

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ КАЛЬПАИН-КАЛЬПАСТАТИНОВОЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ КРЫС В АСПЕКТЕ КАЛЬЦИЕВОЙ ГИПОТЕЗЫ СТАРЕНИЯ МОЗГА

Поступила 06.02.09

Исследовали возрастные изменения активности кальпаина, активности его эндогенного ингибитора кальпастина и соотношения этих показателей в головном мозгу крыс четырех возрастных групп (две-три недели, два-три, пять-шесть и 24 месяца). Активность кальпаина определяли с использованием FITC-казеина в качестве субстрата. В растворимой фракции гомогената мозга активность фермента с возрастом увеличивалась, превышая у взрослых крыс (пять-шесть месяцев) аналогичный показатель у ювенильных животных в 3.65 раза, а у старых крыс несколько снижалась. Во фракции, полученной после отделения кальпаина от других компонентов с помощью хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе, тенденция к увеличению активности кальпаина с возрастом сохранялась, но была менее выраженной. Активность кальпастина проявляла иную направленность возрастных изменений: она была самой высокой у двух-трехнедельных животных с постепенным снижением (на 27 %) у старых. Обнаружено также, что эффективность ингибирующего действия кальпастина в ткани мозга по отношению к активности кальпаина, как правило, избыточна. При этом соотношение активностей ингибитора и фермента с возрастом уменьшалось; данный индекс составлял 1.65 у двух-трехнедельных, 1.33 у двухмесячных, 1.1 у взрослых и 1.0 и менее у старых животных.

Таким образом, показано, что интенсивность протеолиза, опосредуемого кальпаином, в головном мозгу крыс возрастает от ювенильного периода до зрелого возраста и несколько снижается при старении. Такие изменения происходят за счет как повышения активности фермента, так и ослабления действия его ингибитора кальпастина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: кальпаин, кальпастин, кальциевый гомеостаз, протеолиз, онтогенез.

ВВЕДЕНИЕ

В процессах, происходящих в нервной ткани при старении, одну из ключевых ролей играет состояние клеточных механизмов регуляции кальциевого гомеостаза [1–3]. Это положение, лежащее в основе так называемой кальциевой гипотезы старения мозга, находит подтверждение в многочисленных экспериментальных данных [4–7]. В нейронах гиппокампа и кортикальных нейронах старых крыс наблюдаются усиление трансмембранных кальциевых токов и значительное возрастание концентрации ионов кальция в цитозоле по сравнению с соответствующими показателями у взрослых животных.

С возрастом происходят существенные изменения и в функционировании важнейших внутриклеточных кальциевых депо – эндоплазматического ретикула и митохондрий [8–11]. Указанные события вызывают каскад изменений клеточных процессов, связанных с нарушениями кальциевого гомеостаза. Некоторые из этих преобразований обуславливают возрастные нарушения процессов обучения и памяти, основой которых являются такие феномены, как долговременная потенция (ДВП) и долговременная депрессия (ДВД) синаптической передачи [12]. Нейронная пластичность при старении также значительно изменяется: уменьшается среднее число синаптических контактов нейрона, наблюдается повышение порога индукции ДВП, этот процесс ослабляется, тогда как чувствительность нейронов к ДВД возрастает [13, 14]. Стойкое увеличение концентрации кальция в нейронах может

¹Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев (Украина).

Эл. почта: malysheva@biph.kiev.ua (М. К. Малышева).

постепенно привести к их структурной дегенерации или, по крайней мере, сделать нейроны более уязвимыми по отношению к различным нейротоксическим влияниям [15].

Одним из важных агентов, обеспечивающих трансформацию кальциевого сигнала в биохимический и физиологический ответы клетки, является кальпаин – внутриклеточная нейтральная протеиназа, проявляющая абсолютную зависимость своей активности от концентрации ионов кальция [16, 17]. Субстратами кальпаина в клетке являются цитоскелетные и мембранные белки, рецепторы, гормоны, белки миелиновой оболочки, многие ферменты. Ограниченный протеолиз этих субстратов представляет собой один из ведущих путей регуляции их функций.

Через активацию и ингибирование кальпаина в заметной степени обеспечивается регуляция ряда важнейших жизненных процессов – синаптической передачи, секреции, клеточной дифференциации, обмена мышечных белков и многих других [18, 19]. Несмотря на то, что в опосредовании кальциевого сигнала принимают участие и другие кальцийзависимые ферменты (протеинкиназы, фосфатазы, фосфолипазы), по существующим представлениям, ни один из них не оказывает столь широких влияний на клеточные функции, как кальпаин [20]. Кальпаин присутствует практически во всех клетках и тканях организма позвоночных в виде различных изоформ. Среди таких изоформ наиболее распространены и изучены являются μ - и m -кальпаины, для активации которых необходимы ионы кальция в микро- и миллимолярных концентрациях соответственно. Кроме того, имеются и другие клеточные компоненты кальпаиновой системы – ингибитор кальпаина кальпастатин и некоторые активаторные белки [21–23].

Кальпастатин – эндогенный белковый высокоспецифический ингибитор, неэффективный в отношении других цистеиновых и сериновых протеиназ – является мощным регулятором активности кальпаина в клетке. Ингибирование кальпаина кальпастатином осуществляется посредством образования комплекса этих белков в присутствии ионов кальция. Оно конкурентно и обратимо; комплекс может диссоциировать на фермент и ингибитор в активном виде [24].

Кальпаин считается в основном цитозольным ферментом, хотя он может быть обратимо ассоциирован с некоторыми субклеточными компонентами. Кальпастатин, находясь в цитозоле, образует

агрегаты молекул и локализуется в больших гранулярных структурах вблизи ядра. Возрастание концентрации кальция в клетке изменяет внутриклеточную локализацию указанных белков и делает возможным их взаимодействие [25]. Значительную роль при этом играют процессы фосфорилирования. Агрегированный кальпастатин находится преимущественно в фосфорилированном состоянии, проявляя очень низкую ингибиторную активность. Увеличение концентрации свободного кальция вызывает дефосфорилирование кальпастина, опосредуемое фосфатазами, и переводит его в растворимую форму. Дефосфорилированная форма обладает высокой ингибиторной активностью [26].

Аномальные изменения содержания кальпаина или модуляция его активности могут привести к нарушению ряда физиологических функций и вызвать существенные патологические последствия. Большинство нейропатологических состояний связаны с увеличением активности кальпаина в мозгу и других тканях. Такие сдвиги наблюдаются при болезни Альцгеймера, рассеянном склерозе, воздействии ишемии на нервные ткани, мышечной дистрофии, инфаркте миокарда и других заболеваниях. Возрастание активности кальпаина вызывает разрушение цитоскелетных, миелиновых белков и других клеточных субстратов кальпаина [27–31].

Сведения о характере возрастных изменений компонентов кальпаиновой системы в мозгу несколько противоречивы. Большинство авторов считали, что процессы протеолиза, опосредуемые кальпаином, с возрастом усиливаются [20, 32, 33]. Другие же исследователи не находили заметных изменений или только отмечали тенденцию к увеличению активности кальпаина с возрастом [34, 35]. Об усилении протеолиза в таких работах судили в основном по накоплению продуктов расщепления цитоскелетного белка спектрина или же миелина, которые, как известно, являются субстратами кальпаина [36, 37]. Однако такой подход может оказаться в некоторой мере неадекватным, поскольку указанные белки являются субстратами не только кальпаина, но и других клеточных протеаз [32]. Согласно существующим представлениям [38], чувствительность таких белков к протеолизу может заметно изменяться с возрастом.

Задачей настоящей работы было выяснение характера и интенсивности изменений активности кальпаина и кальпастина, экспрессированных в головном мозгу крыс, в процессе онтогенеза.

МЕТОДИКА

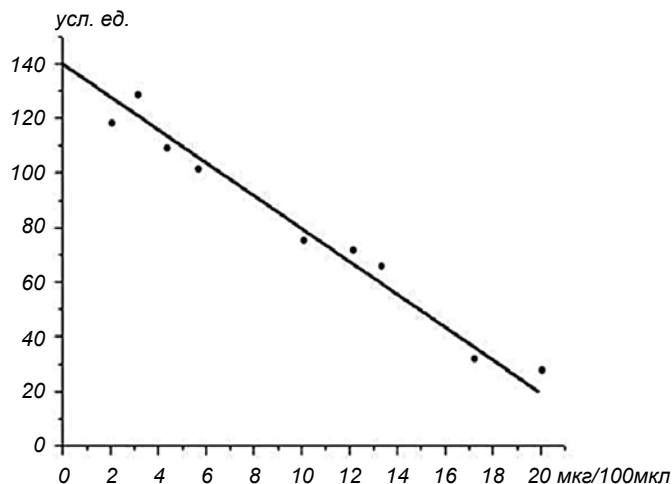
В экспериментах были использованы крысы линии Вистар четырех разных возрастных групп: двух-трехнедельные, двух-трех-, пяти-шести- и 24-месячные. Животные этих групп рассматривались как ювенильные, молодые, взрослые и старые соответственно.

Животных декапитировали, извлекали головной мозг и гомогенизировали его в пяти объемах трис-НСI буфера (20 мМ, рН 7.5) с добавлением 1.0 мМ ЭДТА, 1.0 мМ ЭГТА и 5.0 мМ дитиотреитола (ДТТ). Гомогенат центрифугировали в течение 30 мин при 15000g. Для исследования использовали надосадочную фракцию гомогената (экстракт), а также частично очищенные фракции кальпаина и кальпастина, полученные из экстракта с помощью высаливания раствором сульфата аммония (40 % относительно концентрации насыщения) и ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе в статических условиях путем ступенчатой элюции с добавлением в буфер NaCl в различных концентрациях [26, 39]. Белковая фракция, которая элюировалась при добавлении 0.25 М раствора NaCl, содержала в себе кальпастин. Кальпаин, свободный от кальпастина, элюировался 0.4 М раствором NaCl. Для окончательной очистки кальпастина использовали уникальное свойство данного ингибиторного белка – его высокую термостабильность [25, 40]. Фракцию, содержащую в себе кальпастин, выдерживали при 100 °С в течение 10 мин. Термолabile белки удаляли путем центрифугирования при 15000g в течение 15 мин, надосадочную жидкость диализовали против трис-НСI-буфера (50 мМ, рН 7.5), содержащего в себе 0.1 М ЭДТА и 1.0 М ДТТ. Для определения содержания белка использовали метод Лоури [41].

Активность кальпаина определяли с помощью флуоресцентной спектроскопии, применяя в качестве субстрата FITC-казеин [42]; использовали методику в модификации, описанной ранее [43]. Специфическую активность кальпаина выражали в условных единицах интенсивности флуоресценции на 1 мг белка. Ингибиторную активность кальпаина оценивали по разности показателей активности кальпаина в отсутствие и в присутствии упомянутого ингибитора в реакционной смеси. Эту величину рассчитывали относительно 1 мг белка в полученном препарате кальпастина в пробе (специфическая активность) или 1 г ткани мозга (общая активность) [25, 26].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ингибирование кальпаина кальпастином проявляло четкую (в исследованном участке – практически линейную) зависимость от дозы (рис. 1) и высокую специфичность (подавления активности трипсина не наблюдалось).



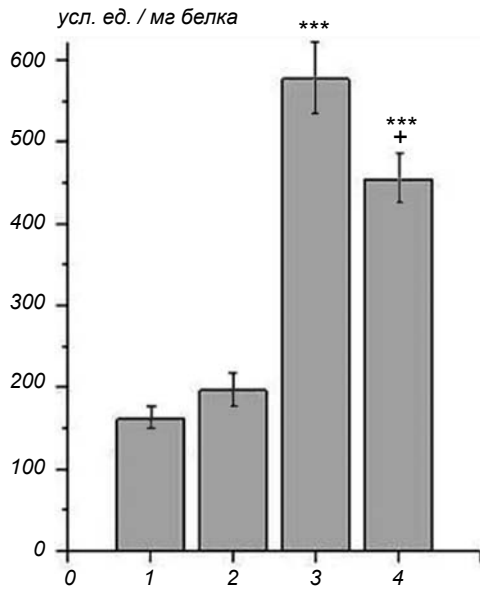
Р и с. 1. Зависимость интенсивности ингибирования кальпаина от концентрации кальпастина.

По оси абсцисс – концентрация кальпастина в пробе, мкг/100 мкл; по оси ординат – интенсивность флуоресценции, усл. ед.

Р и с. 1. Залежність інтенсивності інгібування кальпаїну від концентрації кальпастину.

В растворимой фракции гомогената головного мозга, в которой содержались все компоненты кальпаиновой системы (включая кальпастин), активность кальпаина экспериментальных животных демонстрировала выраженную зависимость от возраста (рис. 2). Самая низкая активность обнаруживалась у ювенильных животных (двух-трехнедельного возраста). К двум-трем месяцам она несколько возрастала (примерно на 20 %). В возрасте пяти-шести месяцев активность кальпаина превышала наблюдаемую у ювенильных животных в 3.65 раза. У старых крыс (24 месяца) активность кальпаина сохранялась существенно большей (более чем в 2.0 раза), чем у ювенильных и молодых животных, но по отношению к этому показателю у взрослых пяти-шестимесячных крыс данная активность несколько снижалась (на 20 %).

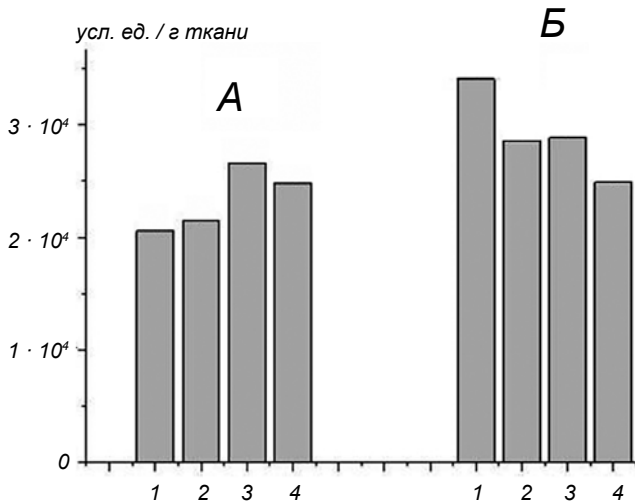
После разделения компонентов растворимой фракции гомогената с помощью хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе, что позволяло освободить кальпаин от кальпастина, специфическая активность



Р и с. 2. Активность кальпаина в экстракте из ткани головного мозга крыс разного возраста.

По вертикали – относительная интенсивность флуоресценции, усл. ед./мг белка. 1–4 – возрастные группы животных: две-три недели, два, пять-шесть месяцев и 24 месяца соответственно. Три звездочками отмечены высокодостоверные различия ($P < 0.001$) при сравнении данных по группам 3 и 4 с группой 1, крестиком – достоверное различие ($P < 0.05$) при сравнении групп 4 и 3.

Р и с. 2. Активність кальпаїну в екстракті з тканини головного мозку щурів різного віку.



фермента увеличивалась более чем в 10 раз. При этом наблюдалась несколько иная картина возрастных изменений активности очищенного исследуемого фермента. На фоне незначительной разницы между показателями двух первых возрастных групп тенденция к увеличению активности кальпаина в зрелом и старом возрасте сохранялась, но подобная динамика была гораздо менее выраженной – превышение составляло 30 и 20 % соответственно (рис. 3, А).

Активность кальпастина проявляла иную направленность возрастных изменений. Она была самой высокой у ювенильных животных с постепенным снижением (на 27 %) у старых (рис. 3, В).

Расчеты показали, что способность ингибирования активности кальпаина кальпастином в ткани мозга, как правило, является избыточной. Она потенциально превышает активность кальпаина почти на протяжении всего изучаемого периода онтогенеза. У двух-трехнедельных крыс такое превышение составляло 65 %. У молодых животных (двух-трехмесячных) эта разница равнялась 33 %, у взрослых она уменьшалась до 10 %, а у старых крыс отсутствовала вообще. По данным других исследователей [44], соотношение активностей рассматриваемых ингибитора и фермента может заметно различаться в разных тканях. Так, более низкий уровень активности кальпастина по сравнению с таковым кальпаина наблюдался в легких и почках, но не в тимусе. Возможно, обнаруженные нами соотношения активностей фермента и его ингибитора указывают на большую значимость регуляторной роли кальпастина именно в нервной ткани.

Таким образом, описанные выше данные показали, что процессы протеолиза с участием кальпаина в головном мозгу крыс с возрастом в целом усиливаются. Эти изменения происходят за счет не только возрастания активности самого фермента, но и ослабления сдерживающего влияния его ингибито-

Р и с. 3. Возрастные изменения активности кальпаина (А) и кальпастина (В) в ткани головного мозга крыс после хроматографического разделения компонентов на ДЕАЕ-целлюлозе.

По вертикали – относительная интенсивность флуоресценции, усл. ед./г ткани. Данные усреднены в результате объединения трех-четырёх проб, полученных от разных животных, в один образец.

Р и с. 3. Вікові зміни активності кальпаїну (А) та кальпастатину (В) у тканині головного мозку щурів після хроматографічного розподілу компонентів на ДЕАЕ-целюлозі.

ра – кальпастина. Такой вывод подтверждается наблюдениями других авторов, обнаруживших, что повышение интенсивности протеолиза, опосредуемого кальпаином, даже при низком содержании данного фермента в почках стареющих грызунов или в эритроцитах пожилых людей обусловлено преимущественно снижением содержания кальпастина в указанных объектах [45, 46].

Сторонники кальциевой гипотезы старения мозга предполагают, что небольшое увеличение концентрации свободного цитозольного кальция, подерживаемое длительный период времени (как это наблюдается в процессе старения), может иметь такие же последствия для функций нейронов, как и резкие сдвиги данного показателя за относительно короткие периоды времени в условиях различных патологий [1, 3]. Не исключено, что такой эффект может быть частично обусловлен возрастными особенностями активности кальпаина, способного посредством ограниченного протеолиза необратимо менять структуру клеточных белков, тем самым влияя на их функцию. При этом следует учитывать, что динамика эффективности протеолитического действия кальпаина обеспечивается также изменениями уровня активности его основного ингибитора – кальпастина.

Т. Ф. Кастрикіна¹, Л. М. Стельмах¹, М. К. Малишева¹

ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ КАЛЬПАЇН-КАЛЬПАСТАТИНОВОЇ ЦЕРЕБРАЛЬНОЇ СИСТЕМИ ЩУРІВ В АСПЕКТІ КАЛЬЦІЄВОЇ ГІПОТЕЗИ СТАРІННЯ МОЗКУ

¹Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).

Резюме

Досліджували вікові зміни активності кальпаїну, активності його ендogenousного інгібітора кальпастатину та співвідношення цих показників у головному мозку щурів чотирьох вікових груп (два-три тижні, два-три, п'ять-шість і 24 місяці). Активність кальпаїну визначали з використанням FITC-казеїну як субстрату. У розчинній фракції гомогенату мозку активність ферменту з віком збільшувалася, перевищуючи у дорослих щурів (п'ять-шість місяців) аналогічний показник у ювенільних тварин у 3.65 разу, а у старих щурів дещо знижувалась. У фракції, отриманій після відділення кальпаїну від інших компонентів за допомогою хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі, тенденція до збільшення активності кальпаїну з віком зберігалась, але була менш вираженою. Активність кальпастатину проявляла іншу спрямованість

вікових змін: вона була найбільш високою у дво-трижневих тварин з поступовим зниженням (на 27 %) у старих. Виявлено також, що ефективність інгібуючої дії кальпастатину в тканині мозку відносно активності кальпаїну є надмірною. При цьому співвідношення активності інгібітора та ферменту з віком зменшувалося; даний індекс складав 1.65 у дво-трижневих, 1.33 у двомісячних, 1.1 у дорослих і 1.0 і менше у старих тварин.

Таким чином, показано, що інтенсивність протеолізу, опосередкованого кальпаїном, у головному мозку щурів зростає від ювенільного періоду до зрілого віку і дещо знижується при старінні. Такі зміни відбуваються за рахунок як підвищення активності ферменту, так і послаблення дії його інгібітора кальпастатину.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Z. S. Khachaturian, "The role of calcium regulation in brain aging: reexamination of a hypothesis," *Aging*, **1**, No. 1, 17-34 (1989).
2. G. Biessels and W. H. Gispen, "The calcium hypothesis of brain aging and neurodegenerative disorders: signification in diabetic neuropathy," *Life Sci.*, **59**, Nos. 5/6, 379-387 (1996).
3. G. Biessels, M. P. ter Laak, F. P. T. Hamers, and W. H. Gispen, "Neuronal Ca²⁺ dysregulation in diabetes mellitus," *Eur. J. Pharmacol.*, **447**, 201-209 (2002).
4. S. Kirischuk, N. Pronchuk, and A. Verkhratsky, "Measurements of intracellular calcium in sensory neurons of adult and old rats," *Neuroscience*, **50**, No. 4, 947-951 (1992).
5. P. W. Landfield, "Increased calcium-current hypothesis of brain aging," *Neurobiol. Aging*, **8**, No. 4, 346-347 (1987).
6. A. Verkhratsky, A. Shmigol, S. Kirischuk, et al., "Age-dependent changes in calcium currents and calcium homeostasis in mammalian neurons," *Ann. New York Acad. Sci.*, **747**, 365-381 (1994).
7. П. Г. Костюк, О. П. Костюк, О. О. Лук'янець, *Іони кальцію у функції мозку: від фізіології до патології*, Наук. думка, Київ (2005).
8. E. C. Toescu and A. Verkhratsky, "Neuronal ageing from an intraneuronal perspective: role of endoplasmic reticulum and mitochondria," *Cell Calcium*, **34**, Nos. 4/5, 311-323 (2003).
9. E. C. Toescu and A. Verkhratsky, "Ca²⁺ and mitochondria as substrates for deficits in synaptic plasticity in normal brain aging," *J. Cell. Mol. Med.*, **8**, No. 2, 181-190 (2004).
10. E. C. Toescu, A. Verkhratsky, and P. W. Landfield, "Ca²⁺ regulation and gene expression in normal brain aging," *Trends Neurosci.*, **27**, No. 10, 614-620 (2004).
11. A. Kumar and T. C. Foster, "Intracellular calcium stores contribute to increased susceptibility to LTD induction during aging," *Brain Res.*, **1031**, 125-128 (2005).
12. O. Thibault, J. C. Gant, and P. W. Landfield, "Expansion of the calcium hypothesis of brain aging and Alzheimer's disease: minding the store," *Aging Cell*, **6**, 307-317 (2007).
13. T. C. Foster, "Calcium homeostasis and modulation of synaptic plasticity in the aged brain," *Aging Cell*, **6**, 319-325 (2007).
14. S. N. Burke and C. A. Barnes, "Neural plasticity in the ageing brain," *Nat. Rev. Neurosci.*, **7**, No. 1, 30-40 (2006).
15. L. W. Campbell, Su-Yang Hao, O. Thibault, et al., "Aging changes in voltage-gated calcium currents in hippocampal CA1 neurons," *J. Neurosci.*, **16**, No. 19, 6286-6295 (1996).

16. Т. Ф. Кастрикина, М. К. Малышева, "Кальпаин – один из медиаторов кальциевого сигнала в клетке", *Нейрофизиология/Neurophysiology*, **32**, № 2, 142-156 (2000).
17. D. E. Gool, V. F. Thompson, H. Li, et al., "The calpain system," *Physiol. Rev.*, **83**, 731-801 (2003).
18. K. Sato and S. Kawashima, "Calpain function in the modulation of signal transduction molecules," *Biol. Chem.*, **382**, No. 5, 743-751 (2001).
19. Y. Tomimatsu, S. Idemoto, S. Moriguchi, et al., "Proteases involved in long-term potentiation," *Life Sci.*, **72**, Nos. 4/5, 355-361 (2002).
20. R. A. Nixon, "The calpains in aging and aging-related diseases," *Ageing Res. Rev.*, **2**, 407-418 (2003).
21. N. DeMartino and D. K. Blumenthal, "Identification and partial purification of a factor that stimulates calcium-dependent proteases," *Biochemistry*, **21**, 4297-4303 (1982).
22. P. L. Pontremoli, M. Viotti, M. Michetti, et al., "Identification of an endogenous activator of calpain in rat skeletal muscle," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **171**, No. 2, 569-574 (1990).
23. E. Shiba, H. Ariyoshi, Y. Yano, et al., "Purification and characterization of a calpain activator from human platelets," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **182**, No. 2, 461-465 (1992).
24. E. Melloni, R. De Tullio, M. Avtrna, et al., "Properties of calpastatin forms in rat brain," *FEBS Lett.*, **431**, 55-58 (1998).
25. R. De Tullio, M. Passalacqua, M. Averna, et al., "Changes in intracellular localization of calpastatin during calpain activation," *Biochem. J.*, **343**, 467-472 (1999).
26. M. Averna, R. De Tullio, M. Passalacqua, et al., "Changes in intracellular localization of calpastatin are mediated by reversible phosphorylation," *Biochem. J.*, **35**, 25-30 (2001).
27. G. Di Rosa, T. Odrijin, R. A. Nixon, and O. Arancio, "Calpain inhibitor: a treatment for Alzheimer disease," **19**, Nos. 1/2, 135-141 (2002).
28. D. C. Shields, K. E. Schaecher, T. C. Saïdo, and N. L. Banik, "A putative mechanism of demyelination in multiple sclerosis by a proteolytic enzyme calpain," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, No. 20, 11486-11491 (1999).
29. P. W. Vanderklish and B. A. Bahr, "The pathogenic activation of calpain: a marker and mediator of cellular toxicity and disease states," *J. Exp. Pathol.*, **81**, 323-339 (2000).
30. O. Carragher, "Calpain inhibition: a therapeutic strategy targeting multiple disease states," *Current Pharm. Des.*, **12**, No. 5, 615-638 (2006).
31. F. Trinchese, M. Fa, S. Liu, et al., "Inhibition of calpains improves memory and synaptic transmission in a mouse model of Alzheimer disease," *J. Clin. Invest.*, **118**, No. 8, 2796-2807 (2008).
32. J. D. Hinman, J. A. Duce, R. A. Siman, et al., "Activation of calpain-1 in myelin and microglia in the white matter of the aged rhesus monkey," *J. Neurochem.*, **89**, 430-441 (2004).
33. E. Bernath, N. Kupina, M. C. Liu, et al., "Elevation of cytoskeletal protein breakdown in aged Wistar rat brain," *Neurobiol. Aging*, **27**, No. 4, 624-632 (2006).
34. M. Banay-Schwartz, T. De Guzman, M. Palkovits, and A. Laytha, "Calpain activity in adult and aged human brain regions," *Neurochem. Res.*, **19**, 563-567 (1994).
35. W. F. Ward, "Protein degradation in the aging organism," *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, **29**, 35-42 (2002).
36. B. A. Bahr, P. W. Vanderklish, L. T. Ha, et al., "Spectrin breakdown products with age in telencephalon of mouse brain," *Neurosci. Lett.*, **131**, No. 2, 237-240 (1991).
37. J. A. Sloane, J. D. Hinman, M. Lubonia, et al., "Age-dependent myelin degeneration and proteolysis of oligodendrocyte proteins is associated with the activation of calpain-1 in the rhesus monkey," *J. Neurochem.*, **84**, No. 1, 157-168 (2003).
38. M. Benuck, M. Banay-Schwartz, T. De Guzman, and A. Lajtha, "Changes in brain protease activity in aging," *J. Neurochem.*, **67**, No. 5, 2019-2029 (1996).
39. B. A. Brooks, D. E. Goll, Y.-S. Peng, et al., "Effect of alloxan diabete on a Ca-activated proteinase in rat skeletal muscle," *Am. J. Physiol.*, **244**, No. 3, 175-181 (1983).
40. M. Michetti, P. L. Viotti, E. Melloni, and S. Pontremolli, "Mechanism of action of the calpain activator protein in rat skeletal muscle," *Eur. J. Biochem.*, **202**, 1177-1180 (1991).
41. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, "Protein measurement with the Folin phenol reagent," *J. Biol. Chem.*, **193**, No. 1, 265-275 (1951).
42. S. S. Twining, "Fluorescein isothiocyanate-labelled casein assay for proteolytic enzymes," *Analyt. Biochem.*, **143**, No. 1, 30-34 (1984).
43. Т. Ф. Кастрикина, Р. П. Морозова, М. К. Малышева, "Активность кальпаина в головном мозгу морской свинки при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите", *Нейрофизиология/Neurophysiology*, **36**, № 3, 203-207 (2004).
44. K. Blomgren, E. Nilsson, and J. O. Karlsson, "Calpain and calpastatin levels in different organs of the rabbit," *Comp. Biochem. Physiol. Ser. B*, **93**, No. 2, 403-407 (1989).
45. H. Manya, M. Inomata, T. Fujimori, et al., "Klotho protein deficiency leads to overactivation of mu-calpain," *J. Biol. Chem.*, **277**, 5503-5508 (2002).
46. N. Schwarz-Benmeir, T. Glaser, S. Barnoy, and N. S. Kosower, "Calpastatin in erythrocytes of young and old individuals," *Biochem. J.*, **304**, 365-370 (1994).