

© Коллектив авторов

## НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ ИЗАТИНА И АФОБАЗОЛА СОПРОВОЖДАЮТСЯ УВЕЛИЧЕНИЕМ УРОВНЯ РАСТВОРИМОГО В ТРИТОНЕ X-100 АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА В МОЗГЕ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ РОТЕНОНОВЫМ ПАРКИНСОНИЗМОМ

О.А. Бунеева<sup>1\*</sup>, И.Г. Капица<sup>1,2</sup>, В.Г. Згода<sup>1</sup>, А.Е. Медведев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, 119121 Москва, Погодинская ул., 10; \*эл. почта: olbuneeva@gmail.com

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова, 125315 Москва, Балтийская ул., 8

Исследовали влияние эндогенного нейропротектора изатина и фармакологического препарата афобазола, проявляющего нейропротекторные свойства, на поведенческие реакции крыс с экспериментальным ротеноновым паркинсонизмом, а также на количественные изменения протеомного профиля мозга этих животных. Изатин (100 мг/кг подкожно однократно, на 7 день курсового введения ротенона) улучшал двигательную активность крыс с ротеноновым паркинсонизмом в тесте открытого поля (горизонтальные перемещения) и вращающегося стержня. Афобазол (10 мг/кг внутривентрикулярно, ежедневно в течение 7-дневного курса введения ротенона) снижал проявления ригидности и постуральной неустойчивости. Протеомный анализ, выполненный на следующий день после окончания введения нейропротекторов, выявил сходные количественные изменения в мозге крыс с ротеноновым паркинсонизмом. Обнаружено увеличение относительного содержания 65 белков и снижение относительного содержания 21 белка. Наиболее выраженные изменения — почти девятикратное увеличение содержания альфа-синуклеина — обнаружены в мозге крыс, получавших изатин. У животных экспериментальных групп “Ротенон+Изатин”, “Ротенон+Афобазол” увеличение относительного содержания этого белка в мозге почти в 60 и 50 раз, соответственно, превышало контрольные значения. С учётом известных данных о физиологической роли альфа-синуклеина, увеличение содержания этого белка в мозге при введении нейропротекторов животным с ротеноновым паркинсонизмом может представлять компенсаторную реакцию, во всяком случае, на ранних стадиях этого заболевания и начала его лечения.

**Ключевые слова:** паркинсонизм; нейротоксин ротенон; нейродегенерация; альфа-синуклеин; нейропротекторы; изатин; афобазол; мозг; протеомное профилирование

**DOI:** 10.18097/PBMC20236905290

### ВВЕДЕНИЕ

Для диагностики и терапии болезни Паркинсона (БП) — одного из самых распространённых нейродегенеративных заболеваний, характеризующегося повреждением nigrostriatalной дофаминергической (ДА) системы, — большое значение имеет создание экспериментальных моделей БП *in vivo*. Одной из наиболее адекватных и широко используемых моделей БП у крыс служит так называемый ротеноновый паркинсонизм, индуцированный введением нейротоксина ротенона. Ингибируя комплекс I дыхательной цепи митохондрий, этот пестицид вызывает дегенерацию клеток ДА системы и развитие двигательных нарушений и других изменений, наиболее сходных по симптомам и молекулярно-биологическим признакам с таковыми у БП [1–4].

Ранее на модели экспериментального паркинсонизма у мышей, вызванного введением нейротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП), было обнаружено снижение двигательных нарушений и изменение протеомного профиля митохондриальных белков под действием эндогенного нейропротектора изатина [5, 6].

Изатин (индол-2,3-дион) — биологический регулятор, обнаруженный в мозге, периферических тканях и биологических жидкостях человека и животных и обладающий широким

спектром биологической и фармакологической активности [7, 8]. Он является ингибитором моноаминоксидазы типа Б (МАО-Б) — фермента, ответственного за биотрансформацию МФТП и образование активного нейротоксина (иона 1-метил-4-фенилпиридиния) [9, 10]. Помимо МАО-Б, он взаимодействует с многочисленными белками мозга, включая белки, патогенетически важные для развития БП и других нейродегенеративных заболеваний [11, 12]. Поскольку механизм развития ротенонного паркинсонизма отличается от МФТП-индуцированного паркинсонизма, представляет несомненный интерес оценить, насколько универсален нейропротекторный эффект изатина в разных экспериментальных моделях БП. В связи с этим следует отметить, что классический ингибитор МАО-Б депренил (эндогенным функциональным агонистом которого изатин рассматривается [13]), проявляет свою нейропротекторную активность и в модели МФТП-индуцированного паркинсонизма [9, 10], и в модели ротенонного паркинсонизма [14].

Целью настоящей работы было сравнительное исследование влияния изатина и афобазола на проявления паркинсонического синдрома (ПС) у крыс, вызванные введением ротенона: физиологические реакции и количественные изменения протеомного профиля мозга животных.

Афобазол (5-этокси 2-[2-(морфолино) этилтио]-бензимидазола дигидрохлорид) — оригинальный анксиолитик, разработанный в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова. Он действует на ряд важных рецепторных систем мозга [15]. В модели МФТП-индуцированного паркинсонизма афобазол снижал выраженность экстрапирамидных нарушений, уменьшая ригидность и улучшая моторную активность и координацию движений у мышей; в модели ротенонового паркинсонизма у крыс афобазол снижал выраженность постуральной неустойчивости и уменьшал уровень смертности крыс [16].

## МЕТОДИКА

### Реактивы

В работе использовали следующие реактивы: Трис (гидроксиметил)аминометан, гидрокарбонат аммония, дитиотреитол, мочевины, гуанидин гидрохлорид, хлористый натрий, Тритон X-100, 4-винилпиридин, Кумасси бриллиантовый синий G-250 (“Merck”, США); муравьиную кислоту, едкий натр (“Acros Organics”, США), ацетонитрил (“Fisher Chemical”, Великобритания); изопропанол, трифторуксусную кислоту (“Fluka”, США); трис-(2-карбоксиил)-фосфин (“Pierce”, США); модифицированный трипсин (mass spectrometry grade, “Promega”, США). Остальные реактивы были отечественного производства максимальной доступной чистоты.

### Экспериментальные животные

Исследование выполнено на аутбредных белых крысах, полученных из питомника “Столбовая” Научного центра биомедицинских технологий. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к корму и воде при двенадцатичасовом световом режиме.

### Моделирование экспериментального паркинсонизма у крыс и применение нейропротекторов изатина и афобазола

Моделирование ПС с помощью системного введения ротенона проводилось согласно руководству [17], путём ежедневного 7-дневного внутрибрюшинного (в/бр) введения крысам раствора ротенона в нейтральном триглицериде миглиоле (Miglyol 840), в дозе 2,75 мг/кг. Раствор ротенона готовили, как описано ранее [18]. Контрольные животные получали ежедневно физиологический раствор внутрибрюшинно в эквивалентном объёме 0,2 мл на 100 г веса тела животного. Изатин вводили подкожно за 30 мин до инъекции ротенона и за 1 ч до тестирования. Афобазол вводили в/бр за 30 мин до инъекции ротенона и за 1 ч до тестирования.

Животные случайным образом были разделены на следующие группы:

1) группа пассивного контроля (“Контроль”), получавшая ежедневно (7 дней) физиологический раствор — 10 крыс;

2) группа активного контроля (“Ротенон”), получавшая ежедневно (7 дней) ротенон в дозе 2,75 мг/кг в/бр — 21 крыса;

3) опытная группа (“Ротенон+Изатин”), получавшая ежедневно (7 дней) ротенон и однократно, на 7 день, изатин в дозе 100 мг/кг подкожно — 9 крыс;

4) опытная группа (“Изатин”), получавшая ежедневно (6 дней) физиологический раствор и однократно, на 7 день, изатин в дозе 100 мг/кг подкожно — 10 крыс;

5) опытная группа (“Ротенон+Афобазол”), получающая ежедневно (7 дней) афобазол 10 мг/кг в/бр и ротенон — 16 крыс;

6) опытная группа (“Афобазол”), получавшая ежедневно (7 дней) афобазол 10 мг/кг в/бр — 10 крыс.

### Тестирование поведенческих реакций

У животных с экспериментальным ПС регистрировали динамику роста массы тела на протяжении всего эксперимента относительно показателя первого дня эксперимента до введения ротенона. Также на протяжении опыта регистрировали смертность животных. На 7 день введения ротенона проводили тестирование поведенческих реакций для выявления экстрапирамидных нарушений в тестах “Открытое поле”, “Вращающийся стержень”, оценку постуральной неустойчивости и ригидности, как это подробно описано в [18].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica v. 10.0. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка с последующей оценкой равенства дисперсий по критерию Левена. Так как в экспериментальной группе отсутствовало нормальное распределение, дальнейшую обработку проводили с помощью метода непараметрической статистики Манна-Уитни. Для оценки категориальных данных в малых группах использовали точный тест Фишера. Результаты в таблицах представлены как среднее ± ошибка среднего (Mean±SEM). Различия между группами считали достоверными при  $p < 0,05$ .

### Получение лизатов гомогенатов мозга

Животных декапитировали под лёгким эфирным наркозом на следующий (восьмой) день эксперимента после проведения поведенческих тестов. Ткань мозга (большие полушария) гомогенизировали при помощи гомогенизатора Heidolph SilentCrusher (“Heidolph Instrument GmbH”, Германия) (50000 об/мин) в 0,05 М калий-фосфатном буфере (pH 7,4) до конечной концентрации 30 мг/мл. Для оценки относительных количественных изменений содержания белков мозга животных разных экспериментальных групп при подготовке проб использовали одинаковое количество общего белка, которое контролировали с помощью метода Бредфорда [19]. После инкубации в присутствии 3% Тритона X-100 (4°C, 1 ч) лизаты разводили в 3 раза тем же буфером и центрифугировали 30 мин при 16000 g для получения осветлённой надосадочной жидкости.

Подготовку проб для масс-спектрометрического анализа (экстракцию белков, алкилирование и трипсинолиз) осуществляли, как описано ранее [20].

*Масс-спектрометрический анализ*

Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием системы высокоэффективного жидкостного разделения пептидов Ultimate 3000 RSLCnano (“Thermo Scientific”, США) в нанопотоковом режиме масс-спектрометрического детектора Q-Exactive HFX (“Thermo Scientific”). Хроматографическое разделение пептидов проводили на аналитической колонке с обращённой фазой Peaky C18 (100 мкм × 300 мм, 1,7 мкм размер частиц, “Молекта”, РФ) в линейном градиенте элюции подвижной фазы А (0,1% водный раствор муравьиной кислоты) и подвижной фазы Б (80% ацетонитрил, 0,1% муравьиная кислота) от 2% до 45% при скорости потока 0,3 мкл/мин в течение 60 мин, с промывкой системы 99% Б в течение 5 мин, с последующим уравниванием хроматографической системы в начальных условиях градиента (А : Б = 2 : 98) в течение 5 мин.

Условия масс-спектрометрического анализа и биоинформатической обработки данных подробно приведены в [18].

Каждый из представленных в таблицах белков был идентифицирован, по меньшей мере, в трёх независимых экспериментах.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

*Влияние нейротоксина ротенона и нейропротекторов изатина и афобазола на поведенческие реакции крыс*

В условиях экспериментальной модели паркинсонизма, вызванного введением ротенона, у всех крыс, получавших токсин, наблюдалась отрицательная динамика массы тела на протяжении всего эксперимента по сравнению с группой “Контроль”. Афобазол и изатин не оказали влияния на сохранение и набор массы тела животных.

Введение ротенона вызывало гибель животных, которая на 7 день эксперимента в группе активного контроля составила почти 29%, а к 8 дню — уже 43%, что достоверно отличалось от показателя группы пассивного контроля. Процент погибших животных на фоне субхронического введения афобазола на 8 день опыта был на 5,4% меньше, чем в группе “Ротенон”. Однократное введение изатина (100 мг/кг подкожно) животным опытных групп “Изатин” и “Ротенон+Изатин” (см. выше) гибели не вызывало.

Введение ротенона вызывало у крыс развитие олигокинезии. Так, на 7 день опыта в тесте “Открытое поле” отмечено достоверное уменьшение в 3,1 и 5,4 раз горизонтальной и вертикальной двигательной активности, соответственно, и снижение в 4,4 раза поисковой активности (число заглядываний в “норки”) относительно группы “Контроль” (табл. 1). Однократное подкожное введение изатина приводило к значимому снижению двигательной и

ориентировочно-исследовательской активности крыс, что, возможно, связано с некоторым седативным действием препарата. Однократное введение изатина крысам, предварительно получавшим ротенон, за 30 мин до его последнего 7-го введения, не снизило активность животных относительно показателей, полученных в группе крыс, которым вводили только изатин, при этом число перемещений было на 61,8% достоверно больше, чем в группе “Ротенон”. Афобазол, который вводили в течение 7 дней до теста, не оказал влияния на двигательную и исследовательскую активности крыс в установке “Открытое поле” по сравнению с группой “Контроль”. Афобазол не уменьшил выраженность олигокинезии у крыс с ПС, вызванным 7-дневным введением ротенона (табл. 1).

У животных с индуцированным ротеноном ПС на 7 день эксперимента выявлен моторный дефицит, проявлявшийся в достоверном снижении в 2,1 раза длительности их удержания на вращающемся с постоянной скоростью 10 оборотов в минуту стержне (табл. 2). Однократное введение изатина перед последним седьмым введением ротенона уменьшало моторный дефицит, что проявилось в увеличении времени удержания на вращающемся стержне в 1,7 раза и достигало уровня значимости на 7 день эксперимента. Семидневное введение крысам афобазола совместно с ротеноном вызывало недостоверное увеличение локомоторной активности крыс в 1,2 раза на 7-й день эксперимента по сравнению с группой “Ротенон” (табл. 2).

Системное введение ротенона вызывало проявление ригидности — появление “горба”, что выразилось в значимом уменьшении длины шага животного в 1,4 раза по сравнению с показателем группы “Контроль” (табл. 3). Афобазол способствовал снижению выраженности ригидности, значимо увеличив в 1,4 раза длину шага крыс с ПС по сравнению с группой “Ротенон” (табл. 3). Изатин, введённый однократно крысам с ПС, вызванным ротеноном, не уменьшил выраженность ригидности (табл. 3).

При регистрации выраженности постуральной неустойчивости на 7 день эксперимента установлено, что животным с ПС, вызванным ротеноном, для достижения баланса тела необходимо было совершить шаг большей длины, чем животным без патологии. Длина шага как левой, так и правой передней лапой у крыс группы “Ротенон” была в 1,8 и 1,5 раза достоверно больше соответствующей длины шага животных группы пассивного контроля. Изатин уменьшил выраженность постуральной неустойчивости у крыс с ПС, уменьшив длину шага животных в 1,3 и 1,2 раз относительно данных животных группы “Ротенон”. Афобазол также снизил выраженность постуральной неустойчивости у крыс с ПС, что выразилось в уменьшении длины шага передними лапами в 1,4 и 1,3 раза по сравнению с данными группы “Ротенон” (табл. 3).

Таким образом, системное введение ротенона моделирует тяжёлый ПС, характерный для развёрнутой стадии БП, сопровождающийся значимой потерей веса

Таблица 1. Влияние изатина и афобазола на поведение крыс с ПС вызванным системным 7-дневным введением ротенона в тесте “Открытое поле”

Группа	Количество животных	Двигательная активность на 7 день, ед.	
		Горизонтальная (число перемещений)	Вертикальная (число стоек)
Контроль	10	37,8±5,5	8,7±1,3
Ротенон	12	10,2±1,9***	1,6±0,5***
Ротенон+Изатин,	9	19,9±4,7 <sup>#</sup> *	1,2±0,4***
Изатин	9	18,1±5,5*	2,6±0,5***
Ротенон+Афобазол	10	12,0±4,4**	1,2±0,5***
Афобазол	10	35,9±6,2	3,6±1,1**

Примечание: \*, \*\*, \*\*\* –  $p<0,05$ ,  $p<0,01$ ,  $p<0,001$ , соответственно, в сравнении с группой “Контроль”; # –  $p<0,05$  в сравнении с группой “Ротенон”.

Таблица 2. Влияние изатина и афобазола на координацию движений крыс с ПС, вызванным системным введением ротенона (7 день эксперимента), Mean±SEM. Оценка координации движений через 100 мин после введения ротенона

Группа	Количество животных	Время удержания на вращающемся стержне, с
Контроль	10	162,2±15,1
Ротенон	8	78,6±17,2**
Ротенон+Изатин	8	135,1±18,8 <sup>#</sup> *
Изатин	9	158,7±16,1
Ротенон+Афобазол	8	94,6±27,3*
Афобазол	10	162,2±15,3

Примечание: \*, \*\* –  $p<0,05$ ,  $p<0,01$ , соответственно, в сравнении с группой “Контроль”; # –  $p<0,05$  в сравнении с группой “Ротенон”.

Таблица 3. Влияние изатина и афобазола на ригидность и поструральную неустойчивость крыс с ПС вызванным системным введением ротенона (7 день введения)

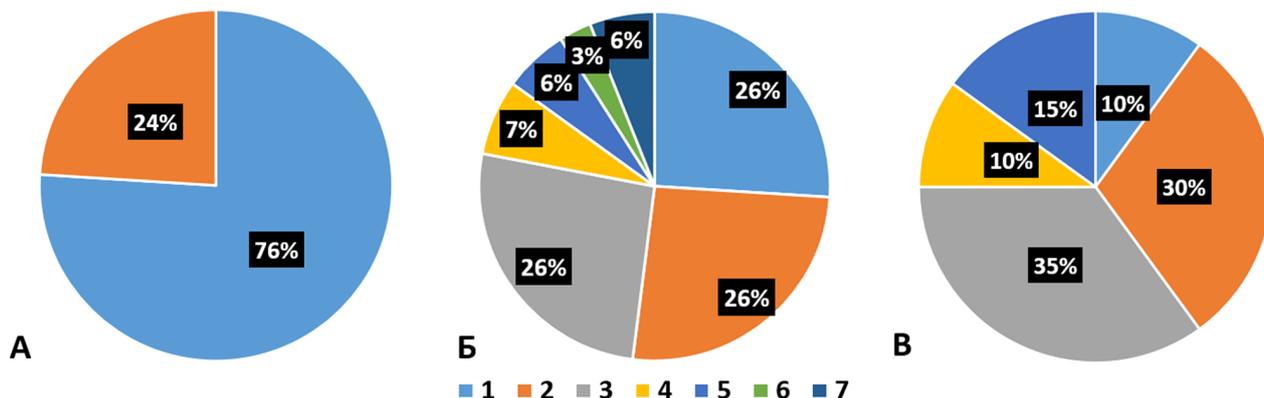
Группа	Количество животных	Ригидность	Постуральная неустойчивость	
		Длина шага, см	Левая лапа, см	Правая лапа, см
Контроль	10	10,8±0,3	2,7±0,2	2,9±0,2
Ротенон	10	7,7±0,6***	4,8±0,2***	4,4±0,3***
Ротенон+Изатин	9	8,8±0,4***	3,7±0,2 <sup>###</sup> *	3,7±0,2**
Изатин	9	10,9±0,4	2,7±0,3	2,6±0,2
Ротенон+Афобазол	8	10,3±0,7 <sup>#</sup>	3,4±0,2 <sup>##</sup> *	3,3±0,3 <sup>#</sup> *
Афобазол	10	11,1±0,3	2,4±0,2	2,7±0,2

Примечание: \*\*, \*\*\* –  $p<0,01$ ,  $p<0,001$ , соответственно, в сравнении с группой “Контроль”; #, ## –  $p<0,05$ ,  $p<0,01$ , соответственно, в сравнении с группой “Ротенон”.

животных, их возможной гибелью, олигокинезией, ригидностью и поструральной неустойчивостью. Корректирующее влияние изатина, который вводили однократно подкожно в дозе 100 мг/кг на фоне предварительного введения ротенона, проявилось в снижении поструральной неустойчивости, а также уменьшении олигокинезии, регистрируемой по показателям двигательной активности в тестах “Открытое поле” и “Вращающийся стержень”. Субхроническое 7-дневное введение афобазола уменьшило проявления ригидности и поструральной неустойчивости крыс с ПС, индуцированным введением ротенона, и не оказало влияния на другие регистрируемые параметры в условиях данной модели. Эти результаты свидетельствуют о разных механизмах нейропротекторных эффектов изатина и афобазола.

*Влияние нейротоксина ротенона и нейропротекторов изатина и афобазола на относительное содержание белков мозга крыс*

Протеомный анализ показал, что нейротоксин ротенон и нейропротекторы афобазол и изатин значимо влияют на относительное содержание в мозге крыс восьмидесяти шести белков, относящихся к различным функциональным группам (табл. S1, Дополнительные материалы). При этом выявлены сходные количественные изменения в мозге крыс с ротеноновым паркинсонизмом, которым вводили ротенон или афобазол. Обнаружено увеличение относительного содержания 65 белков и снижение относительного содержания 21 белка (соответственно 76% и 24% от общего количества, см. рис. 1А). Среди белков, относительное содержание



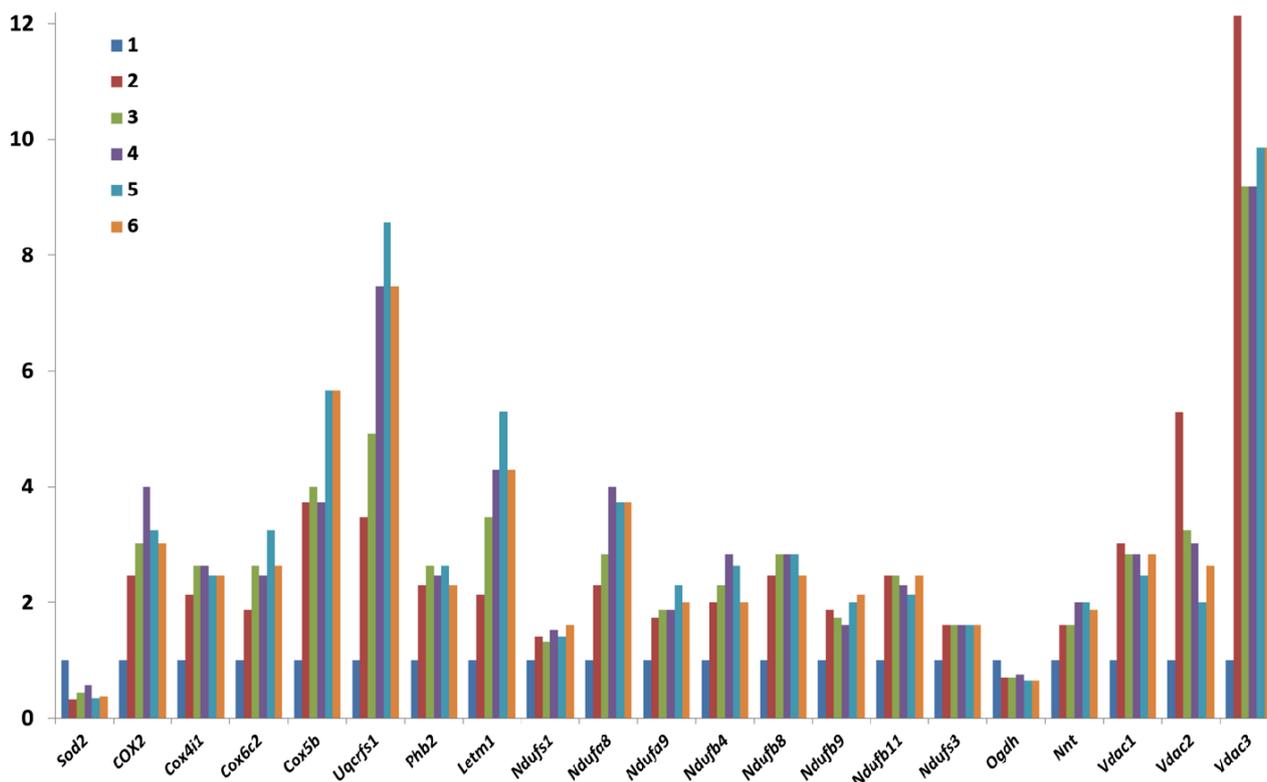
**Рисунок 1.** А – доля белков, относительное содержание которых увеличивается или уменьшается при введении нейротоксина ротенона и нейропротекторов изатина и афобазола, от общего количества. Б, В – распределение белков, относительное содержание которых значимо меняется при введении ротенона и нейропротекторов, по функциям: Б – увеличение, В – уменьшение относительного содержания соответствующих белков. Функции белков: 1. Белки/ферменты, участвующие в процессах генерации энергии и углеводного обмена. 2. Белки, участвующие в образовании цитоскелета и экзоцитозе. 3. Белки, участвующие в передаче сигнала и регуляции активности ферментов. 4. Антиоксидантные и защитные белки/ферменты. 5. Белки-регуляторы экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки. 6. Ферменты, участвующие в метаболизме белков, аминокислот и других азотистых соединений. 7. Ферменты, участвующие в метаболизме липидов. Цветной вариант рисунка доступен в электронной версии статьи.

которых увеличивается в той или иной степени (как при введении нейротоксина, так и при введении обоих нейропротекторов отдельно или совместно с нейротоксином), преобладают функциональные группы ферментов, ответственных за генерацию энергии и углеводный обмен, белков цитоскелета и экзоцитоза и белков передачи сигнала и регуляции активности ферментов (каждая из групп составляет 26% от общего числа белков). Остальные 22% в совокупности приходятся на долю антиоксидантных и защитных белков, регуляторов экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки, ферментов метаболизма белков и других азотистых соединений, а также ферментов метаболизма липидов (рис. 1Б). Среди белков, относительное содержание которых уменьшается как при введении ротенона, так и при введении обоих нейропротекторов отдельно или совместно с ротеноном, наибольшее количество выполняет функции передачи сигнала и регуляции активности ферментов (35%) и цитоскелета (30%). Доли антиоксидантных и защитных белков, а также ферментов генерации энергии и углеводного обмена составляют по 10%, а 15% от общего количества приходится на белки-регуляторы экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки (рис. 1В).

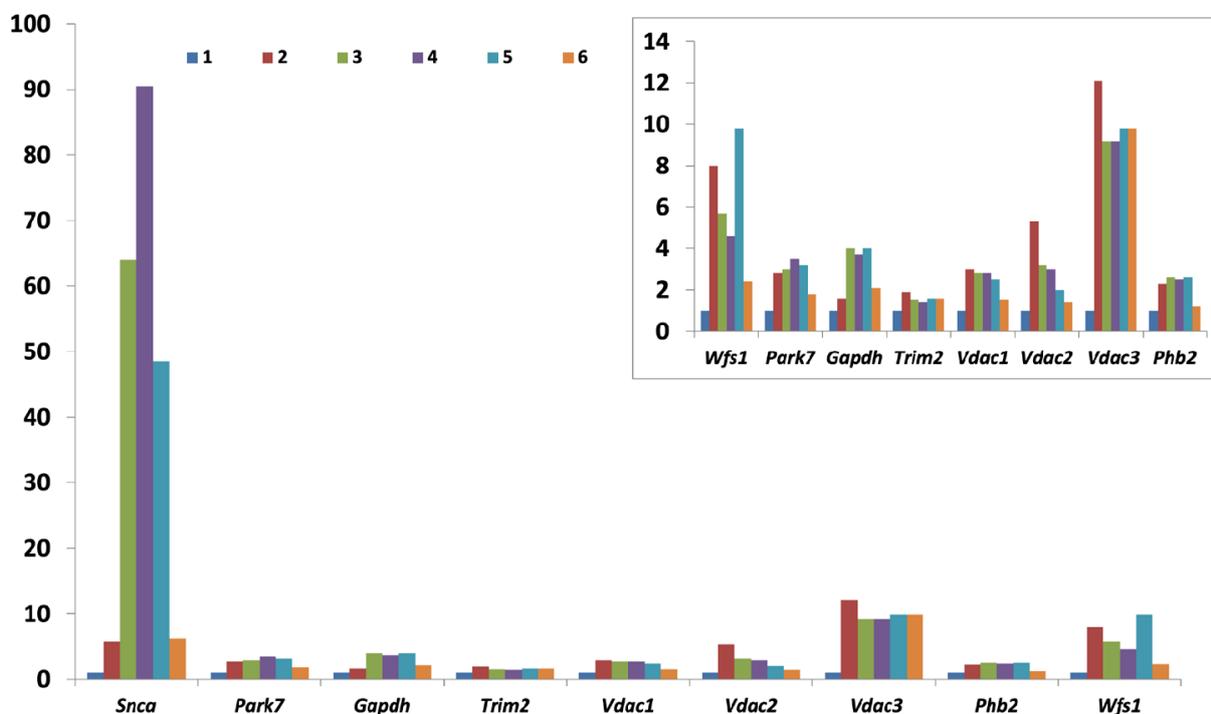
Среди белков, относительное содержание которых изменяется при введении нейротоксина и нейропротекторов изатина и афобазола, можно выделить группу митохондриальных белков (рис. 2); в большинстве это компоненты цитохром *c*-оксидазного комплекса и потенциал-зависимых ионных каналов. Наши результаты согласуются с многочисленными данными литературы о ключевой роли митохондриальной дисфункции в патогенезе БП (например, [21–23]).

Также среди белков, относительное содержание которых значимо меняется под воздействием ротенона, изатина и афобазола, обнаружены белки, нарушение функций которых связано с нейродегенерацией (рис. 3). К ним относятся модулятор различных сигнальных путей — белок DJ-1 (Parkinson disease protein 7 homolog) [24–27], глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, [28–32], TRIM2 (E3-убиквитин лигаза Tripartite motif-containing protein 2) [33, 34], рецептор внутренней мембраны митохондрий прохибитин 2 (Prohibitin-2) — участник сигнального пути (в который входят также маркеры паркинсонизма PINK1 и Parkin), запускающего митофагию [35, 36], компоненты потенциал-зависимых ионных каналов (рис. 3). Также претерпевает количественные изменения мембранный белок вольфрамин (WFS1), ответственный за регуляцию стресса эндоплазматического ретикулума и внутриклеточного транспорта кальция [37]. Мутации гена *Wfs1* вызывают редкое аутосомно-рецессивное нейродегенеративное заболевание синдром Вольфрама [38]. При этом снижение увеличенного содержания связанных с нейродегенерацией белков мозга, обнаруженного при моделировании ротенонового паркинсонизма, в ответ на введение изатина и/или афобазола (рис. 2 и 3) отмечено только для компонентов потенциал-зависимых ионных каналов (Vdac, Voltage-dependent anion-selective channel proteins) 1, 2 и 3. Во всех остальных случаях антагонизма между эффектами введения нейротоксина ротенона и нейропротекторов изатина и афобазола обнаружено не было.

Изо всех выявленных в данной работе белков, относительное содержание которых значимо изменяется при введении ротенона и/или изатина и афобазола, наиболее интересные результаты



**Рисунок 2.** Кратные изменения относительного содержания митохондриальных белков в мозге крыс при воздействии ротенона, изатина и афобазола. На диаграмме указаны названия генов. В Дополнительных материалах приведены номера и названия белков по базе Uniprot (см. таблицу к рисунку 2). *P*-значения для каждого измерения даны в общей таблице S1. Здесь и на рисунке 3 экспериментальные группы: 1 – Контроль; 2 – Ротенон; 3 – Ротенон+Изатин; 4 – Изатин; 5 – Ротенон+Афобазол; 6 – Афобазол. Цветной вариант рисунка доступен в электронной версии статьи.



**Рисунок 3.** Кратные изменения относительного содержания связанных с патогенезом БП белков при воздействии ротенона, изатина и афобазола. На врезке для большей наглядности данных для остальных белков исключён альфа-синуклеин, относительное содержание которого изменяется наибольшим образом. На диаграммах указаны названия генов. В Дополнительных материалах приведены номера и названия белков по базе Uniprot (см. таблицу к рисунку 3). *P*-значения для каждого измерения даны в общей таблице S1. Цветной вариант рисунка доступен в электронной версии статьи.

получены для альфа-синуклеина (рис. 3, а также Дополнительные материалы). Этому белку отводят ключевую роль в возникновении БП [39–43].

В норме альфа-синуклеин в основном локализуется в пресинаптических окончаниях, где усиливает слияние синаптических пузырьков с пресинаптической мембраной. Показано, что он имеет структуру, во многом гомологичную структуре белков семейства 14-3-3, шаперонов, так же, как и альфа-синуклеин, широко представленных в мозге и участвующих в регуляции множества клеточных процессов: апоптоза, клеточного цикла, деления, экспрессии генов и др. [44]. При синуклеинопатиях альфа-синуклеин агрегирует, может накапливаться в ассоциации с мембранами разных клеточных органелл. Его агрегаты накапливаются как в пресинаптических окончаниях (тем самым тормозя высвобождение дофамина), так и в теле нейрона в виде телец Леви (которые содержат также липиды и мембранные органеллы, включая аутофагосомы) и их предшественников — более диффузных структур, так называемых “бледных телец” [41].

Культивирование клеток нейробластомы человека SK-N-MC в течение 1 недели с 5 нМ ротеноном приводило к 40% увеличению растворимого альфа-синуклеина; длительная инкубация этих клеток в течение 4 недель сопровождалась 30% увеличением синуклеина, не растворимого в 12% додецилсульфате натрия при сохранении повышенного уровня растворимого синуклеина [45]. В наших экспериментах изменение относительного содержания синуклеина обнаружено в надосадочной жидкости лизата гомогената мозга с конечным содержанием Тритона X-100 1% (см. раздел “Методика”). По данным других авторов, растворимые в 1%–2% Тритоне формы синуклеина представлены в основном мономерами различной длины с различными посттрансляционными модификациями [46–48]. С учётом этих данных, обнаруженное нами в ходе протеомного профилирования увеличение относительного содержания растворимого в Тритоне X-100 альфа-синуклеина, очевидно, обусловлено увеличенной продукцией и/или сниженной деградацией растворимого белка. Следует отметить, что оценка относительных изменений белков мозга при индуцированном ротеноном паркинсонизме была выполнена без учёта возможного влияния ротенона, изастина и афобазола на объём клеток мозга. Известно, например, что в условиях истощения запасов АТФ в клетках он может увеличиваться на 200% [49] и тем самым оказывать влияние на относительные количественные показатели результатов протеомного анализа. Нельзя исключить, что этот фактор оказывает определённое влияние на относительные величины белков мозга, вызванные введением исследуемых препаратов.

Введение ротенона повышало относительное содержание растворимого в Тритоне X-100 синуклеина в мозге, а введение изастина или афобазола интактным животным приводило к существенному

повышению относительного содержания этого белка в мозге. Это свидетельствует о том, что обнаруженный эффект обусловлен именно введением исследованных нейропротекторов.

Ранее была показана нейропротекторная роль альфа-синуклеина. Сверхэкспрессия альфа-синуклеина человека защищала дофаминергические нейроны крысы (клетки N27) от токсического действия МФП<sup>+</sup> (1-метил-4-фенилпиридиния), взаимодействуя с проапоптотическими факторами BAD и PKC $\delta$  [50]. da Costa и соавторы на клеточной линии TSM1 (нервные клетки мышцы) наблюдали протекторную функцию альфа-синуклеина дикого типа (но не альфа-синуклеина с аминокислотной заменой Ala-53-Thr, ассоциированной с БП) в ответ на различные апоптотические стимулы [51]. В опытах на трансгенных мышцах сверхэкспрессия альфа-синуклеина защищала от нейродегенерации, вызванной токсическим действием пестицида параквата. Эти результаты указывают на необязательное соответствие между обусловленным действием токсина накоплением альфа-синуклеина и нейродегенерацией [52].

С учётом этих и других известных данных о физиологической роли альфа-синуклеина [53], увеличение содержания этого белка в мозге при введении нейропротекторов животным с ротеноновым паркинсонизмом может представлять стимулируемую нейропротекторами компенсаторную реакцию, во всяком случае, на ранних стадиях этого заболевания и начала его лечения. Это возвращает исследования альфа-синуклеина из области патофизиологии в область компенсаторной нейрофизиологии и клеточной биологии.

## **БЛАГОДАРНОСТИ**

Масс-спектрометрический анализ белков выполнен с использованием оборудования и ресурсов ЦКП “Протеом человека” при ИБМХ.

## **ФИНАНСИРОВАНИЕ**

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 гг.) (№ 122030100170-5).

## **СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ**

Эксперименты проводили с соблюдением общепринятых норм гуманного отношения к лабораторным животным.

## **КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

*Дополнительные материалы доступны в электронной версии статьи на сайте журнала (pbmc.ibmc.msk.ru).*

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Duty S., Jenner P.* (2011) Animal models of Parkinson's disease: A source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br. J. Pharmacol.*, **164**(4), 1357-1391. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01426.x
2. *Fleming S.M., Zhu C., Fernagut P.O., Mehta A., Dicarolo C.D., Seaman R.L., Chesselet M.F.* (2004) Behavioral and immunohistochemical effects of chronic intravenous and subcutaneous infusions of varying doses of rotenone. *Exp. Neurol.*, **187**(2), 418-429. DOI: 10.1016/j.expneurol.2004.01.023
3. *Fleming S.M., Salcedo J., Fernagut P.O., Rockenstein E., Masliah E., Levine M.S., Chesselet M.F.* (2004) Early and progressive sensorimotor anomalies in mice overexpressing wild-type human alpha-synuclein. *J. Neurosci.*, **24**(42), 9434-9440. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3080-04.2004
4. *Cannon J.R., Tapias V.M., Na H.M., Honick A.S., Drolet R.E., Greenamyre J.T.* (2009) A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.*, **34**(2), 279-290. DOI: 10.1016/j.nbd.2009.01.016
5. *Медведев А.Е., Бунеева О.А., Копылов А.Т., Тихонова О.В., Медведева М.В., Неробкова Л.Н., Капица И.Г., Згода В.Г.* (2017) Митохондриальный субпротеом Rpn10-связывающих белков мозга и его изменения, индуцированные нейротоксином МФТП и нейропротектором изатином. *Биохимия*, **82**, 470-480. [*Medvedev A.E., Buneeva O.A., Kopylov A.T., Tikhonova O.V., Medvedeva M.V., Nerobkova L.N., Kapitsa I.G., Zgoda V.G.* (2017) Brain mitochondrial subproteome of Rpn10-binding proteins and its changes induced by the neurotoxin MPTP and the neuroprotector isatin. *Biochemistry (Moscow)*, **82**(3), 330-339.] DOI: 10.1134/S0006297917030117
6. *Buneeva O., Kopylov A., Kapitsa I., Ivanova E., Zgoda V., Medvedev A.* (2018) The effect of neurotoxin MPTP and neuroprotector isatin on the profile of ubiquitinated brain mitochondrial proteins. *Cells*, **7**(8), 91. DOI: 10.3390/cells7080091
7. *Medvedev A., Buneeva O., Gnedenko O., Ershov P., Ivanov A.* (2018) Isatin, an endogenous non-peptide biofactor: A review of its molecular targets, mechanisms of actions and their biomedical implications. *Biofactors*, **44**, 95-108. DOI: 10.1002/biof.1408
8. *Medvedev A., Buneeva O.* (2022) Tryptophan metabolites as mediators of microbiota-gut-brain communication: Focus on isatin. *Front. Behav. Neurosci.*, **16**, 922274. DOI: 10.3389/fnbeh.2022.922274
9. *Tetrad J.W., Langston J.W.* (1989) MPTP-induced Parkinsonism as a model for Parkinson's disease. *Acta Neurol. Scand.*, **126**, 35-40. DOI: 10.1111/j.1600-0404.1989.tb01780.x
10. *Langston J.W.* (2017) The MPTP story. *J. Parkinsons Dis.*, **7**(s1), S11-S19. DOI: 10.3233/JPD-179006
11. *Buneeva O., Gnedenko O., Zgoda V., Kopylov A., Glover V., Ivanov A., Medvedev A., Archakov A.* (2010) Isatin binding proteins of rat and mouse brain: Proteomic identification and optical biosensor validation. *Proteomics*, **10**, 23-37. DOI: 10.1002/pmic.200900492
12. *Medvedev A., Kopylov A., Buneeva O., Kurbatov L., Tikhonova O., Ivanov A., Zgoda V.A.* (2020) Neuroprotective dose of isatin causes multilevel changes involving the brain proteome: Prospects for further research. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**(11), 4187. DOI: 10.3390/ijms21114187
13. *Medvedev A., Buneeva O., Gnedenko O., Fedchenko V., Medvedeva M., Ivanov Y., Glover V., Sandler M.* (2006) Isatin interaction with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, a putative target of neuroprotective drugs: Partial agonism with deprenyl. *J. Neural. Transm. Suppl.*, **71**, 97-103. DOI: 10.1007/978-3-211-33328-0\_11
14. *Saravanan K.S., Sindhu K.M., Senthilkumar K.S., Mohanakumar K.P.* (2006) L-deprenyl protects against rotenone-induced, oxidative stress-mediated dopaminergic neurodegeneration in rats. *Neurochem. Int.*, **49**(1), 28-40. DOI: 10.1016/j.neuint.2005.12.016
15. *Середенин С.Б., Воронин М.В.* (2009) Нейрорецепторные механизмы действия афобазола. Экспериментальная и клиническая фармакология, **72**(1), 3-11. [*Seredenin S.B., Voronin M.V.* (2009) Neuroreceptor mechanisms involved in the action of afobazole. *Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology*, **72**(1), 3-11.] DOI: 10.30906/0869-2092-2009-72-1-3-11
16. *Капица И.Г., Иванова Е.А., Вальдман Е.А., Воронина Т.А.* (2017) Активность афобазола на экспериментальных моделях болезни Паркинсона. Экспериментальная и клиническая фармакология, **8**(6), 3-7. [*Kapitsa I.G., Ivanova E.A., Val'dman E.A., Voronina T.A.* (2017) Activity of afobazole in experimental models of Parkinson's disease. *Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology*, **8**(6), 3-7.] DOI: 10.30906/0869-2092-2017-80-6-3-7
17. *Воронина Т.А., Середенин С.Б., Яркова М.А., Воронин М.В.* (2012) Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств, часть первая. (Миронов А.Н., ред.), Гриф и К, Москва, 994 с. [*Voronina T.A., Seredenin S.B., Yarkova M.A., Voronin M.V.* (2012) *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv, chast' pervaya* (Mironov A.N., ed.), Grif i K, Moskva, 994 p.]
18. *Капица И.Г., Казиева Л.Ш., Вавилов Н.Э., Згода В.Г., Копылов А.Т., Медведев А.Е., Бунеева О.А.* (2023) Особенности поведенческих реакций и профиля изатин-связывающих белков мозга у крыс с индуцированным ротеиноном экспериментальным паркинсонизмом. *Биомедицинская химия*, **69**(1), 46-54. [*Kapitsa I.G., Kazieva L.S., Vavilov N.E., Zgoda V.G., Kopylov A.T., Medvedev A.E., Buneeva O.A.* (2023) Characteristics of behavioral reactions and the profile of brain isatin-binding proteins of rats with the rotenone-induced experimental parkinsonism. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **69**(1), 46-54.] DOI: 10.18097/PBMC20236901046
19. *Bradford M.M.* (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999
20. *Бунеева О.А., Капица И.Г., Казиева Л.Ш., Вавилов Н.Э., Згода В.Г., Медведев А.Е.* (2023) Количественные изменения изатин-связывающих белков мозга у крыс с индуцированным ротеиноном экспериментальным паркинсонизмом. *Биомедицинская химия*, **69**(3), 188-192. [*Buneeva O.A., Kapitsa I.G., Kazieva L.S., Vavilov N.E., Zgoda V.G., Medvedev A.E.* (2023) Quantitative changes of brain isatin-binding proteins of rats with the rotenone-induced experimental parkinsonism. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **69**(3), 188-192.] DOI: 10.18097/PBMC20236903188
21. *Bose A., Beal M.F.* (2016) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *J. Neurochem.*, **139**(Suppl 1), 216-231. DOI: 10.1111/jnc.13731

22. *Borsche M., Pereira S.L., Klein C., Grünewald A.* (2021) Mitochondria and Parkinson's disease: Clinical, molecular, and translational aspects. *J. Parkinsons Dis.*, **11**(1), 45-60. DOI: 10.3233/JPD-201981
23. *Sohrabi T., Mirzaei-Behbahani B., Zadali R., Pirhaghi M., Morozova-Roche L.A., Meratan A.A.* (2023) Common mechanisms underlying  $\alpha$ -synuclein-induced mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *J. Mol. Biol.*, **435**(12), 167992. DOI: 10.1016/j.jmb.2023.167992
24. *Neves M., Grãos M., Anjo S.I., Manadas B.* (2022) Modulation of signaling pathways by DJ-1: An updated overview. *Redox Biol.*, **51**, 102283. DOI: 10.1016/j.redox.2022.102283
25. *Buneeva O.A., Medvedev A.E.* (2021) DJ-1 protein and its role in the development of Parkinson's disease: Studies on experimental models. *Biochemistry (Moscow)*, **86**(6), 627-640. DOI: 10.1134/S000629792106002X
26. *Betarbet R., Canet-Aviles R.M., Sherer T.B., Mastroberardino P.G., McLendon C., Kim J.H., Lund S., Na H.M., Taylor G., Bence N.F., Kopito R., Seo B.B., Yagi T., Yagi A., Klinefelter G., Cookson M.R., Greenamyre J.T.* (2006) Intersecting pathways to neurodegeneration in Parkinson's disease: Effects of the pesticide rotenone on DJ-1, alpha-synuclein, and the ubiquitin-proteasome system. *Neurobiol. Dis.*, **22**(2), 404-420. DOI: 10.1016/j.nbd.2005.12.003
27. *de Miranda B.R., Rocha E.M., Bai Q., El Ayadi A., Hinkle D., Burton E.A., Greenamyre J.T.* (2018) Astrocyte-specific DJ-1 overexpression protects against rotenone-induced neurotoxicity in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.*, **115**, 101-114. DOI: 10.1016/j.nbd.2018.04.008
28. *Vanle B.C., Florang V.R., Murry D.J., Aguirre A.L., Doorn J.A.* (2017) Inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by the dopamine metabolite, 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **492**(2), 275-281. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.08.067
29. *Nakajima H., Amano W., Kubo T., Fukuhara A., Ihara H., Azuma Y.T., Tajima H., Inui T., Sawa A., Takeuchi T.* (2009) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase aggregate formation participates in oxidative stress-induced cell death. *J. Biol. Chem.*, **284**(49), 34331-34341. DOI: 10.1074/jbc.M109.027698
30. *Sofronova A.A., Pozdyshev D.V., Barinova K.V., Muronetz V.I., Semenyuk P.I.* (2021) Glycation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibits the binding with  $\alpha$ -synuclein and RNA. *Arch. Biochem. Biophys.*, **698**, 108744. DOI: 10.1016/j.abb.2020.108744
31. *Muronetz V.I., Melnikova A.K., Seferbekova Z.N., Barinova K.V., Schmalhausen E.V.* (2017) Glycation, glycolysis, and neurodegenerative diseases: Is there any connection? *Biochemistry (Moscow)*, **82**(8), 874-886. DOI: 10.1134/S0006297917080028.
32. *Berry M.D.* (2004) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a target for small-molecule disease-modifying therapies in human neurodegenerative disorders. *J. Psychiatry Neurosci.*, **29**(5), 337-345. PMID: 15486605; PMCID: PMC518865
33. *Ylikallio E., Pöyhönen R., Zimon M., de Vriendt E., Hilander T., Paetau A., Jordanova A., Lönnqvist T., Tyynismaa H.* (2013) Deficiency of the E3 ubiquitin ligase TRIM2 in early-onset axonal neuropathy. *Hum. Mol. Genet.*, **22**(15), 2975-283. DOI: 10.1093/hmg/ddt149
34. *Balastik M., Ferraguti F., Pires-da Silva A., Lee T.H., Alvarez-Bolado G., Lu K.P., Gruss P.* (2008) Deficiency in ubiquitin ligase TRIM2 causes accumulation of neurofilament light chain and neurodegeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**(33), 12016-1221. DOI: 10.1073/pnas.0802261105
35. *Yan C., Gong L., Chen L., Xu M., Abou-Hamdan H., Tang M., Désaubry L., Song Z.* (2020) PHB2 (prohibitin 2) promotes PINK1-PRKN/Parkin-dependent mitophagy by the PARL-PGAM5-PINK1 axis. *Autophagy*, **16**(3), 419-434. DOI: 10.1080/15548627.2019.1628520
36. *Dutta D., Ali N., Banerjee E., Singh R., Naskar A., Paidi R.K., Mohanakumar K.P.* (2018) Low levels of prohibitin in substantia nigra makes dopaminergic neurons vulnerable in Parkinson's disease. *Mol. Neurobiol.*, **55**(1), 804-821. DOI: 10.1007/s12035-016-0328-y
37. *Li L., Venkataraman L., Chen S., Fu H.* (2020) Function of WFS1 and WFS2 in the central nervous system: Implications for Wolfram syndrome and Alzheimer's disease. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **118**, 775-783. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2020.09.011
38. *Mishra R., Chen B.S., Richa P., Yu-Wai-Man P.* (2021) Wolfram syndrome: New pathophysiological insights and therapeutic strategies. *Ther. Adv. Rare Dis.*, **2**, 26330040211039518. DOI: 10.1177/26330040211039518
39. *Sulzer D., Edwards R.H.* (2019) The physiological role of  $\alpha$ -synuclein and its relationship to Parkinson's disease. *J. Neurochem.*, **150**, 475-486.
40. *Ottolini D., Cali T., Szabò I., Brini M.* (2017) Alpha-synuclein at the intracellular and the extracellular side: Functional and dysfunctional implications. *Biol. Chem.*, **398**(1), 77-100. DOI: 10.1515/hsz-2016-0201
41. *Oliveira L.M.A., Gasser T., Edwards R., Zweckstetter M., Melki R., Stefanis L., Lashuel H.A., Sulzer D., Vekrellis K., Halliday G.M., Tomlinson J.J., Schlossmacher M., Jensen P.H., Schulze-Hentrich J., Riess O., Hirst W.D., El-Agnaf O., Mollenhauer B., Lansbury P., Outeiro T.F.* (2021) Alpha-synuclein research: Defining strategic moves in the battle against Parkinson's disease. *NPJ Parkinsons Dis.*, **7**, 65. DOI: 10.1038/s41531-021-00203-9
42. *Chen R., Gu X., Wang X.* (2022)  $\alpha$ -Synuclein in Parkinson's disease and advances in detection. *Clin. Chim. Acta.*, **529**, 76-86. DOI: 10.1016/j.cca.2022.02.006
43. *Atik A., Stewart T., Zhang J.* (2016) Alpha-synuclein as a biomarker for Parkinson's disease. *Brain Pathol.*, **26**(3), 410-418. DOI: 10.1111/bpa.12370
44. *Ostrerova N., Petrucelli L., Farrer M., Mehta N., Choi P., Hardy J., Wolozin B.* (1999)  $\alpha$ -Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins. *J. Neurosci.*, **19**(14), 5782-5791. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.19-14-05782.1999
45. *Sherer T.B., Betarbet R., Stout A.K., Lund S., Baptista M., Panov A.V., Cookson M.R., Greenamyre J.T.* (2002) An *in vitro* model of Parkinson's disease: Linking mitochondrial impairment to altered alpha-synuclein metabolism and oxidative damage. *J. Neurosci.*, **22**(16), 7006-7015. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-16-07006.2002
46. *Vasili E., Dominguez-Mejide A., Flores-Leyn M., Al-Azzani M., Kanellidi A., Melki R., Stefanis L., Outeiro T.F.* (2022) Endogenous levels of alpha-synuclein modulate seeding and aggregation in cultured cells. *Mol. Neurobiol.*, **59**(2), 1273-1284. DOI: 10.1007/s12035-021-02713-2
47. *Bhattacharjee P., Öhrfelt A., Lashley T., Blennow K., Brinkmalm A., Zetterberg H.* (2019) Mass spectrometric analysis of lewy body-enriched  $\alpha$ -synuclein in Parkinson's disease. *J. Proteome Res.*, **18**(5), 2109-2120. DOI: 10.1021/acs.jproteome.8b00982

48. Klucken J., Shin Y., Masliah E., Hyman B.T., McLean P.J. (2004) Hsp70 reduces alpha-synuclein aggregation and toxicity. *J. Biol. Chem.*, **279**(24), 25497-25502. DOI: 10.1074/jbc.M400255200
49. Jurkowitz-Alexander M.S., Altschuld R.A., Hohl C.M., Johnson J.D., McDonald J.S., Simmons T.D., Horrocks L.A. (1992) Cell swelling, blebbing, and death are dependent on ATP depletion and independent of calcium during chemical hypoxia in a glial cell line (ROC-1). *J. Neurochem.*, **59**(1), 344-352. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1992.tb08910.x
50. Kaul S., Anantharam V., Kanthasamy A., Kanthasamy A.G. (2005) Wild-type alpha-synuclein interacts with pro-apoptotic proteins PKCdelta and BAD to protect dopaminergic neuronal cells against MPP<sup>+</sup>-induced apoptotic cell death. *Mol. Brain Res.*, **139**(1), 137-152. DOI: 10.1016/j.molbrainres.2005.05.022
51. da Costa C.A., Ancolio K., Checler F. (2000) Wild-type but not Parkinson's disease-related ala-53 --> Thr mutant alpha-synuclein protects neuronal cells from apoptotic stimuli. *J. Biol. Chem.*, **275**(31), 24065-24069. DOI: 10.1074/jbc.M002413200
52. Manning-Bog A.B., McCormack A.L., Purisai M.G., Bolin L.M., di Monte D.A. (2003) Alpha-synuclein overexpression protects against paraquat-induced neurodegeneration. *J. Neurosci.*, **23**(8), 3095-3099. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.23-08-03095.2003
53. Sulzer D., Edwards R.H. (2019) The physiological role of  $\alpha$ -synuclein and its relationship to Parkinson's disease. *J. Neurochem.*, **150**(5), 475-486. DOI: 10.1111/jnc.14810

Поступила в редакцию: 21. 09. 2023.  
После доработки: 18. 10. 2023.  
Принята к печати: 20. 10. 2023.

### NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF ISATIN AND AFOBAZOLE IN RATS WITH ROTENONE-INDUCED PARKINSONISM ARE ACCOMPANIED BY INCREASED BRAIN LEVELS OF TRITON X-100 SOLUBLE ALPHA-SYNUCLEIN

*O.A. Buneeva<sup>1\*</sup>, I.G. Kapitsa<sup>1,2</sup>, V.G. Zgoda<sup>1</sup>, A.E. Medvedev<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Chemistry,  
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; \*e-mail: olbuneeva@gmail.com  
<sup>2</sup>Zakusov Institute of Pharmacology, 8 Baltiyskaya str, Moscow, 125315 Russia

Effects of the endogenous neuroprotector isatin and the pharmacological drug afobazole (exhibiting neuroprotective properties) on behavioral reactions and quantitative changes in the brain proteomic profile have been investigated in rats with experimental rotenone Parkinsonism. A single dose of isatin (100 mg/kg subcutaneously on the last day of a 7-day course of rotenone administration) improved the motor activity of rats with rotenone-induced Parkinsonism in the open field test (horizontal movements) and the rotating rod test. Afobazole (10 mg/kg intraperitoneally, daily during the 7-day course of rotenone administration) reduced the manifestations of rigidity and postural instability. Proteomic analysis, performed using brain samples obtained the day after the last administration of rotenone and neuroprotectors, revealed similar quantitative changes in the brain of rats with rotenone Parkinsonism. An increase in the relative content of 65 proteins and a decrease in the relative content of 21 proteins were detected. The most pronounced changes — an almost ninety-fold increase in the alpha-synuclein content — were found in the brains of rats treated with isatin. In animals of the experimental groups treated with “Rotenone + Isatin”, as well as “Rotenone + Afobazole”, the increase in the relative content of this protein in the brain was almost 60 and 50 times higher than the control values. Taking into consideration the known data on the physiological role of alpha-synuclein, an increase in the content of this protein in the brain upon administration of neuroprotectors to animals with rotenone Parkinsonism may represent a compensatory reaction, at least in the early stages of this disease and the beginning of its treatment.

*The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.*

**Key words:** Parkinsonism; neurotoxin rotenone; neurodegeneration; alpha-synuclein; neuroprotectors; isatin; afobazole; brain; proteomic profiling

**Funding.** The work was carried out within the framework of the Program of Fundamental Scientific Research in the Russian Federation for a long-term period (2021–2030) (No. 122030100170-5).

Received: 21.09.2023; revised: 18.10.2023; accepted: 20.10.2023.