



УДК 577.152.34:537.63

МОДУЛЯЦИЯ Ca^{2+} -ЗАВИСИМОГО ПРОТЕОЛИЗА ПРИ ДЕЙСТВИИ СЛАБЫХ НИЗКОЧАСТОТНЫХ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ¹

© 2015 г. Н. П. Канцерова*, #, Л. А. Лысенко*, Н. В. Ушакова**, В. В. Крылов**, Н. Н. Немова*

*ФГБУН Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, 185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11

**ФГБУН Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, пос. Борок Ярославской обл.

Поступила в редакцию 13.04.2015 г. Принята к печати 24.04.2015 г.

Исследование связано с поиском молекулярных мишеней воздействия на живые объекты магнитных полей. На модельных организмах (рыбах, брюхоногом моллюске) изучено различное по продолжительности воздействие слабого низкочастотного магнитного поля, настроенного на параметрический резонанс для ионов Ca^{2+} . Установлена динамика изменения активности Ca^{2+} -зависимых протеиназ у изученных организмов на экспозицию в магнитном поле с заданными параметрами и минимальное время воздействия для достижения инактивации исследуемых ферментов. Обосновывается возможность использования низкочастотных магнитных полей в практической медицине для модуляции активности Ca^{2+} -зависимых протеиназ, гиперактивация которых является причиной развития различных дегенеративных патологий.

Ключевые слова: Ca^{2+} -зависимые протеиназы, регуляция, слабые низкочастотные магнитные поля, модельные животные.

DOI: 10.7868/S0132342315060068

ВВЕДЕНИЕ

Ca^{2+} -зависимые протеолитические ферменты (кальпаины) регулируют ряд сигнальных путей и деградируют структурные белки в эукариотических клетках. Известно, что организация кальпаиновой системы рыб сходна с таковой у млекопитающих и включает две повсеместные формы (μ - и m -кальпаины), ряд тканеспецифичных и эндогенный высокоспецифичный ингибитор кальпаинов — кальпаистатин [1–3], тогда как у беспозвоночных она имеет ряд особенностей [2, 3].

Физиологические функции Ca^{2+} -зависимого протеолиза многочисленны и разнообразны: перестройка цитоскелета, пролиферация, слияние клеток, внутриклеточная сигнализация, формирование мышечных волокон, апоптоз и некроз

[4–7]. Гиперактивация кальпаинов, обычно вызванная нарушением баланса внутриклеточного Ca^{2+} , связана с развитием ряда патологических дегенеративных процессов [8–11]. Следует отметить ограниченность предлагаемых на сегодняшний день способов регуляции активности кальпаинов в живых организмах; пока не созданы фармакологические препараты — ингибиторы кальпаинов, успешно прошедшие клинические испытания [12]. В связи с этим, изучение альтернативных способов снижения избыточной активности исследуемых Ca^{2+} -зависимых протеиназ представляет значительный интерес.

Ранее мы показали, что слабые низкочастотные МП, настроенные на параметрический резонанс для ионов Ca^{2+} (Ca^{2+} -МП) и ионов K^+ (K^+ -МП), оказывают существенное влияние на уровень активности Ca^{2+} -зависимых протеиназ беспозвоночных животных и рыб [13, 14]. В экспериментах была доказана релевантность изучаемых модельных организмов для тестирования эффектов МП. Изменение уровня активности Ca^{2+} -активируемых протеиназ достигалось при действии МП *in vivo* и *in vitro*. Высокая биологическая активность слабых низкочастотных МП с интенсивностью порядка или меньше геомагнитного известна давно [15–18], и

¹ Статья публикуется по материалам сообщения, представленного на VII Российском симпозиуме "Белки и пептиды"; Новосибирск, 12–17 июля 2015 г.

Сокращения: МП — магнитное поле; Ca^{2+} (K^+)-МП — магнитное поле, настроенное на резонанс для ионов Ca^{2+} (K^+); ДТТ — дитиотреитол; EDTA-Na — натриевая соль этилендиамин тетрауксусной кислоты; PMSF — фенилметилсульфонилфторид.

Автор для связи (тел.: +7 (8142) 57-18-79; факс: +7 (8142) 76-98-10; эл. почта: nkantserova@yandex.ru).

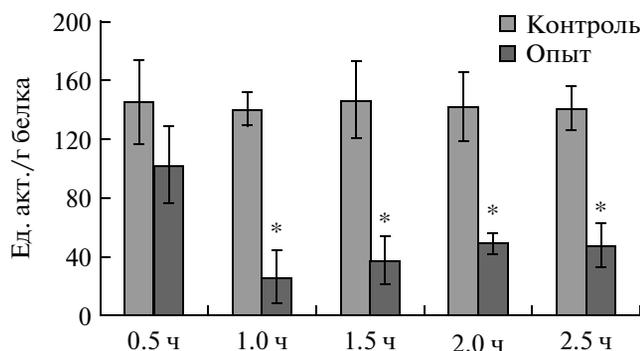


Рис. 1. Удельная активность кальпаинов в мягком теле прудовика, находившегося в условиях постоянного МП Земли (контроль) и подвергнутого воздействию Ca^{2+} -МП (опыт), * отличие от контроля достоверно при $p \leq 0.01$.

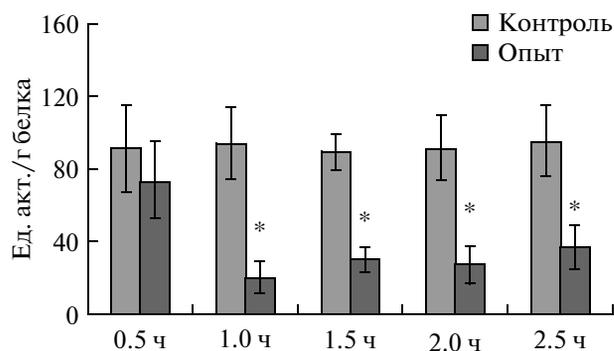


Рис. 2. Удельная активность кальпаинов в скелетных мышцах карпа, находившегося в условиях постоянного МП Земли (контроль) и подвергнутого воздействию Ca^{2+} -МП (опыт), * отличие от контроля достоверно при $p \leq 0.01$.

ключевые механизмы этого эффекта связывают с воздействием на биологически значимые ионы (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ и др.), бирадикалы, физико-химические свойства воды, водных растворов и коллоидных систем [19]. Важная роль иона Ca^{2+} — универсального мессенджера и регулятора широкого спектра внутриклеточных процессов — в формировании отклика биологической системы на воздействие МП доказана многими исследователями [19]; однако лишь единичные работы посвящены изучению влияния данного физического фактора на внутриклеточный Ca^{2+} -зависимый протеолиз [20, 21].

В продолжение серии экспериментов по установлению механизмов действия МП на биохимию клетки, в настоящей работе была изучена интенсивность воздействия Ca^{2+} -МП на активность Ca^{2+} -зависимых протеиназ животных и временная динамика изучаемого процесса. Целью исследования было получение данных, позволяющих оценить характер воздействия Ca^{2+} -МП на Ca^{2+} -зависимые протеиназы, установить необходимую длительность воздействия для достижения желаемого эффекта — стабильного снижения активности кальпаинов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Было изучено различное по длительности (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 и 2.5 ч) воздействие Ca^{2+} -МП на активность Ca^{2+} -зависимых протеиназ беспозвоночных животных (брюхоногого моллюска прудовика; рис. 1) и рыб (карпа; рис. 2). Следует отметить, что базальный уровень активности кальпаинов у моллюска значительно превышает таковой у рыб, что согласуется с ранее полученными данными о свойствах Ca^{2+} -зависимых протеиназ животных разных таксономических групп [2, 3]. Установлено, что воздействие Ca^{2+} -МП в течение 0.5 ч не привело к

достоверным изменениям уровня активности кальпаинов по сравнению с показателями у контрольных животных, тогда как при более длительном воздействии наблюдалось статистически значимое снижение уровня активности изучаемых протеиназ. Так, при действии Ca^{2+} -МП активность кальпаинов в мягком теле прудовика снизилась от 2.9 до 5.4 раз, а в скелетных мышцах карпа — от 2.5 до 6.0 раз при разном по продолжительности экспериментальном воздействии. Несмотря на ранее установленные различия структурной организации кальпаинов беспозвоночных и рыб [2, 3], характер ответа их Ca^{2+} -зависимых протеиназ на воздействие Ca^{2+} -МП сходен, что указывает на фундаментальные принципы кальциевой регуляции изучаемых ферментов и согласуется с ранее полученными данными [13].

На сегодняшний день нет четких представлений о механизме действия слабых низкочастотных МП, энергия которых на несколько порядков меньше тепловой, на живые организмы. Предложено несколько теорий сигнального действия слабого низкочастотного МП [19], среди которых наиболее обоснованной кажется теория магнитного параметрического резонанса, или интерференционная модель В. Леднева [22]. Согласно последней, первичной мишенью действия Ca^{2+} -МП являются ионы Ca^{2+} в составе специфических центров Ca^{2+} -связывающих белков, при этом связанный Ca^{2+} рассматривается как изотропный заряженный осциллятор. В норме Ca^{2+} -осциллятор совершает незатухающие колебания, прерываемые лишь разобшением лигандов. Воздействие Ca^{2+} -МП вызывает прецессию оси вибраций Ca^{2+} -осциллятора относительно направления МП и приводит к изменению сродства Ca^{2+} -связывающего центра фермента к Ca^{2+} , что изменяет интенсивность катализируемых им биохимических реакций. Полученные нами данные о снижении активности

Действие ингибиторов на активность препаратов Ca^{2+} -зависимых протеиназ, выделенных из скелетных мышц интактного (контроль) или подвергнутого 1.0 и 2.5 ч воздействию Ca^{2+} -МП карпа, *Cyprinus carpio* L

Ингибитор	Остаточная активность, %		
	Контроль	Ca^{2+} -МП, 1.0 ч	Ca^{2+} -МП, 2.5 ч
Без ингибитора	100	100	100
Е64 (1.0 мкМ)	7	8	7
Йодацетамид (1.0 мМ)	4	4	5
Йодацетат (1.0 мМ)	2	2	2
PMSF (0.1 мМ)	90	90	90
Пепстатин (0.1 мМ)	100	100	100

Ca^{2+} -зависимых протеиназ в тканях исследованных организмов при действии Ca^{2+} -МП согласуются с теорией влияния МП на живые системы В. Леднева.

Характерно, что при получасовом воздействии Ca^{2+} -МП активность исследуемых протеиназ у изученных объектов достоверно не изменялась. Вероятно, для изменения физического взаимодействия Ca^{2+} и Ca^{2+} -связывающих центров фермента требуется более длительное воздействие Ca^{2+} -МП. Ответ развивается в течение часа, по истечению которого активность кальпаинов достигает минимума, и далее его выраженность практически не изменяется, поскольку в интервале 1.0–2.5 ч статистически значимые различия между опытными группами отсутствуют; сходная динамика обнаружена у обоих исследованных видов. Вероятно, это можно объяснить тем, что в условиях постоянного содержания ионизированного Ca^{2+} в клетке происходят непрерывные и независимые друг от друга появление и распад Ca^{2+} -осцилляторов [22, 23]. Вероятно, наблюдаемая ответная реакция имеет некоторые временные ограничения, поскольку поддержание уровня активности кальпаинов в клетке находится под контролем многих механизмов, включая регуляцию экспрессии их генов и активацию их латентных предшественников, запас которых в клетке превышает пул зрелых ферментов. Известно, что слабые низкочастотные МП влияют на уровень экспрессии ряда генов [24, 25].

Следует отметить, что к настоящему времени не существует единого мнения о том, влияют ли слабые низкочастотные МП на содержание Ca^{2+} в клетке. В ряде работ указывается на способность слабых низкочастотных МП вызывать периодические колебания (осцилляции) концентрации Ca^{2+} в клетке и в отдельных ее компартментах за счет воздействия на Ca^{2+} -каналы и ионную проницаемость плазматической мембраны [26–28]. Вместе с тем, некоторые авторы считают, что реакция на МП специфична у клеток разных типов

и концентрация ионизированного Ca^{2+} может либо флуктуировать, либо поддерживаться на постоянном уровне [29–31].

Были проанализированы биохимические характеристики препаратов Ca^{2+} -зависимых протеиназ (цистеиновых по механизму катализа), полученных от интактных или подвергнутых 1.0 и 2.5 ч-воздействию Ca^{2+} -МП рыб. По данным ингибиторного анализа (таблица), препараты исследуемых ферментов, полученные от рыб контрольной группы, чувствительны к ингибиторам цистеиновых протеиназ – Е64, йодацетамиду и йодацетату (остаточная активность 7, 4 и 2%, соответственно) и нечувствительны к ингибиторам сериновых протеиназ – PMSF и аспартатных протеиназ – пепстатину (остаточная активность 90 и 100%, соответственно). Показано, что разное по длительности воздействие Ca^{2+} -МП (1.0 или 2.5 ч) не отражается на значениях остаточной ферментативной активности Ca^{2+} -активируемых протеиназ. Эти данные свидетельствуют о том, что основные свойства этих ферментов, определяющие механизм катализа по цистеиновому типу, и реакционная способность SH-группы Cys в их активном центре при воздействии Ca^{2+} -МП не изменяются. Полученные результаты позволяют предположить, что Ca^{2+} -МП не вызывает изменений в структуре молекулы Ca^{2+} -активируемой протеиназы, а оказываемый МП эффект реализуется за счет регуляторных воздействий более высокого уровня, по всей видимости, путем изменения свойств комплекса протеиназы с ионами Ca^{2+} , период полужизни которого, согласно теории В. Леднева, при воздействии МП сокращается.

Обладая структурным родством и сходными механизмами регуляции с кальпаинами млекопитающих, Ca^{2+} -зависимые протеиназы рыб и беспозвоночных могут рассматриваться как модели для изучения их роли в базовых клеточных процессах и в развитии различных кальпаинзависимых патологических процессов – кальпаинопатий.

Особое место среди последних занимают патологии, обусловленные нарушением гомеостаза Ca^{2+} в клетке – мышечные дистрофии, катаракта, нейродегенеративные заболевания и другие. Приток внутриклеточного Ca^{2+} – основного регулятора активности кальпаинов – запускает гиперактивацию данных протеиназ и приводит к избыточному расщеплению ими белковых субстратов. Проблема нерегулируемой активности кальпаинов, характерной для указанных патологических состояний, делает поиск специфичных способов модуляции их активности задачей практической важности. Ингибиторы кальпаинов (белковые, пептидомиметики) показали высокую эффективность при испытаниях на клеточных культурах и животных моделях нейродегенеративных заболеваний, таких как болезни Альцгеймера [32, 33] и Паркинсона [34], а также диабета [35], катаракты [36], ишемии [37] и других. Однако, в медицинской практике их использование пока не одобрено в силу недостаточной селективности, неудовлетворительной фармакодинамики [12] и выраженных побочных эффектов, развивающихся из-за полного подавления физиологической активности кальпаинов. Учитывая вышесказанное, физиолечение с использованием Ca^{2+} -МП может стать альтернативным немедикаментозным способом коррекции нерегулируемой активности протеиназ при патологиях разного генеза – связанных или несвязанных с дисбалансом Ca^{2+} , – поскольку основное действие МП, по всей видимости, направлено не на регуляцию уровня Ca^{2+} , а на изменение его свойств как лиганда биомолекул.

Таким образом, в настоящей работе подтверждена возможность *in vivo*-модуляции активности кальпаинов с помощью слабых низкочастотных МП; их применение позволило снизить активность кальпаинов до 6 раз. Установлено, что для достижения желаемого эффекта (частичной инактивации исследуемых ферментов) следует учитывать длительность воздействия Ca^{2+} -МП, в изученных моделях потребовалось часовое воздействие, а дальнейшая пролонгация, по-видимому, нецелесообразна. Оптимальное по времени действие МП с заданными параметрами на живые организмы позволяет достичь эффект ингибирования протеолитической активности кальпаинов, а в случаях их гиперактивации, вероятно, снизить интенсивность кальпаинзависимых нарушений. В справедливости последнего утверждения мы сможем убедиться лишь при изучении воздействия указанного МП на патологически измененные ткани или животные модели патологий человека.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы химические реагенты, ингибиторы и субстраты протеиназ, носите-

ли для гель-хроматографии, маркеры молекулярных масс, произведенные “Sigma-Aldrich” (США); приборы: генератор сигналов специальной формы Г6-28 (Москва, СССР), магнитометр НВ0599Б (НПО “ЭНТ”, Санкт-Петербург, Россия), источник постоянного тока Б5-45А (Москва, СССР), микроцентрифуга 5417R (Eppendorf, Германия), ультрацентрифуга Optima Beckman LE 80 (Beckman-Coulter, США), оборудование для колоночной хроматографии (Bio-Rad, США), твердотельный термостат СН-100 (BioSan, Латвия), спектрофотометр СФ-2000 (ЗАО “ОКБ-Спектр”, Россия).

Объекты исследований. В качестве объектов исследования были использованы карп *Cyprinus carpio* L. (возраст 0+, длина 4.9 ± 0.1 см, масса 1.8 ± 0.2 г) и прудовик *Limnaea stagnalis* L. (высота раковины 2.9 ± 0.5 см) из прудов экспериментального хозяйства “Сунога” ИБВВ РАН. После вылова животные содержались в аквариумах с аэрируемой водой при температуре $18 \pm 2^\circ\text{C}$, срок адаптации к лабораторным условиям до начала эксперимента составлял не менее 5 сут.

Схема эксперимента. Животные случайным образом были разделены на группы – опытную и контрольную. Первые в ходе эксперимента находились в условиях действия искусственного Ca^{2+} -МП, вторые – при постоянном МП Земли. По истечении времени воздействия (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 и 2.5 ч) у рыб из опытной и контрольной групп были взяты для анализа скелетные мышцы, у моллюска – мягкое тело целиком ($n = 7-10$). Ткани были заключены в жидкий азот до начала биохимического анализа.

Техника генерации Ca^{2+} -МП. Использованное оборудование, методика получения Ca^{2+} -МП, его основные параметры и способы их контроля подробно описаны в прежних публикациях авторов [13, 14].

Общая активность Ca^{2+} -зависимых протеиназ была определена в тотальной фракции растворимых и мембраносвязанных белков, полученных из скелетных мышц карпа и мягкого тела моллюска [38]. Ткани были подвергнуты гомогенизации в 20 мМ Трис-НСI-буфере (рН 7.5), содержащем 150 мМ NaCl, 5 мМ EDTA-Na, 20 мМ DTT, 0.1%-го Triton X-100, смеси ингибиторов протеиназ (1 мМ PMSF, 1 мкг/мл лейпептина, 1 мкг/мл пепстатина) в соотношении 1 : 10 (вес/объем) и центрифугированию (20000 g, 20 мин). В надосадочной жидкости была протестирована Ca^{2+} -зависимая кazeинолитическая активность, чувствительная к ингибиторам цистеиновых протеиназ (иначе – активность кальпаинов). Реакционная смесь, общим объемом 500 мкл, включала 1 мг/мл денатурированного щелочью кazeина, 20 мМ DTT, 200 мкл ферментной фракции и 5 мМ CaCl_2 (Ca^{2+} -зависимая активность) или хелатор Ca^{2+} EDTA-Na (Ca^{2+} -независимая активность) в 50 мМ Трис-НСI-буфере (рН 7.5). После 30 мин инкубации (28°C)

в аликвотах объемом 100 мкл было определено содержание остаточного белка по методу Брэдфорд [39]. За 1 ед. акт. кальпаинов было принято количество фермента, вызывающее увеличение оптического поглощения при 595 нм на 0.1 ОЕ за 1 ч инкубации при 28°C. Удельная активность кальпаинов была определена в расчете на 1 г белка.

Получение препаратов Ca²⁺-зависимых протеиназ. Гель-хроматографическое разделение 25%-ных осветленных гомогенатов скелетных мышц рыб (105000 g, 60 мин) было проведено на колонках 5 × 95 см с сефакрилом S300 (уравновешивающий и элюирующий буфер 10 мМ Трис-НСl (рН 7.5), содержащий 4 мМ EDTA-Na, 5 мМ 2-меркаптоэтанол, 50 мМ NaCl) со скоростью 24 мл/ч при температуре +4° [40]. Молекулярная масса выходящих с колонки фракций белков была определена с помощью калибровочного графика, построенного по результатам пропускания через колонку белков с известными молекулярными массами (Molecular markers 6Н; Sigma-Aldrich, США). Для дальнейшего анализа использовали активные против казеина белковые фракции с молекулярной массой 110–120 кДа, обогащенные кальпаинами (в виде смеси молекулярных форм).

Ингибиторный анализ. Частично очищенные (как описано выше) препараты протеиназ были преинкубированы с соответствующим ингибитором (1.0 мкМ E64, 1.0 мМ йодацетамидом, 1.0 мМ йодацетатом, 0.1 мМ PMSF или 0.1 мМ пепстатином) в течение 15 мин (28°C) в реакционной смеси описанного выше состава. Ферментативная реакция проводилась по стандартной схеме после внесения 5 мМ Ca²⁺ или EDTA-Na. Полученные значения казеинолитической активности (остаточная активность) соотносились с ее уровнем в отсутствие ингибитора, принятым за 100%.

Концентрацию белка определяли методом Брэдфорд [39] с использованием BSA в качестве стандарта.

Статистическая обработка результатов. Полученные данные были обработаны с применением общепринятых методов вариационной статистики с использованием пакетов программ MS Excel и StatGraphics, достоверность различий оценивалась с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием приборов Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН. Финансовое обеспечение исследования осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания № 0221-2014-0003 и при поддержке гранта Президента РФ “Ведущие научные школы” (НШ-1410.2014.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ladrat C., Chaplet M., Verrez-Bagnis V., Noel J., Fleurence J. // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2000. V. 125(1). P. 83–95.
2. Канцерова Н.П., Ушакова Н.В., Лысенко Л.А., Немова Н.Н. // *Журн. эволюц. биохимии и физиологии.* 2010. Т. 46. С. 489–494.
3. Лысенко Л.А., Канцерова Н.П., Ушакова Н.В., Немова Н.Н. // *Биоорг. химия.* 2012. Т. 38. С. 324–332. [Lysenko L.A., Kantserova N.P., Ushakova N.V., and Nemova N.N. // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 2012. V. 38. P. 282–290.]
4. Goll D.E., Thompson V.F., Li H., Wei W., Cong J. // *Physiol. Rev.* 2003. V. 83. P. 731–801.
5. Бондарева Л.А., Немова Н.Н., Кяйвяряйнен Е.И. *Внутриклеточная Ca²⁺-зависимая протеолитическая система животных.* М.: Наука. 2006. 294 с.
6. Немова Н.Н., Лысенко Л.А., Канцерова Н.П. // *Онтогенез.* Т. 41. С. 381–389.
7. Sorimachi H., Hata S., Ono Y. // *Proc. Jpn. Acad., Ser. B.* V. 87. P. 287–327.
8. Zatz M., Starling A. // *N. Engl. J. Med.* 2005. V. 9. P. 2413–2423.
9. Sorimachi H., Ono Y. // *Cardiovasc. Res.* 2012. V. 96. P. 11–22.
10. Лысенко Л.А., Канцерова Н.П., Рендаков Н.Л., Селверова Н.Б., Немова Н.Н. // *Биоорг. химия.* 2013. Т. 39. С. 572–578. [Lysenko L.A., Kantserova N.P., Rendakov N.L., Sel'verova N.B., and Nemova N.N. // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 2013. V. 39. P. 510–516.]
11. Лысенко Л.А., Канцерова Н.П., Рендаков Н.Л., Немова Н.Н. // *Биоорг. химия.* 2014. Т. 40. С. 695–702. [Lysenko L.A., Kantserova N.P., Rendakov N.L., Nemova N.N. // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 2014. V. 40. P. 640–649.]
12. Donkor I. // *Expert Opin. Ther. Patents.* 2011. V. 21. P. 601–636.
13. Канцерова Н.П., Ушакова Н.В., Крылов В.В., Лысенко Л.А., Немова Н.Н. // *Биоорг. химия.* 2013. Т. 39. С. 418–423. [Kantserova N.P., Ushakova N.V., Krylov V.V., Lysenko L.A., and Nemova N.N. // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 2013. V. 39. P. 373–378.]
14. Канцерова Н.П., Ушакова Н.В., Крылов В.В., Лысенко Л.А., Немова Н.Н. // *Изв. РАН. Сер. биол.* 2013. №. 6. С. 668–672.
15. Juutilainen J. // *Radiat. Prot. Dosimetry.* 2003. V. 106. P. 385–390.
16. Lagroye I., Percherancier Y., Juutilainen J. // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2011. V. 107. P. 369–373.
17. Vanderstraeten J., Verschaeye L., Burda H., Bouland C., de Brouwer C. // *J. Appl. Toxicol.* 2012. V. 32. P. 952–958.
18. Liboff A.R. // *Electromagn. Biol. Med.* 2014. V. 33. P. 241–245.
19. Бинги В.Н. *Магнитобиология: эксперименты и модели.* М.: Изд-во МИЛТА. 2002. 592 с.
20. Salamino F., Minafra R., Grano V., Diano N., Mita D.G., Pontremoli S., Melloni E. // *Bioelectromagnetics.* 2006. V. 27. P. 43–50.

21. Iorio R., Bennato F., Mancini F., Colonna R. // *Int. J. Radiat. Biol.* 2013. V. 89. P. 548–561.
22. Белова Н.А., Панчелюга В.А. // *Биофизика*. 2010. Т. 55. Вып. 4. С. 750–766.
23. Леднев В.В., Макарова О.П. // *Биофизика*. 1996. № 41(1). С. 224–232.
24. Blank M., Goodman R. // *IEEE Transactions on Plasma Science*. 2000. V. 28. P. 168–172.
25. Blank M., Goodman R. // *Pathophysiology*. 2009. V. 16(2–3). P. 71–78.
26. Huang C., Ye H., Xu J., Liu J., Qu, A. // *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2000. V. 17. P. 63–65.
27. Gartzke J., Lange K. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2002. V. 283. P. 1333–1346.
28. Manikonda P.K., Rajendra P., Devendranath D., Gunasekaran B., Channakeshava R.S., Sashidhar R.B., Subramanyam C. // *Neurosci Lett*. 2007. V. 413. P. 145–149.
29. Coulton L.A., Barker A.T. // *Phys. Med. Biol.* 1993. V. 38. P. 347–360.
30. Yang W., Xu T., Huo X.L., Song T. // *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi*. 2003. V. 21. P. 332–334.
31. Zhang Y., Zhan Y., Zhao T., Chen Y., Yuan C. // *Commun. Theor. Phys*. 2009. V. 52. P. 168–172.
32. Battaglia F., Trinchese F., Liu S., Walter S., Nixon R.A., Arancio O. // *J. Mol. Neurosci*. 2003. V. 20. P. 357–362.
33. Trinchese F., Fa M., Liu S., Zhang H., Hidalgo A., Schmidt S., Yamaguchi H., Yoshii N., Mathews P., Nixon R., Arancio O. // *J. Clin. Invest.* 2008. V. 118. P. 2796–2807.
34. Samantaray S., Ray S.K., Banik N.L. // *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*. 2008. V. 7. P. 305–312.
35. Randriamboavonjy V., Isaak J., Elgheznawy A., Pistrosch F., Frömel T., Yin X., Badenhoop K., Heide H., Mayr M., Fleming I. // *Blood*. 2012. V. 120. P. 415–423.
36. Lee H.Y., Morton J.D., Robertson L.J. // *Clin. Exp. Ophthalmol.* 2008. V. 36. P. 852–860.
37. Frederick J.R., Chen Z., Bevers M.B. // *Crit. Care Med.* 2008. V. 36. P. 481–485.
38. Enns D.L., Belcastro A.N. // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2006. V. 84. P. 601–609.
39. Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
40. Murachi T., Hatanaka M., Yasumoto Y., Tanaka K. // *Biochem. Int.* 1981. V. 2. P. 651–656.

Modulation of Ca²⁺-Dependent Proteolysis under the Action of Weak Low-Frequency Magnetic Fields

N. P. Kantserova*, L. A. Lysenko*, N. V. Ushakova**, V. V. Krylov**, N. N. Nemova*

*The Institute of Biology, Karelian Research Centre of Russian Academy of Sciences, 185910, Petrozavodsk, Pushkinskaya, 11

**I.D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters of Russian Academy of Sciences, Borok, Yaroslavskaaya obl.

The study aimed to determine the molecular targets of magnetic fields in living objects. Time-dependent effects of weak low-frequency magnetic field tuned to the parametric resonance for calcium ions were studied on model organisms (fish, whelk). The dynamics of Ca²⁺-dependent proteinase activity under the exposure to magnetic fields with given parameters was determined and minimal time of exposure in order to achieve inactivation of these proteinases was found out as well. As hyperactivation of Ca²⁺-dependent proteinases is a basis of degenerative pathology development the therapeutic potential of weak low-frequency magnetic fields enabling to modulate Ca²⁺-dependent proteinase activity is supported.

Keywords: Ca²⁺-dependent proteinases, regulation, weak low-frequency magnetic fields, model animals