

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЯ ВВЕДЕНИЯ ДЕПРЕНИЛА И ИЗАТИНА МЫШАМ НА ПРОФИЛЬ ИЗАТИН-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ ПЕЧЕНИ

О.А. Бунеева, А.Т. Копылов, В.Г. Згода, А.Е. Медведев*

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича,
119121, Москва, Погодинская ул. 10; эл. почта: professor57@yandex.ru

Изатин (индол-2,3-дион) – эндогенный индол, обнаруженный в мозге, периферических тканях и биологических жидкостях человека и животных. Широкий спектр биологической активности изатина реализуется путём взаимодействия с многочисленными изатин-связывающими белками, среди которых идентифицированы белки, играющие существенную роль в развитии нейродегенеративной патологии. В контексте нейропротекторного эффекта, действие изатина сопоставимо с эффектами депренила – препарата, применяющегося для лечения болезни Паркинсона. В данной работе исследовали влияния курсового введения депренила (1 мг/кг) и изатина (20 мг/кг) в течение 21 дня на профиль изатин-связывающих белков печени мышей. В ходе протеомного профилирования изатин-связывающих белков печени контрольных мышей с использованием в качестве аффинного лиганда 5-аминокапроилизатина было идентифицировано 105 белков. Курсовое введение низкой дозы изатина приводило к небольшому снижению (до 91), а введение депренила – к небольшому повышению (до 120) суммарного числа изатин-связывающих белков. Общими для всех трёх групп оказались 75 белков, составляющих от 62,5% (при введении депренила) и 71% (контроль), до 82% (при введении изатина) от общего числа идентифицированных изатин-связывающих белков печени. Протеомный анализ изатин-связывающих белков печени мышей, получавших в течение 21 дня внутрибрюшинные инъекции изатина (20 мг/кг) или депренила (1 мг/кг), позволил выявить репрезентативную группу белков ($n=30$), чувствительных к введению этих веществ. С учётом ранее полученных результатов, можно предположить, что изменение профиля изатин-связывающих белков обусловлено накоплением изатина и депренила в печени и взаимодействием с белками-мишенями, препятствующим связыванию последних с аффинным сорбентом. В таком контексте идентифицированные изатин-связывающие белки печени контрольных животных, которые при введении изатина или депренила перестают связываться с аффинным сорбентом (иммобилизованным аналогом изатина), по-видимому, являются специфическими мишенями, непосредственно взаимодействующими с изатином *in vivo*.

Ключевые слова: изатин; депренил; изатин-связывающие белки; печень мыши; протеомное профилирование

DOI: 10.18097/PBMC20186404354

ВВЕДЕНИЕ

Изатин (индол-2,3-дион) – эндогенный индол, обнаруженный в мозге, периферических тканях и биологических жидкостях человека и животных [1-4]. Широкий спектр биологической активности изатина реализуется путём взаимодействия с многочисленными изатин-связывающими белками, многие из которых были идентифицированы в ходе протеомного профилирования препаратов мозга мышей и крыс [1, 5-7]. В контексте нейропротекторного эффекта [1], действие изатина сопоставимо с эффектами депренила – селективного механизм-активируемого ингибитора моноаминоксидазы Б (МАО Б) и известного нейропротекторного препарата, применяющегося для лечения болезни Паркинсона [8, 9]. В случае экспериментального паркинсонизма, развитие которого обусловлено биоактивацией протоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) под действием МАО Б, эффект и депренила [8, 9], и, по-видимому, изатина [10] связан с ингибированием этого фермента и сниженным образованием нейротоксина 1-метил-4-пиридиния (МФП⁺). Однако, торможение МАО Б, очевидно, не единственное звено нейропротекторных механизмов этих веществ [8-10]. Например, депренил [11-13] и изатин [14] взаимодействуют с глицеральдегид-3-

фосфатдегидрогеназой (ГАФД) – гликолитическим ферментом, которому свойственны важные, не связанные с гликолизом функции [15]. Депренил и изатин подавляли РНКазную (негликолитическую) активность ГАФД [14].

Депренил также снижал связывание и другого гликолитического фермента – пируваткиназы – с изатином [16]. Величины IC_{50} (концентрация, вызывающая 50% торможение связывания лиганда) для торможения связывания [³H]изатина депренилом зависели от концентрации этого радиоактивного лиганда. Последнее свидетельствует о конкуренции между изатином и депренилом за связывание с определёнными белками-мишенями. В связи с этим есть веские основания рассматривать изатин в качестве эндогенного агониста депренила [14].

Для проверки возможных конкурентных взаимоотношений между изатином и депренилом за связывание с белками-мишенями *in vivo* мы исследовали влияние субхронического введения этих веществ мышам на профиль изатин-связывающих белков печени. Использование именно печени в качестве объекта исследования объясняется тем, что количество индивидуальных изатин-связывающих белков в этом органе существенно выше, чем в мозге [17]. К тому же именно в печени

активность ферментных систем, участвующих в метаболизме и изатина, и депренила наиболее высока [2-4, 18, 19], что обусловило выбор субхронического введения депренила и изатина.

МЕТОДИКА

В экспериментах использовали самцов мышей линии C57BL/6 (вес 20–25 г), полученных из питомника “Столбовая” (Московская область) и прошедших семидневный карантин после прибытия. Животных содержали при естественном световом режиме, постоянном доступе к питьевой воде и корму. Изатин (20 мг/кг) и (-)-депренил (1 мг/кг) вводили подкожно в течение 21 дня. Контрольным животным подкожно вводили физиологический раствор. После декапитации животных под лёгким эфирным наркозом и перфузии печени холодным физиологическим раствором, ткань печени гомогенизировали в гомогенизаторе Ultra-Turrax T 10 при 10000 об/мин в 0,05 М калий-фосфатном буфере, pH 7,4. Выделение мембранной и растворимой фракций 30% гомогената печени и их последующую обработку для осуществления этапа аффинной хроматографии проводили в соответствии с разработанным протоколом [17]. Сначала гомогенат печени центрифугировали 5 мин при 500 g для удаления дебриса. Надосадочную жидкость далее центрифугировали 60 мин при 16000 g, обрабатывая растворимую и мембранную фракции тритоном X-100 раздельно. Осадок (мембранная фракция) сначала суспендировали в 0,05 М калий-фосфатном буфере (pH 7,4) до конечной концентрации 30 мг/мл. После добавления тритона X-100 (конечная концентрация 3%), инкубации в течение 60 мин при 4°C и последующего трёхкратного разведения тем же фосфатным буфером пробы центрифугировали при 16000 g в течение 30 мин для получения осветлённой надосадочной жидкости. Растворимую фракцию гомогената печени (концентрация белка около 30 мг/мл) инкубировали с 3% тритоном X-100 и центрифугировали аналогичным способом.

Аффинную хроматографию на 5-аминокапроил-изатинсефарозе для последующего масс-спектрометрического анализа проводили в соответствии с ранее разработанным протоколом [17]. Осветлённые при помощи центрифугирования лизаты мембранной и растворимой фракций гомогената печени (концентрация белка примерно 10 мг/мл) добавляли к суспензии 5-аминокапроилсефарозы (1:1) и инкубировали 2 ч при 4°C и медленном перемешивании. Аффинный сорбент промывали 100-ми объёмами буфера для удаления неспецифически связавшихся белков, после чего остальные белки элюировали с использованием колонки (1×2 см) при комнатной температуре сначала 30 мл 1 М изатина в 0,05 М фосфатном буфере (pH 7,4), потом тем же объёмом 1 М NaCl в 0,05 М фосфатном буфере (pH 7,4).

Элюат (30 мл) концентрировали до 0,25 мл при помощи центрифужного устройства Amicon Ultra (“Millipore”, США). Белки экстрагировали

смесью хлороформ-метанол [17], восстанавливали 20 мМ дитиотреитолом в 6 М хлориде гуанидина (pH 6,8) при 37°C в течение 60 мин; после карбосиметилирования сульфгидрильных групп 0,17 мМ йодоацетамидом (37°C, 60 мин) и повторной хлороформно-метанольной экстракции осадок белков растворяли в 50 мМ бикарбонате аммония и подвергали трипсинолизу (сначала 1 мкг трипсина/100 мкг белка, 37°C, 60 мин; потом 2 мкг/100 мкг белка, 37°C, в течение ночи) [17]. Реакцию останавливали муравьиной кислотой (конечная концентрация 0,1%). Пробы выпаривали при помощи вакуумного концентратора 5301 (“Eppendorf” Германия), растворяли в 0,1% муравьиной кислоте и анализировали при помощи LC-MS/MS.

Для определения неспецифически связавшихся с аффинным сорбентом белков использовали контрольную бромциан-активированную сефарозу, которую подвергали тем же процедурам, что и 5-аминокапроил-изатинсефарозу, но без добавления аффинного лиганда.

Масс-спектрометрический анализ осуществляли с использованием интегрированной чиповой колоночной системы высокоэффективного жидкостного разделения пептидов Infinity 1290 (“Agilent”, США) в микропоточковом режиме. Хроматографическое разделение пептидов проводили на аналитической колонке с обращенной фазой (Zorbax RRHD “Agilent”, длина колонки 100 мм, диаметр 2,1 мм, размер частиц 2,8 мкм) в линейном градиенте элюции подвижной фазы А (0,1%-ый водный раствор муравьиной кислоты) и подвижной фазы Б (80%-ый ацетонитрил, 0,1%-ая муравьиная кислота) от 2 до 60% при скорости потока 0,3 мл/мин в течение 60 мин с последующим уравниванием хроматографической системы в начальных условиях градиента (А : Б = 2 : 98) в течение 5 мин.

Масс-спектрометрический анализ проводили на квадрупольном времяпролётном масс-спектрометре Agilent 6550 (“Agilent”) в режиме положительной ионизации. Сканирование тандемных спектров осуществляли в режиме автоматической селекции пяти доминантных пиков прекурсорных ионов, зарегистрированных при $m/z = 400–1300$. Напряжение на входе капилляра составляло 3900 В, скорость потока осушающего газа (азот) – 14 л/мин, температура осушающего газа – 280°C, скорость потока фокусирующего газа 11 л/мин, температура фокусирующего газа – 320°C. Время одного полного цикла сканирования не более 1,079 с. Отбирали 4 сигнала наиболее интенсивных ионов с последующим тандемным сканированием не более 10 спектров фрагментации. Для снижения избыточного сигнала использовали режим активного исключения прекурсорных пиков после трёх регистраций в течение не более 20 с.

Анализ масс-спектрометрических данных с последующей идентификацией белков проводили с использованием пакетного программного обеспечения Spectrum Mill MS Proteomics Workbench Rev B.04.01.141 (“Agilent”). Белки идентифицировали сравнительным анализом экспериментально

зарегистрированного масс-спектрометрического сигнала с базой данных белков мыши (*Mus musculus*) Swiss Prot/Uniprot. Для экстракции сигнала и его последующей обработки использовали следующие параметры: фермент протеолитического расщепления – трипсин; максимально допустимое количество внутрипептидных лизинов или аргининов не более 1; допустимая погрешность измерения моноизотопной массы пептида $\pm 0,01$ Да, допустимая погрешность измерения фрагментного иона $\pm 0,05$ Да. В качестве фиксированной химической модификации выбирали карбамидометилирование аминокислотных остатков цистеина, в качестве лабильной модификации – окисление метионина. Сигнал считали истинно-положительным и белок идентифицированным в случае идентификации как минимум двух протеотипических пептидов, принадлежащих одному белку, с индексом достоверности для каждого пептида более 7,0, а для всего белка не менее 13 [17]. Ложно-положительный сигнал проверяли через δ -коэффициент достоверности при поиске экспериментальных данных против базы данных случайно сгенерированных пептидных последовательностей. Для истинно-положительного сигнала δ -коэффициент должен превышать 2,0.

В каждом протеомном эксперименте использовали суммарные препараты, полученные в ходе аффинного обогащения растворимой и мембранной фракций гомогената печени одной мыши.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе протеомного профилирования изатин-связывающих белков печени контрольных мышей с использованием в качестве аффинного лиганда 5-аминокапролизатина было идентифицировано 105 белков, представляющих следующие функциональные группы (табл. 1): (I) белки/ферменты, участвующие в процессах генерации энергии и углеводного обмена; (II) ферменты липидного обмена; (III) ферменты, участвующие в метаболизме белков, аминокислот и других азотистых соединений; (IV) белки, участвующие в образовании цитоскелета и экзоцитозе; (V) белки-регуляторы экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки; (VI) антиоксидантные и защитные белки/ферменты; (VII) белки, участвующие в передаче сигналов и регуляции активности ферментов.

Курсовое введение низкой дозы изатина (20 мг/кг, 21 день) приводило к небольшому снижению (до 91), а введение депренила (1 мг/кг, 21 день) – к небольшому повышению (до 120) общего числа изатин-связывающих белков. Общими для всех трёх групп оказались 75 белков, представляющих функциональные группы I-VI и составляющих от 62,5% (при введении депренила) и 71% (контроль), до 82% (при введении изатина) от общего числа идентифицированных изатин-связывающих белков печени. Интересно, что среди изатин-связывающих

Таблица 1. Влияние введения изатина (20 мг/кг) и депренила (1 мг/кг) в течение 21 дня на число идентифицированных изатин-связывающих белков печени мышей и их распределение по функциональным группам*

Группа**	Контроль	Изатин	Депренил
I	20	22↑	21↑
II	12	11↓	15↑
III	20	15↓	15↓
IV	7	9↑	6↓
V	31	34↓	50↑
VI	14	13↓	13↓
VII	1	0↓	0↓
Всего	105	91↓	120↑

Примечание. * - Списки идентифицированных изатин-связывающих белков приведены в Приложении в виде дополнительных материалов, доступных на сайте журнала: pbmc.ibmc.msk.ru. ** - Функциональные группы изатин-связывающих белков: (I) белки/ферменты, участвующие в процессах генерации энергии и углеводного обмена; (II) ферменты липидного обмена; (III) ферменты, участвующие в метаболизме белков, аминокислот и других азотистых соединений; (IV) белки, участвующие в образовании цитоскелета и экзоцитозе; (V) белки-регуляторы экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки; (VI) антиоксидантные и защитные белки/ферменты; (VII) белки, участвующие в передаче сигналов и регуляции активности ферментов. Стрелки показывают снижение (↓) или увеличение (↑) числа идентифицированных изатин-связывающих белков в печени мышей, получавших инъекции изатина или депренила по сравнению с контролем.

белков, общих для трёх групп животных, обнаружены: (а) цитохром b_5 -редуктаза (Q9DCN2, Приложение, табл. 1), катализирующая реакцию NADH-зависимого восстановления цитохрома b_5 – одного из белков митохондриальной системы, комплексы которого с изоферментами цитохрома P450 чувствительны к регуляции изатином [20]; (б) короткоцепочечная дегидрогеназа/редуктаза (Q99LB2; Dehydrogenase/reductase SDR family member 4; КФ 1.1.1.184; Приложение, табл. 1), входящая в семейство белков, к которому относится и карбонилредуктаза, осуществляющая метаболическое превращение изатина [21, 22].

Курсовое введение изатина и депренила выявило 30 специфических изатин-связывающих белков контроля, которые не связывались с аффинным сорбентом после введения этих веществ (табл. 2). С учётом ранее полученных данных о существующей конкуренции между изатином и депренилом за связывание ряда белков как с меченым [3 H]изатином, так и иммобилизованным на кювете оптического биосенсора аналогом изатина (см. выше), можно предположить, что изменение профиля изатин-связывающих белков обусловлено накоплением изатина и депренила в печени и взаимодействием с белками-мишенями, препятствующим связыванию последних с аффинным сорбентом. Именно такие конкурентные взаимоотношения при введении животным изатина и

Таблица 2. Изатин-связывающие белки печени, специфичные для контрольных животных*

No	Название белка	Идентификатор белка	Молекулярная масса, Да	pI	Число пептидов	Покры- тие, %	Индекс достовер- ности
I Белки/ферменты, участвующие в процессах генерации энергии и углеводного обмена (n=5)							
1	Glycogen phosphorylase, liver form	Q9ET01	97300,4	6,65	2	4	32,23
2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Q64467	35679,0	8,45	2	11	27,71
3	L-xylulose reductase	Q91X52	25746,0	6,83	2	11	27,04
4	ATP synthase alpha chain, mitochondrial	Q03265	59752,9	9,22	2	4	26,35
5	Lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha keto dehydrogenase complex, mitochondrial precursor	P53395	53160,7	8,88	2	6	25,64
II Ферменты липидного обмена (n=1)							
1	3-ketoacyl CoA thiolase B, peroxysomal precursor	Q921H8	43995,7	8,82	2	9	27,72
III Ферменты, участвующие в метаболизме белков, аминокислот и других азотистых соединений (n=5)							
1	Uricase	P25688	34908,2	8,50	3	14	35,12
2	Phenylalanine-4-hydroxylase	P16331	51798,0	6,02	2	9	25,38
3	Xanthine dehydrogenase/oxidase	Q00519	146387,9	7,61	2	2	23,33
4	homogentisate 1,2-dioxygenase	O09173	49990,2	6,85	2	6	22,68
5	Choline dehydrogenase, mitochondrial	Q8BJ64	66414,9	8,78	2	3	20,74
IV Белки, участвующие в образовании цитоскелета и экзоцитозе (n= 3)							
1	Keratin type II cytoskeletal 6B	Q9Z331	60191,4	8,50	2	3	33,26
2	Actin alpha skeletal muscle	P68134	42051,3	5,23	2	7	27,46
3	Sec 14-like protein 2	A8Y5H7	46300,6	6,68	2	9	23,89
V Белки-регуляторы экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки (n=12)							
1	ATP-dependent RNA helicase A	O70133	149475,7	6,39	4	3	59,54
2	AP-2 complex subunit alpha 2	P17427	104101,2	6,50	3	5	48,42
3	Elongation factor 1-alpha 1 (EF-1-alpha-1)	P57776	50114,1	9,10	4	14	47,89
4	Elongation factor 1 alpha 2	P62631	50454,4	9,11	3	7	46,68
5	Phenylalanine- tRNA ligase beta chain	Q9WUA2	65670,6	6,69	4	6	41,83
6	60S ribosomal protein L18	P35980	21513,5	11,79	2	13	35,12
7	Nucleophosmin	Q61937	32560,2	4,62	2	11	26,77
8	Histone H2B 1-F	P10853	13805,0	10,31	2	20	25,98
9	60S ribosomal protein L13a	P19253	23333,1	11,02	2	11	24,77
10	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	Q61656	69320,6	9,06	2	4	22,52
11	Protein NDRG2	Q9QYG0	40789,4	5,23	2	7	21,82
12	Protein disulfide isomerase A6 precursor	Q922R8	48100,6	4,99	2	2	18,38
VI Антиоксидантные и защитные белки/ферменты (n=3)							
1	Proteasome activator complex subunit 1	P97371	28673,1	5,73	2	14	32,28
2	1 aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2	Q8CG76	40598,3	8,36	2	9	27,04
3	Peroxisomal coenzyme A diphosphatase NUDT-7	Q99P30	26856,9	5,90	2	12	21,03
VII Белки, участвующие в передаче сигналов и регуляции активности ферментов (n=1)							
1	14-3-3-protein zeta/delta	P63101	27771,3	4,73	2	10	22,56

Примечание. * - Здесь и в других таблицах (включая Приложение) названия идентифицированных белков, а также их молекулярные характеристики приведены в том виде, в котором они фигурируют в базе данных Uniprot, использованной для их идентификации.

ВЛИЯНИЯ ДЕПРЕНИЛА И ИЗАТИНА НА ПРОФИЛЬ ИЗАТИН-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ

Таблица 3. Участие специфичных для контроля изатин-связывающих белков в метаболических путях, аннотированных в ресурсе Gene Ontology

Идентификатор белка	Название гена	Название белка	Идентификатор метаболического пути	Описание метаболического пути
P63101	Ywhaz	14-3-3 protein zeta/delta	P00049	Parkinson disease
			P00048	PI3 kinase pathway
			P00018	EGF receptor signaling pathway
			P00021	FGF signaling pathway
P68134	Acta1 Acta	Actin, alpha skeletal muscle	P00012	Cadherin signaling pathway
			P00034	Integrin signalling pathway
			P00004	Alzheimer disease-presenilin pathway
			P00044	Nicotinic acetylcholine receptor signaling pathway
			P00016	Cytoskeletal regulation by Rho GTPase
			P00031	Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway
Q00519	Xdh	Xanthine dehydrogenase/oxidase	P02769	Purine metabolism
			P02723	Adenine and hypoxanthine salvage pathway
Q64467	Gapdhs Gapd-s Gapds	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P00029	Huntington disease
Q9ET01	Pygl	Glycogen phosphorylase	P00026	Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gi alpha and Gs alpha mediated pathway

Примечание. В таблице приведены изатин-связывающие белки, специфичные для контрольной группы и вовлечённые в метаболические пути, которые играют наиболее важную роль в развитии патологических процессов.

необратимого ингибитора МАО фенелзина позволили в своё время доказать факт непосредственного взаимодействия изатина и МАО Б *in vivo* [23].

Среди изатин-связывающих белков, специфичных для контроля и чувствительных к введению изатина/депренила, следует отметить альфа-актин, вовлечённый в ряд метаболических путей (табл. 3), играющий важную роль в развитии нейродегенеративной патологии, а также глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (ГАФД; КФ 1.2.1.12). ГАФД – классический фермент гликолиза, которому свойственен ряд не связанных с этим метаболическим процессом функций [14, 24, 25], в том числе и при развитии нейродегенеративных заболеваний, таких, например, как болезнь Гентингтона [26]. В контексте недавно обнаруженного влияния изатина на функционирование убиквитин-протеасомной системы [27] особенно интересен факт обнаружения субъединицы 1 протеасомного активаторного комплекса (Proteasome activator complex subunit 1 P97371; табл. 2). Эти данные свидетельствуют о том, что эффект изатина на убиквитин-протеасомную систему связан и с прямым взаимодействием с регуляторными компонентами протеасом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Протеомный анализ изатин-связывающих белков печени мышей, получавших в течение 21 дня внутрибрюшинные инъекции изатина (20 мг/кг) или депренила (1 мг/кг), позволил выявить довольно репрезентативную группу белков (n=30), чувствительных к введению этих веществ.

По аналогии с нашей предыдущей работой [23], можно предположить, что изменение профиля изатин-связывающих белков обусловлено накоплением изатина и депренила в печени и взаимодействием с белками-мишенями, препятствующим связыванию последних с аффинным сорбентом. В таком контексте идентифицированные изатин-связывающие белки печени контрольных животных, которые при введении изатина или депренила перестают связываться с аффинным сорбентом (иммобилизованным аналогом изатина), по-видимому, являются специфическими мишенями, непосредственно взаимодействующими с изатином *in vivo*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы и частично поддержана грантом РФФИ 18-015-00042. Масс-спектрометрический анализ белков выполнен в ЦКП “Протеом человека” при ИБМХ, поддержанном Минобрнауки РФ в рамках соглашения №14.621.21.0017 (идентификатор RFMEFI62117X0017).

Приложение доступно в электронной версии статьи на сайте журнала (pbmc.ibmc.msk.ru).

ЛИТЕРАТУРА

1. Medvedev A., Buneeva O., Gnedenko O., Ershov P., Ivanov A. (2018) Biofactors, **44**(2), 95-108.
2. Medvedev A., Buneeva O., Glover V. (2007) Biologics, **1**(2), 151-162.

3. Medvedev A., Igosheva N., Crumeyrolle-Arias M., Glover V. (2005) *Stress*, **8**(3), 175-183.
4. Medvedev A.E., Clow A., Sandler M., Glover V. (1996) *Biochem. Pharmacol.*, **52**, 385-391
5. Crumeyrolle-Arias M., Buneeva O., Zgoda V., Kopylov A., Cardona A., Tournaire M.-C., Pozdnev V., Glover V., Medvedev A. (2009) *J. Neurosci. Res.*, **87**, 2763-2772.
6. Buneeva O., Gnedenko O., Zgoda V., Kopylov A., Glover V., Ivanov A., Medvedev A., Archakov A. (2010) *Proteomics*, **10**, 23-37.
7. Бунеева О.А., Копылов А.Т., Тихонова О.В., Згода В.Г., Медведев А.Е., Арчаков А.И. (2012) *Биохимия*, **77**, 1584-1599.
8. Szökő É., Tábi T., Riederer P., Vécsei L., Magyar K. (2018) *J. Neural Transm. (Vienna)*. [Epub ahead of print] DOI: 10.1007/s00702-018-1853-9
9. Youdim M., Edmondson D., Tipton K. (2006) *Nat. Rev. Neurosci.*, **7**, 295-308.
10. Медведев А.Е., Бунеева О.А., Копылов А.Т., Тихонова О.В., Медведева М.В., Неробкова Л.Н., Каница И.Г., Згода В.Г. (2017) *Биохимия*, **82**, 470-480.
11. Kragten E., Lalande I., Zimmermann K., Roggo S., Schindler P., Muller D., van Oostrum J., Waldmeier P., Furst P. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 5821-5828.
12. Tatton W., Chalmers-Redman R., Tatton N. (2003) *J. Neural Transm. (Vienna)*, **110**, 509-515.
13. Berry M.D., Boulton A.A. (2002) *Neurotoxicol. Teratol.*, **24**, 667-673.
14. Medvedev A., Buneeva O., Gnedenko O., Fedchenko V., Medvedeva M., Ivanov Y., Glover V., Sandler M. (2006) *J. Neural Transm., Suppl.*, **71**, 97-103.
15. Tristan C., Shahania N., Sedlaka T., Sawa A. (2011) *Cell Signal.*, **23**(2), 317-323.
16. Бунеева О.А., Гнеденко О.В., Медведева М.В., Иванов Ю.Д., Гловер В., Медведев А.Е. (2006) *Биомед. химия*, **52**, 413-418.
17. Бунеева О.А., Копылов А.Т., Згода В.Г., Медведев А.Е. (2018) *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, **1**(1), e00007. DOI: 10.18097/bmcrm00007
18. Yoshida T., Oguro T., Kuroiwa Y. (1987) *Xenobiotica*, **17**(8), 957-963.
19. Taavitsainen P., Anttila M., Nyman L., Karnani H., Salonen J.S., Pelkonen O. (2000) *Pharmacol. Toxicol.*, **86**, 215-221.
20. Еришов П.В., Мезенцев Ю.В., Яблоков Е.О., Калужский Л.А., Флоринская А.В., Свирид А.В., Гилеп А.А., Усанов С.А., Медведев А.Е., Иванов А.С. (2018) *Биомед. химия*, **64**, 61-65. DOI: 10.18097/PBMC20186401061
21. Hara A., Endo S., Matsunaga T., El-Kabbani O., Miura T., Nishinaka T., Terada T. (2017) *Biochem. Pharmacol.*, **138**, 185-192.
22. Huang W., Ding L., Huang Q., Hu H., Liu S., Yang X., Hu X., Dang Y., Shen S., Li J., Ji X., Jiang S., Liu J.O., Yu L. (2010) *Hepatology*, **52**, 703-714.
23. Panova N. G., Zemskova M.A., Akenova L.N., Medvedev A.E. (1997) *Neurosci. Lett.*, **233**, 58-60.
24. Qvit N., Joshi A.U., Cunningham A.D., Ferreira J.C., Mochly-Rosen D. (2016) *J. Biol. Chem.*, **291**, 13608-13621.
25. Huang J., Hao L., Xiong N., Cao X., Liang Z., Sun S., Wang T. (2009) *Brain Res.*, **1279**, 1-8.
26. Senatorov V.V., Charles V., Reddy P.H., Tagle D.A., Chuang D.M. (2003) *Mol. Cell Neurosci.*, **22**, 285-297.
27. Бунеева О.А., Копылов А.Т., Капитса И.Г., Иванова Е.А., Згода В.Г., Медведев А.Е. (2018) *Cells*, **7**, 91. DOI:10.3390/cells7080091.

Поступила: 23. 04. 2018.
Принята к печати: 11. 07. 2018.

THE EFFECT OF DEPRENYL AND ISATIN ADMINISTRATION TO MICE ON THE PROTEOMIC PROFILE OF LIVER ISATIN-BINDING PROTEINS

O.A. Buneeva, A.T. Kopylov, V.G. Zgoda, A.E. Medvedev

Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; e-mail: professor57@yandex.ru

Isatin (indol-2,3-dione) is an endogenous indole found in the brain, peripheral tissues and biological body fluids of humans and animals. Its wide spectrum of biological activity is realized via interaction with numerous isatin-binding proteins; these include proteins playing an important role in the development of neurodegenerative pathology. In the context of the neuroprotective effect, the effect of isatin is comparable to the effects of deprenyl, a pharmacological agent used for treatment of Parkinson's disease. In this study, the effects of the course of deprenyl (1 mg/kg) and isatin (20 mg/kg) administration for 21 days on the profile of the isatin-binding proteins of the liver of mice have been investigated. Proteomic profiling of liver isatin-binding proteins of control mice by means of 5-aminocaproylisatin as an affinity ligand resulted in identification of 105 proteins. Treatment of animals with a low dose of isatin slightly decreased (up to 91), while injections of deprenyl slightly increased (up to 120) the total number of isatin-binding proteins. 75 proteins were common for all three groups; they represented from 62.5% (in deprenyl treated mice) and 71% (in control mice), to 82% (isatin treated mice) of the total number of identified liver isatin-binding proteins. Proteomic analysis of the isatin-binding proteins of mice treated with isatin (20 mg/kg) or deprenyl (1 mg/kg) for 21 days revealed a representative group of proteins (n=30) that were sensitive to the administration of these substances. Taking into account the previously obtained results, it is reasonable to suggest that the change in the profile of isatin-binding proteins may be attributed to accumulation of isatin and deprenyl in the liver and interaction with target proteins prevents their subsequent binding to the affinity sorbent. In this context, the identified isatin-binding liver proteins of control animals that do not bind to the affinity sorbent (immobilized isatin analogue) after treatment of animals with either deprenyl or isatin appear to be specific targets directly interacting with isatin *in vivo*.

Key words: isatin; deprenyl; isatin-binding proteins; mouse liver; proteomic profiling