012. – **364**, N 1–2. – P. 101–113.
60. *Randriamboavonjy V., Isaak J., Elgheznawy A. et al.* // Blood. – 2012. – **120**, N 2. – P. 415–423.
61. *Smolock A. R., Mishra G., Eguchi K. et al.* // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2011. – **31**, N 2. – P. 289–296.
62. *Covington M. D., Schnellmann R. G.* // Kidney Int. – 2012. – **81**, N 4. – P. 391–400.
63. *Топчій І. І., Самохіна Л. М., Несен А. О., Дерев'янченко Л. І.* // Укр. терапевт. журн. – 2008. – № 4. – С. 69–73.
64. *Самохіна Л. М., Топчій І. І., Несен А. О.* // Укр. журн. нефрології та діалізу. – 2008. – **17**, № 1. – С. 33–37.

Отримано 11.01.2013