

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ИЗАТИНА В РОТЕНОНОВОЙ МОДЕЛИ ПАРКИНСОНИЗМА У КРЫС: ИССЛЕДОВАНИЕ ОТСРОЧЕННЫХ ЭФФЕКТОВ

О.А. Бунеева^{1*}, И.Г. Капица^{1,2}, Л.Ш. Казиева¹, Н.Э. Вавилов¹, В.Г. Згода¹, А.Е. Медведев¹

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, Погодинская ул., 10; *эл. почта: olbuneeva@gmail.com

²Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова,
125315, Москва, Балтийская ул., 8

Вызванный введением пестицида ротенона паркинсонизм у крыс — одна из наиболее адекватных моделей болезни Паркинсона (БП). Изатин (индолдион-2,3) — эндогенный регулятор, обнаруженный в организме млекопитающих и человека и обладающий широким спектром биологической активности благодаря большому набору изатин-связывающих белков, в том числе ассоциированных с нейродегенеративной патологией. Курсовое введение ротенона вызывало у крыс нарушения поведенческих реакций и изменения профиля и относительного содержания изатин-связывающих белков мозга. В данной работе исследовали отсроченное нейропротекторное влияние изатина (через 5 дней после завершения курсового введения ротенона) на поведенческие реакции и относительное содержание изатин-связывающих белков мозга крыс с индуцированным ротеноном экспериментальным паркинсонизмом. Хотя в этот период времени у крыс сохранялись нарушения локомоторных функций, данные протеомного анализа (профиль изатин-связывающих белков мозга и изменения их относительного содержания) отличались от результатов, полученных сразу после завершения курсового введения ротенона. При этом все изатин-связывающие белки, относительное содержание которых изменялось в данный период времени, в той или иной степени ассоциированы с нейродегенерацией (многие — с болезнями Паркинсона и Альцгеймера).

Ключевые слова: изатин; изатин-связывающие белки мозга; паркинсонизм; ротенон; нейродегенерация; нейропротекторы; протеомное профилирование

DOI: 10.18097/PBMC20247004231

ВВЕДЕНИЕ

Экспериментальный паркинсонизм, индуцированный у крыс введением пестицида ротенона, — одна из наиболее адекватных моделей болезни Паркинсона (БП). Как и в случае с моделированием БП введением мышам нейротоксина МФТП (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина), при ротеноновом паркинсонизме у животных наблюдается дофаминергическая нейродегенерация и олигокинезия как на ранних стадиях развития паркинсонического синдрома, так и в отсроченный период [1–6]. Изатин (индолдион-2,3) — эндогенный регулятор, обнаруженный в организме млекопитающих и человека и обладающий широким спектром биологической активности благодаря большому набору изатин-связывающих белков [7–10], в том числе ассоциированных с нейродегенеративной патологией [9, 11]. Как и в случае МФТП-индуцированного паркинсонизма [12, 13], при ротеноновой модели БП изатин оказывает нейропротекторный эффект, уменьшая признаки олигокинезии и постуральной неустойчивости; однако, в отличие от модели МФТП-индуцированного паркинсонизма, в случае ротеноновой модели профиль изатин-связывающих белков почти не изменяется [5]. Тем не менее, введение ротенона влияет на относительное содержание изатин-связывающих белков как сразу по окончании курса этого нейротоксина, так и спустя 5 дней после последнего введения [6, 14].

Целью данной работы было исследование отсроченного эффекта нейропротектора изатина на выраженность физиологических реакций и количественных изменений протеомного профиля изатин-связывающих белков мозга крыс.

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-карбоксиэтил)-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

Моделирование ПС с помощью системного введения ротенона проводили согласно руководству [15]. Животные случайным образом были разделены на четыре группы (табл. 1):

- 1) группа “Контроль” (10 крыс); животным вводили ежедневно (7 дней) физиологический раствор внутривентриально в эквивалентном объёме 0,2 мл на 100 г веса тела животного;
- 2) группа “Ротенон” (12 крыс; животным вводили ежедневно (7 дней) внутривентриально ротенон в дозе 2,75 мг/кг;
- 3) группа “Ротенон+Изатин” (9 крыс); животным вводили ежедневно (7 дней) внутривентриально ротенон и однократно, на 7 день, изатин в дозе 100 мг/кг подкожно;
- 4) группа “Изатин” (9 крыс); животным вводили ежедневно физиологический раствор и однократно, на 7 день, изатин в дозе 100 мг/кг подкожно.

Ротенон вводили в растворе в нейтральном триглицериде миглиоле (Miglyol 840). Раствор готовили, как описано ранее [5]. После проведения поведенческих тестов на 12 день эксперимента (через 5 дней после последнего введения ротенона) животных декапитировали под лёгким эфирным наркозом, готовили лизаты гомогенатов мозга и пробы для масс-спектрометрического анализа.

Тестирование поведенческих реакций

Оценку олигокинезии в тестах “Открытое поле” и “Вращающийся стержень” проводили на 12 день эксперимента, через 5 суток после последнего введения нейротоксина, как это подробно описано ранее [5].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica v. 10.0 [5]. Результаты в таблицах представлены как среднее \pm ошибка среднего (Mean \pm SEM). Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$. Различия при $0,05 < p < 0,1$ считали статистической тенденцией.

Подготовка проб для масс-спектрометрического анализа

Приготовление лизатов гомогенатов мозга и подготовка проб для масс-спектрометрического анализа (экстракция белков, алкилирование и трипсинолиз) подробно описаны ранее [6, 14].

Масс-спектрометрический анализ

Масс-спектрометрический анализ осуществляли с использованием оборудования центра коллективного пользования “Протеом человека” (Институт биомедицинской химии) — системы высокоэффективного жидкостного разделения пептидов Ultimate 3000 RSLCnano (“Thermo Scientific”, США) в нанопотоковом режиме масс-спектрометрического детектора Q-Exactive HFX (“Thermo Scientific”), как описано ранее [5]. Биоинформатическую обработку данных проводили согласно [5]. Каждый из представленных в таблицах белков был идентифицирован, по меньшей мере, в трёх независимых экспериментах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Отсроченное влияние изатина на двигательные нарушения у крыс, вызванные введением нейротоксина ротенона

В наших предыдущих экспериментах при системном введении ротенона уже на седьмые сутки у животных наблюдалось состояние, характерное для развёрнутой стадии БП: значимая потеря веса, олигокинезия, ригидность и постуральная неустойчивость. Корректирующее влияние изатина, вводимого однократно подкожно в дозе 100 мг/кг на фоне курсового введения ротенона, проявлялось в снижении постуральной неустойчивости и уменьшении олигокинезии, регистрируемым по показателям двигательной активности в тестах “Открытое поле” и “Вращающийся стержень” [16]. В данной работе снижение показателей двигательной активности и координации движений животных относительно контрольной группы наблюдалось и через 5 дней после последнего введения ротенона. Так, в группе “Ротенон” число перемещений в тесте “Открытое поле” составляло 47,3% от контроля, а число стоек — 58,8%. Продолжительность удержания на вращающемся стержне у животных группы “Ротенон” составляла 49,0% от таковой у животных контрольной группы (табл. 2). Корректирующее влияние изатина, регистрируемое в тестах “Открытое поле” и “Вращающийся стержень”, также сохранялось и на 12 день эксперимента. Соответствующие показатели у группы “Ротенон+Изатин” по сравнению с группой “Контроль” составляли 67,1% в случае числа перемещений, 75,3% в случае числа стоек и 73,6% в опыте “Вращающийся стержень” (табл. 2).

Таблица 1. Моделирование экспериментального паркинсонизма у крыс (схема эксперимента)

| Группа животных | День эксперимента | Физиологический раствор | Ротенон 2,75 мг/кг внутривентриально | Изатин 100 мг/кг подкожно |
|-----------------|-------------------|-------------------------|--------------------------------------|---------------------------|
| Контроль | 1–7 | + | | |
| Ротенон | 1–7 | | + | |
| Ротенон+Изатин | 7 | | | + |
| Ротенон+Изатин | 1–7 | | + | |
| Изатин | 7 | | | + |
| Изатин | 1–7 | + | | |

Таблица 2. Отсроченное влияние изатина на двигательную активность и координацию движений крыс с индуцированной ротеноном БП (через пять дней после завершения курса введения токсина)

| Группа животных | Количество животных | Двигательная активность, ед. | | Продолжительность удержания на горизонтальном стержне, вращающемся с постоянной скоростью 12 об/мин, с |
|-----------------|---------------------|------------------------------------|----------------------------|--|
| | | Горизонтальная (число перемещений) | Вертикальная (число стоек) | |
| Контроль | 10 | 14,6±2,4 | 9,7±2,2 | 177,8±2,3 |
| Ротенон | 12 | 6,9±0,9** | 5,7±0,5 | 87,2±12,4*** |
| Ротенон+Изатин | 9 | 9,8±1,7 | 7,3±2,1 | 130,9±17,5*# |
| Изатин | 9 | 12,1±2,9 | 7,3±1,6 | — |

Примечание. Данные представлены в виде среднего значения ± ошибка средней; *, **, *** – $p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$ соответственно, в сравнении с группой “Контроль”; # – $p<0,05$, в сравнении с группой “Ротенон”.

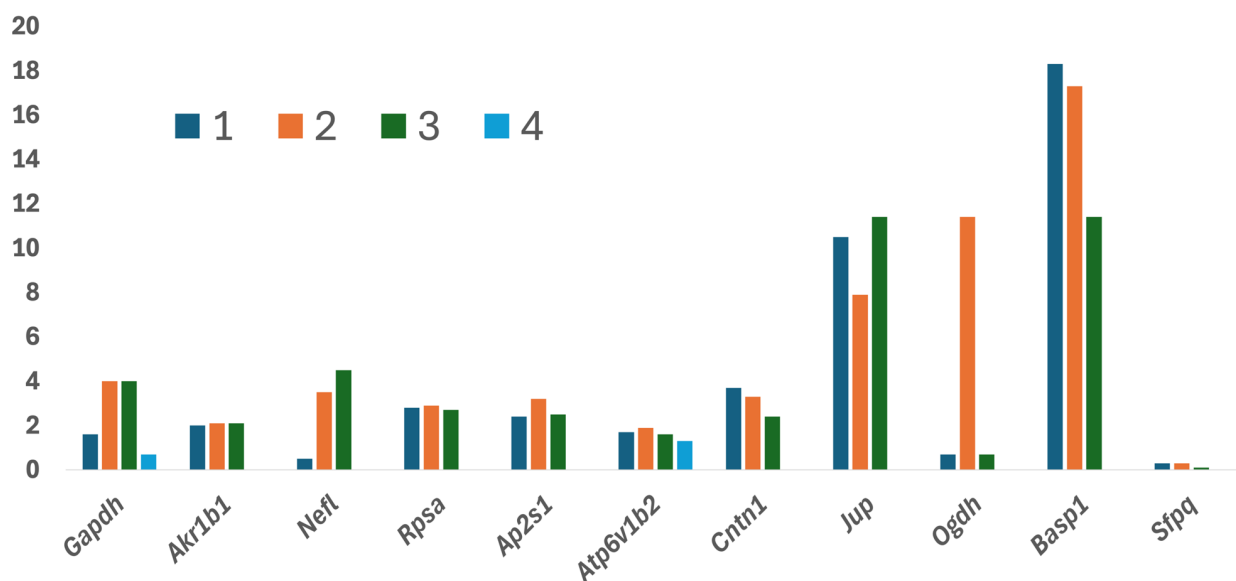


Рисунок 1. Кратные изменения относительного содержания изатин-связывающих белков в мозге крыс при воздействии ротенона и изатина. На диаграмме указаны названия генов. Названия белков по базе Uniprot и P-значения для каждого измерения приведены в таблице 3. Экспериментальные группы: 1,4 – Ротенон; 2 – Ротенон+Изатин; 3 – Изатин; 1-3 – 7 день эксперимента; 4 – 12 день эксперимента.

Отсроченное влияние изатина на протеомный спектр изатин-связывающих белков мозга крыс

Сравнительная протеомная идентификация относительного содержания белков мозга контрольных крыс и крыс с индуцированной ротеноном БП показала изменение уровня 11 изатин-связывающих белков мозга непосредственно после окончания курса ротенона [14]. При этом нейропротекторный эффект изатина на фоне введения ротенона, как видно из таблицы 3 и рисунка 1, наиболее ярко проявляется в отношении 2-оксоглутаратдегидрогеназы (компонента E1 мультиферментного митохондриального комплекса). Относительное содержание 2-оксоглутаратдегидрогеназы по сравнению с контролем на фоне введения ротенона несколько снижается (0,7 от контроля), а при введении изатина резко повышается (в 11,4 раза). Известна роль 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса в нарушениях энергетического обмена, характерных для нейродегенеративных заболеваний. Снижение активности 2-оксоглутарадегидрогеназы коррелирует

с нарушениями метаболизма в мозге при болезнях Паркинсона и Альцгеймера. 2-Оксоглутаратдегидрогеназа инактивируется под действием токсина МФТП, применяющегося для моделирования БП у животных, и других токсинов, вызывающих окислительный стресс [28–31]. Кроме того, показано, что 2-оксоглутаратдегидрогеназный комплекс играет роль и в наследственной предрасположенности к БП. Частота встречаемости генотипа, несущего аллель с заменой одного нуклеотида в гене, кодирующем дигидролипоамид-сукцинилтрансферазу (E2 компонент этого мультиферментного комплекса), существенно выше у больных БП по сравнению с контрольной группой [35].

Через 5 дней после курса нейротоксина отмечены изменения в относительном содержании 16 белков по сравнению с контролем. При этом были выявлены только два белка (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа и субъединица В протонной АТФазы V-типа), относительное содержание которых менялось также сразу после окончания курса ротенона ([6] и рисунки 1 и 2А).

Таблица 3. Влияние однократного введения изатина на относительное содержание изатин-связывающих белков мозга крыс с индуцированной курсовым введением ротенона БП

| № | № по базе Uniprot | Ген по Uniprot | Название белка по Uniprot | Функция | Локализация | Отличие от контроля (Ротенон) | | Отличие от контроля (Ротенон+Изатин) | | Отличие от контроля (Изатин) | | Литература |
|----|-------------------|-----------------|--|---------|--------------|-------------------------------|------------------|--------------------------------------|------------------|------------------------------|------------------|------------|
| | | | | | | Кратность изменения | -Log(P-значение) | Кратность изменения | -Log(P-значение) | Кратность изменения | -Log(P-значение) | |
| 1 | P04797 | <i>Gapdh</i> | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | 1 | C, N | 1,60 | 2,4 | 4,00 | 3,8 | 4,00 | 3,6 | [17, 18] |
| 2 | P07943 | <i>Akr1b1</i> | Aldo-keto reductase family 1 member B1 | 7 | C | 2,00 | 3,4 | 2,10 | 3,6 | 2,10 | 3,5 | [19] |
| 3 | P19527 | <i>Nefl</i> | Neurofilament light polypeptide | 2 | C, S | 0,50 | 3,1 | 3,50 | 2,6 | 4,50 | 3,0 | [20] |
| 4 | P38983 | <i>Rpsa</i> | 40S ribosomal protein SA | 5 | C, N, PM | 2,80 | 4,0 | 2,90 | 3,3 | 2,70 | 3,1 | [21] |
| 5 | P62744 | <i>Ap2s1</i> | AP-2 complex subunit sigma | 2 | M, PM | 2,40 | 3,4 | 3,20 | 3,2 | 2,50 | 2,6 | [22, 23] |
| 6 | P62815 | <i>Atp6v1b2</i> | V-type proton ATPase subunit B, brain isoform | 2 | M, PM, Ve, S | 1,76 | 4,4 | 1,90 | 3,7 | 1,60 | 3,3 | [24] |
| 7 | Q63198 | <i>Cntn1</i> | Contactin-1 | 3 | PM | 3,70 | 3,0 | 3,30 | 3,0 | 2,40 | 1,8 | [25] |
| 8 | Q6P0K8 | <i>Jup</i> | Junction plakoglobin | 2 | C, M | 10,50 | 3,0 | 7,90 | 2,2 | 11,40 | 2,4 | [26, 27] |
| 9 | A0A8I6A1Y1 | <i>Ogdh</i> | Oxoglutarate dehydrogenase (succinyl-transferring) | 1 | Mch, N | 0,70 | 3,4 | 11,40 | 3,2 | 0,70 | 3,0 | [28-31] |
| 10 | A0A8I6A304 | <i>Baspl</i> | Brain abundant, membrane attached signal protein 1 | 3 | C, N | 18,30 | 5,1 | 17,30 | 3,7 | 11,40 | 4,6 | [32] |
| 11 | A0A8I6A7U6 | <i>Sfpq</i> | Splicing factor proline and glutamine rich | 5 | C, N | 0,30 | 4,9 | 0,30 | 4,0 | 0,10 | 2,2 | [33, 34] |

Примечание. Здесь и в остальных таблицах:

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.

Локализация: С – цитоплазма, N – ядро, M – мембраны, PM – плазматическая мембрана, G – комплекс Гольджи, Mch – митохондрии, L – лизосомы, Mic – микросомы, E – эндосомы, Ve – везикулы.

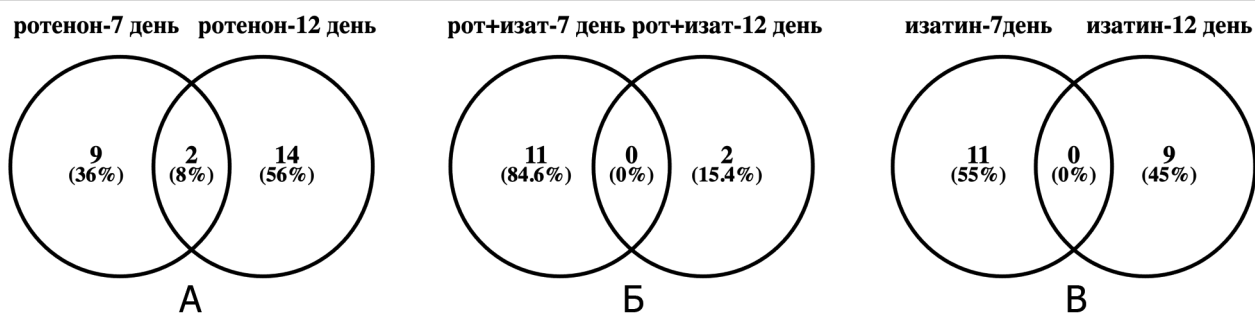


Рисунок 2. Диаграммы Венна. Изатин-связывающие белки с достоверным изменением относительного содержания (острый и отсроченный эффекты). Группы животных: **А** – Ротенон, **Б** – Ротенон+Изатин, **В** – Изатин.

Таблица 4. Отсроченное влияние введения изатина на относительное содержание изатин-связывающих белков мозга крыс через пять дней после завершения курсового введения ротенона

| № | № по базе Uniprot | Ген по Uniprot | Название белка по Uniprot | Функции | Локализация | Кратность изменения | -Log(P-значение) | Литература |
|---|-------------------|-----------------|--------------------------------|---------|---------------|---------------------|------------------|------------|
| 1 | Q2I6B2 | <i>Atp6v0a1</i> | V-type proton ATPase subunit A | 2 | M, PM, Me, Ve | 2,5 | 3,8 | [36] |
| 2 | Q63654 | <i>Ubc</i> | Polyubiquitin | 6 | C, N | 1,9 | 3,0 | [37] |

Таблица 5. Влияние однократного введения изатина на относительное содержание изатин-связывающих белков мозга крыс на 12 день эксперимента

| № | № по базе Uniprot | Ген по Uniprot | Название белка по Uniprot | Функции | Локализация | Кратность изменения | -Log(P-значение) | Литература |
|---|-------------------|----------------|--|---------|-------------|---------------------|------------------|------------|
| 1 | P62944 | <i>Ap2b1</i> | AP-2 complex subunit beta | 3 | M, PM | 1,8 | 2,8 | [22, 23] |
| 2 | Q6XD99 | <i>Sptbn1</i> | Spectrin beta chain | 2 | C, N | 1,7 | 2,2 | [38, 39] |
| 3 | G3V6P2 | <i>Dlst</i> | Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial | 1 | Mch | 1,6 | 2,1 | [35] |
| 4 | Q5RJQ4 | <i>Sirt2</i> | NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-2 | 3 | N, C | 1,5 | 2,1 | [40, 41] |
| 5 | P47819 | <i>Gfap</i> | Glial fibrillary acidic protein | 2 | C | 0,7 | 2,0 | [42] |
| 6 | Q7M0E3 | <i>Dstn</i> | Destrin | 2 | C | 0,7 | 2,3 | [43–46] |
| 7 | P09117 | <i>Aldoc</i> | Fructose-bisphosphate aldolase C | 1 | C synaps | 0,7 | 2,4 | [47, 48] |
| 8 | P07335 | <i>Ckb</i> | Creatine kinase B-type | 1 | C, Mch, PM | 0,6 | 2,8 | [49, 50] |
| 9 | P07323 | <i>Eno2</i> | Gamma-enolase | 1 | C, PM | 0,6 | 2,3 | [51] |

В группах животных “Ротенон+Изатин” и “Изатин” не обнаружены общие белки, относительное содержание которых изменялось в мозге животных сразу после завершения курсового введения ротенона и через 5 дней (табл. 3–5 и рис. 2Б и 2В). В группе “Ротенон+Изатин” на 12 день всего у двух белков отмечено увеличение относительного содержания по сравнению с контролем. Это субъединица А протонной АТФазы V-типа и полиубиквитин (табл. 4). В группе “Изатин” отсроченное влияние этого нейротектора изменяло относительное содержание 9 белков по сравнению с контрольной группой. Отмечено незначительное снижение (до уровня 0,6–0,7) содержания дестрина (фактора деполимеризации актина), глиального фибриллярного кислого белка, креатинкиназы, а также мультифункциональных белков гликолиза гамма-енолазы и фруктозобисфосфаталядолазы. При этом происходило небольшое повышение

уровня бета-субъединицы AP-2 комплекса, бета-субъединицы спектрина, E2 компонента 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса, а также NAD-зависимой деацетилазы сиртуина 2 (табл. 5). Интересно отметить, что все обнаруженные в отсроченном эффекте меняющие своё относительное содержание изатин-связывающие белки в той или иной степени ассоциированы с нейродегенерацией, многие с болезнями Паркинсона и Альцгеймера [22, 23, 35, 38–51].

В контексте т.н. токсических моделей БП, индуцированных нейротоксинами с различными механизмами действия (МФТП и ротенон), следует отметить, что протекторное действие изатина, по-видимому, осуществляется разными путями. В случае МФТП-индуцированной модели БП у мышей действие изатина прежде всего обусловлено ингибированием активности моноаминоксидазы B — фермента, ответственного за биоактивацию

протоксина МФТП в нейротоксин МФП⁺ (ион метилфенилпиридиния) [52]. Влияние на многочисленные изатин-связывающие белки, по-видимому, благоприятствует реализации различных защитных реакций, в частности, действуя на убиквитин-протеасомную систему, участвующую, помимо элиминации поврежденных и неправильно собранных белков, в регуляции самых различных клеточных процессов, включая стабильность генома, иммунный ответ, передачу сигнала и многое другое [37, 53]. В ходе протеомного профилирования изатин-связывающих белков мозга нами были выявлены ферменты, имеющие непосредственное отношение к убиквитин-протеасомной системе: E3 убиквитинпротеинлигаза MYCBP2, убиквитин-карбоксиконцевая гидролаза 24, E3 убиквитин-протеинлигаза MIB2, E3 убиквитинпротеинлигаза HUWE1, вариант 1 убиквитин конъюгирующего фермента, полиубиквитин [54]. Было показано влияние нейротоксина МФТП и нейропротектора изатина на изменение митохондриальных субпротеомов белков, взаимодействующих с компонентами Rpn10- и Rpn13-регуляторной субчастицы протеасом [52, 55].

В случае ротеноновой модели БП у крыс действие изатина, очевидно, реализуется по другому сценарию и через вовлечение других изатин-связывающих белков. С одной стороны, это может быть связано с межвидовыми особенностями (эффекты изатина у мышей и крыс не всегда совпадают [9]), с другой — очевидным “волнообразным” изменением уровня белков-мишеней (изатин-связывающих белков), которые по-разному меняются в динамике развития БП как под действием нейротоксина, так и самого изатина, который, как известно, влияет на относительный уровень многих важных белков мозга [56].

БЛАГОДАРНОСТИ

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

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (проект № 23-25-00066).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты проводили с соблюдением общепринятых норм гуманного отношения к лабораторным животным, в соответствии с Приказом Минздрава РФ №199н от 1 апреля 2016 г. “Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики” и директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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., Dicarlo 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. Каница 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 ротеноном 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
6. Бунеева О.А., Каница И.Г., Казиева Л.Ш., Вавилов Н.Э., Згода В.Г., Медведев А.Е. (2024) Отсроченное действие ротенона на относительное содержание изатин-связывающих белков мозга у крыс с экспериментальным паркинсонизмом. *Биомедицинская химия*, **70**(1), 25–32. [Buneeva O.A., Kapitsa I.G., Kazieva L.S., Vavilov N.E., Zgoda V.G., Medvedev A.E. (2024) The delayed effect of rotenone on the relative content of brain isatin-binding proteins of rats with experimental parkinsonism. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **70**(1), 25–32.] DOI: 10.18097/PBMC20247001025
7. Medvedev A., Igosheva N., Crumeyrolle-Arias M., Glover V. (2005) Isatin: Role in stress and anxiety. *Stress*, **8**(3), 175–183. DOI: 10.1080/10253890500342321
8. Medvedev A., Buneeva O., Glover V. (2007) Biological targets for isatin and its analogues: Implications for therapy. *Biologics*, **1**(2), 151–162.
9. 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
10. 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
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. 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
13. Бунеева О.А., Капица И.Г., Иванова Е.А., Копылов А.Т., Згода В.Г., Медведев А.Е. (2019) Изменение профиля изатин-связывающих белков мозга мышей при однократном введении нейропротекторной дозы изатина или депренила. *Биомедицинская химия*, **65**(5), 407–417. [Buneeva O.A., Kapitsa I.G., Ivanova E.A., Kopylov A.T., Zgoda V.G., Medvedev A.E. (2019) The effect of a neuroprotective dose of isatin or deprenyl to mice on the profile of brain isatin-binding proteins. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **65**(5), 407–417.] DOI: 10.18097/PBMC20196505407
14. 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 ротеноном 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
15. 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.]
16. Бунеева О.А., Капица И.Г., Згода В.Г., Медведев А.Е. (2023) Нейропротекторные эффекты изатина и афобазола сопровождаются увеличением уровня растворимого в Тритоне X-100 альфа-синуклеина в мозге крыс с экспериментальным ротеноновым паркинсонизмом. *Биомедицинская химия*, **69**(5), 290–299. [Buneeva O.A., Kapitsa I.G., Zgoda V.G., Medvedev A.E. (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. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **69**(5), 290–299.] DOI: 10.18097/PBMC20236905290
17. Barinova K., Khomyakova E., Semenyuk P., Schmalhausen E., Muronetz V. (2018) Binding of alpha-synuclein to partially oxidized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induces subsequent inactivation of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.*, **642**, 10–22. DOI: 10.1016/j.abb.2018.02.002
18. Gerszon J., Rodacka A. (2018) Oxidatively modified glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in neurodegenerative processes and the role of low molecular weight compounds in counteracting its aggregation and nuclear translocation. *Ageing Res. Rev.*, **48**, 21–31. DOI: 10.1016/j.arr.2018.09.003
19. Zhao Y., Zhang M., Li H., Yang Y., Lu X., Yu J., Pan L. (2023) Aldo-keto reductase 1B: Much learned, much more to do. *HLife*, **2023**, DOI: 10.1016/j.hlife.2023.12.002
20. Lewczuk P., Ermann N., Andreasson U., Schultheis C., Podhorna J., Spitzer P., Maler J.M., Kornhuber J., Blennow K., Zetterberg H. (2018) Plasma neurofilament light as a potential biomarker of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res. Ther.*, **10**(1), 71. DOI: 10.1186/s13195-018-0404-9
21. Song D.G., Kim Y.S., Jung B.C., Rhee K.J., Pan C.H. (2013) Parkin induces upregulation of 40S ribosomal protein SA and posttranslational modification of cytokeratins 8 and 18 in human cervical cancer cells. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **171**(7), 1630–1638. DOI: 10.1007/s12010-013-0443-4
22. Martinez V.J., Asico L.D., Jose P.A., Tiu A.C. (2020) Lipid rafts and dopamine receptor signaling. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**(23), 8909. DOI: 10.3390/ijms21238909
23. Zhang X., Zhou J.Y., Chin M.H., Schepmoes A.A., Petyuk V.A., Weitz K.K., Petritis B.O., Monroe M.E., Camp D.G., Wood S.A., Melega W.P., Bigelow D.J., Smith D.J., Qian W.J., Smith R.D. (2010) Region-specific protein abundance changes in the brain of MPTP-induced Parkinson's disease mouse model. *J. Proteome Res.*, **9**(3), 1496–1509. DOI: 10.1021/pr901024z AP2
24. Song Q., Meng B., Xu H., Mao Z. (2020) The emerging roles of vacuolar-type ATPase-dependent lysosomal acidification in neurodegenerative diseases. *Transl. Neurodegener.*, **9**(1), 17. DOI: 10.1186/s40035-020-00196-0
25. Chatterjee M., van Steenoven I., Huisman E., Oosterveld L., Berendse H., van der Flier W.M., del Campo M., Lemstra A.W., van de Berg W.D.J., Teunissen C.E. (2020) Contactin-1 is reduced in cerebrospinal fluid of Parkinson's disease patients and is present within Lewy bodies. *Biomolecules*, **10**(8), 1177. DOI: 10.3390/biom10081177
26. Wang H., Sun C., Liang Y., Zhang H., Tan Y. (2013) Identification of regulatory relationships in Parkinson's disease. *J. Mol. Neurosci.*, **51**(1), 9–12. DOI: 10.1007/s12031-012-9937-8
27. Stocker A.M., Chenn A. (2015) The role of adherens junctions in the developing neocortex. *Cell Adh. Migr.*, **9**(3), 167–174. DOI: 10.1080/19336918.2015.1027478
28. Tretter L., Adam-Vizi V. (2000) Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: A key role of [alpha]-ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress. *J. Neurosci.*, **20**(24), 8972–8979. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.20-24-08972.2000
29. Gibson G.E., Xu H., Chen H.L., Chen W., Denton T.T., Zhang S. (2015) Alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex-dependent succinylation of proteins in neurons and neuronal cell lines. *J. Neurochem.*, **134**(1), 86–96. DOI: 10.1111/jnc.13096
30. Hansen G.E., Gibson G.E. (2022) The α -ketoglutarate dehydrogenase complex as a hub of plasticity in neurodegeneration and regeneration. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**(20), 12403. DOI: 10.3390/ijms232012403
31. Gibson G.E., Park L.C., Sheu K.F., Blass J.P., Calingasan N.Y. (2000) The alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in neurodegeneration. *Neurochem. Int.*, **36**(2), 97–112. DOI: 10.1016/s0197-0186(99)00114-x
32. Chung D., Shum A., Caraveo G. (2020) GAP-43 and BASP1 in axon regeneration: implications for the treatment of neurodegenerative diseases. *Front. Cell Dev. Biol.*, **8**, 567537. DOI: 10.3389/fcell.2020.567537
33. Lim Y.W., James D., Huang J., Lee M. (2020) The emerging role of the RNA-binding protein SFPQ in neuronal function and neurodegeneration. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**(19), 7151. DOI: 10.3390/ijms21197151
34. Hogan A.L., Grima N., Fifita J.A., McCann E.P., Heng B., Fat S.C.M., Wu S., Maharjan R., Cain A.K., Henden L., Rayner S., Tarr I., Zhang K.Y., Zhao Q., Zhang Z.H., Wright A., Lee A., Morsch M., Yang S., Williams K.L., Blair I.P. (2021) Splicing factor proline and glutamine rich intron retention, reduced expression and aggregate formation

- are pathological features of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **47**(7), 990–1003. DOI: 10.1111/nan.12749
35. Kobayashi T., Matsumine H., Matuda S., Mizuno Y. (1998) Association between the gene encoding the E2 subunit of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex and Parkinson's disease. *Ann. Neurol.*, **43**(1), 120–123. DOI: 10.1002/ana.410430121
 36. Collins M.P., Forgac M. (2020) Regulation and function of V-ATPases in physiology and disease. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, **1862**(12), 183341. DOI: 10.1016/j.bbmem.2020.183341
 37. Buneeva O., Medvedev A. (2022) Atypical ubiquitination and Parkinson's disease. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**(7), 3705. DOI: 10.3390/ijms23073705
 38. Morrow J.S., Stankewich M.C. (2021) The spread of spectrin in ataxia and neurodegenerative disease. *J. Exp. Neurol.*, **2**(3), 131–139.
 39. Maor G., Dubreuil R.R., Feany M.B. (2023) α -Synuclein promotes neuronal dysfunction and death by disrupting the binding of ankyrin to β -spectrin. *J. Neurosci.*, **43**(9), 1614–1626. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1922-22.2022
 40. Liu Y., Zhang Y., Zhu K., Chi S., Wang C., Xie A. (2020) Emerging role of sirtuin 2 in parkinson's disease. *Front. Aging Neurosci.*, **11**, 372. DOI: 10.3389/fnagi.2019.00372
 41. Wu Q.J., Zhang T.N., Chen H.H., Yu X.F., Lv J.L., Liu Y.Y., Liu Y.S., Zheng G., Zhao J.Q., Wei Y.F., Guo J.Y., Liu F.H., Chang Q., Zhang Y.X., Liu C.G., Zhao Y.H. (2022) The sirtuin family in health and disease. *Signal Transduct. Target Ther.*, **7**(1), 402. DOI: 10.1038/s41392-022-01257-8
 42. Tang Y., Han L., Li S., Hu T., Xu Z., Fan Y., Liang X., Yu H., Wu J., Wang J. (2023) Plasma GFAP in Parkinson's disease with cognitive impairment and its potential to predict conversion to dementia. *NPJ Parkinsons Dis.*, **9**(1), 23. DOI: 10.1038/s41531-023-00447-7
 43. Bernstein B.W., Bamburg J.R. (2010) ADF/cofilin: A functional node in cell biology. *Trends Cell Biol.*, **20**(4), 187–195. DOI: 10.1016/j.tcb.2010.01.001
 44. Minamide L.S., Striegl A.M., Boyle J.A., Meberg P.J., Bamburg J.R. (2000) Neurodegenerative stimuli induce persistent ADF/cofilin-actin rods that disrupt distal neurite function. *Nat. Cell Biol.*, **2**(9), 628–636. DOI: 10.1038/35023579
 45. Lapeña-Luzón T., Rodríguez L.R., Beltran-Beltran V., Benetó N., Pallardó F.V., Gonzalez-Cabo P. (2021) Cofilin and neurodegeneration: New functions for an old but gold protein. *Brain Sci.*, **11**(7), 954. DOI: 10.3390/brainsci11070954
 46. Ben Zablah Y., Merovitch N., Jia Z. (2020) The role of ADF/cofilin in synaptic physiology and Alzheimer's disease. *Front. Cell Dev. Biol.*, **8**, 594998. DOI: 10.3389/fcell.2020.594998
 47. Stefanizzi I., Cañete-Soler R. (2007) Coregulation of light neurofilament mRNA by poly(A)-binding protein and aldolase C: Implications for neurodegeneration. *Brain Res.*, **1139**, 15–28. DOI: 10.1016/j.brainres.2006.12.092
 48. Kingsbury A.E., Cooper M., Schapira A.H., Foster O.J. (2001) Metabolic enzyme expression in dopaminergic neurons in Parkinson's disease: An *in situ* hybridization study. *Ann. Neurol.*, **50**(2), 142–149. DOI: 10.1002/ana.1051
 49. Vassilopoulos D., Jockers-Wretou E. (1987) Serum creatine kinase B levels in diseases of the central nervous system. *Eur. Neurol.*, **27**(2), 78–81. DOI: 10.1159/000116135
 50. Xu J., Fu X., Pan M., Zhou X., Chen Z., Wang D., Zhang X., Chen Q., Li Y., Huang X., Liu G., Lu J., Liu Y., Hu Y., Pan S., Wang Q., Wang Q., Xu Y. (2019) Mitochondrial creatine kinase is decreased in the serum of idiopathic Parkinson's disease patients. *Aging Dis.*, **10**(3), 601–610. DOI: 10.14336/AD.2018.0615
 51. Katayama T., Sawada J., Takahashi K., Yahara O., Hasebe N. (2021) Meta-analysis of cerebrospinal fluid neuron-specific enolase levels in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and multiple system atrophy. *Alzheimers Res. Ther.*, **13**(1), 163. DOI: 10.1186/s13195-021-00907-3
 52. 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**(3), 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
 53. Бунеева О.А., Медведев А.Е. (2016) Роль атипичного убиквитинирования в клеточной регуляции. *Биомедицинская химия*, **62**(5), 496–509 [Buneeva O.A., Medvedev A.E. (2016) Atypical ubiquitination of proteins. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **62**(5), 496–509.] DOI: 10.18097/PBMC20166205496
 54. Бунеева О.А., Копылов А.Т., Тихонова О.В., Згода В.Г., Медведев А.Е., Арчаков А.И. (2012) Влияние аффинного сорбента на протеомное профилирование изатинсвязывающих белков мозга мыши. *Биохимия*, **77**(11), 1584–1599 [Buneeva O.A., Kopylov A.T., Tikhonova O.V., Zgoda V.G., Medvedev A.E., Archakov A.I. (2012) Effect of affinity sorbent on proteomic profiling of isatin-binding proteins of mouse brain. *Biochemistry (Moscow)*, **77**(11), 1326–1338.] DOI: 10.1134/S0006297912110120
 55. Бунеева О.А., Копылов А.Т., Гнеденко О.В., Медведева М.В., Капица И.Г., Иванова Е.А., Иванов А.С., Медведев А.Е. (2021) Изменение митохондриального субпротеома Rpn13-связывающихся белков мозга мыши под действием нейротоксина МФТП и нейропротектора изатина. *Биомедицинская химия*, **67**(1), 51–65 [Buneeva O.A., Kopylov A.T., Gnedenko O.V., Medvedeva M.V., Kapitsa I.G., Ivanova E.A., Ivanov A.S., Medvedev A.E. (2021) Changes in the mitochondrial subproteome of mouse brain Rpn13-binding proteins induced by the neurotoxin MPTP and the neuroprotector isatin. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **67**(1), 51–65.] DOI: 10.18097/PBMC20216701051
 56. Medvedev A., Kopylov A., Buneeva O., Kurbatov L., Tikhonova O., Ivanov A., Zgoda V. (2020) A 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

Поступила в редакцию: 11. 06. 2024.
После доработки: 14. 07. 2024.
Принята к печати: 15. 07. 2024.

**THE NEUROPROTECTIVE EFFECT OF ISATIN IN THE ROTENONE-INDUCED
MODEL OF PARKINSONISM IN RATS: THE STUDY OF DELAYED EFFECTS**

O.A. Buneeva^{1*}, I.G. Kapitsa^{1,2}, L.Sh. Kazieva¹, N.E. Vavilov¹, V.G. Zgoda¹, A.E. Medvedev¹

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

Parkinsonism in rats induced by the pesticide rotenone is one of the most adequate models of Parkinson's disease (PD). Isatin (indole-2,3-dione) is an endogenous regulator found in mammals and humans and exhibiting a wide range of biological activities mediated by numerous isatin-binding proteins, including those associated with neurodegenerative pathology. A course of rotenone administration to rats caused behavioral impairments and changes in the profile and relative content of isatin-binding proteins in the brain. In this study, we have investigated the delayed neuroprotective effect of isatin (5 days after completion of the course of rotenone administration) on behavioral reactions and the relative content of isatin-binding proteins in the brain of rats with rotenone-induced experimental parkinsonism. Although during this period the rats retained locomotor dysfunction, the proteomic analysis data (profile of isatin-binding proteins in the brain and changes in their relative content) differed from the results obtained immediately after completion of the course of rotenone administration. Moreover, all isatin-binding proteins with altered relative content changed during this period are associated to varying degrees with neurodegeneration (many with Parkinson's and Alzheimer's diseases).

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

Key words: isatin; isatin-binding proteins in the brain; parkinsonism; rotenone; neurodegeneration; neuroprotectors; proteomic profiling

Funding. This work was supported by the Russian Science Foundation (project no. 23-25-00066).

Received: 11.06.2024; revised: 14.07.2024; accepted: 15.07.2024.