

©Коллектив авторов

## ОСОБЕННОСТИ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ И ПРОФИЛЯ ИЗАТИН-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ МОЗГА У КРЫС С ИНДУЦИРОВАННЫМ РОТЕНОНОМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ПАРКИНСОНИЗМОМ

*И.Г. Капица<sup>1,2</sup>, Л.Ш. Казиева<sup>1</sup>, Н.Э. Вавилов<sup>1</sup>, В.Г. Згода<sup>1</sup>, А.Т. Копылов<sup>1</sup>, А.Е. Медведев<sup>1</sup>, О.А. Бунеева<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>НИИ фармакологии им. В.В. Закусова, Москва

Токсины ротенон и 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП) применяются у животных для моделирования болезни Паркинсона (БП). Механизм действия токсинов связан с угнетением митохондриальной дыхательной цепи, что приводит к дегенерации дофаминергических (ДА) нейронов. Преимуществом ротенонового метода является способность ротенона провоцировать нейродегенерацию, наиболее схожую по своим симптомам и молекулярно-биологическим признакам с таковыми у БП. Изатин (индолдион-2,3) — эндогенный нейропротектор, обнаруженный в тканях и биологических жидкостях млекопитающих и человека, обладающий широким спектром биологической активности, реализующимся многочисленными изатин-связывающими белками. В данной работе изучены особенности поведенческих реакций и профиля изатин-связывающих белков мозга у крыс с индуцированным ротеноном паркинсоническим синдромом (ПС) в сравнении с соответствующими параметрами МФТП-индуцированного паркинсонизма у мышей. Показано, что системное введение ротенона моделирует тяжёлый ПС, сопоставимый с эффектом от введения МФТП, сопровождающийся значимой потерей веса животных, их гибелью, олигокинезией, ригидностью и постуральной неустойчивостью. Несмотря на общую патогенетическую основу ПС, вызванного ротеноном и МФТП, молекулярные механизмы их действия различаются. В случае ротенон-индуцированного ПС пул изатин-связывающих белков, общих для контрольных крыс и крыс с ПС (146), значительно превышал пул общих белков контрольных мышей и мышей с МФТП-индуцированным ПС, как непосредственно после введения нейротоксина (27), так и (тем более) через неделю после введения (14). Сравнение изатин-связывающих белков, специфичных для животных с МФТП-индуцированным и с ротенон-индуцированным ПС (по сравнению с контрольными животными), выявило полное отсутствие белков, общих для этих двух моделей БП. При этом влияние нейротоксинов в обоих случаях в первую очередь затрагивало белки, участвующие в передаче сигнала и регуляции активности ферментов. Изменения профиля изатин-связывающих белков при введении ротенона позволяют предположить, что введение нейропротектора изатина будет оказывать позитивный эффект и в ротеноновой модели БП.

**Ключевые слова:** паркинсонизм; нейродегенерация; нейротоксин ротенон; нейротоксин МФТП; изатин; изатин-связывающие белки; мозг; протеомное профилирование

**DOI:** 10.18097/PBMC20236901046

### ВВЕДЕНИЕ

Модели паркинсонического синдрома (ПС) у грызунов, индуцированные введением нейротоксинов 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) и ротенона, на сегодняшний день являются одними из наиболее адекватных трансляционных моделей болезни Паркинсона (БП) [1].

Пестицид ротенон моделирует тяжёлый ПС, характерный для развернутой стадии БП. Он является высоколипофильным веществом, способным свободно проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и биологические мембраны. Механизм действия ротенона, как и механизм действия МФТП, связан с угнетением митохондриальной дыхательной цепи, что приводит к дегенерации дофаминергических нейронов. Преимуществом ротенонового метода моделирования БП является способность ротенона провоцировать дофаминергическую (ДА) нейродегенерацию, наиболее схожую по своим симптомам и молекулярно-биологическим признакам с таковыми у БП [1]. Олигокинезия, вызванная ротеноном, хорошо купируется препаратом L-DOPA.

Для моделирования болезни Паркинсона ротенон применяется по преимуществу на клеточных структурах и в эмбриологических исследованиях. На взрослых животных, в основном на крысах, ротенон применяется значительно реже в связи с его низкой химической стабильностью в животных тканях и физиологических жидкостях. Животным ротенон вводится инфузионно, с помощью микронасосов, преимущественно внутривенно. Также используются подкожный и внутрибрюшинный инъекционные способы введения [2]. У крыс инфузионное системное введение ротенона в течение недели вызывает билатеральное поражение стриатума и бледного шара, ДА нейродегенерацию в чёрной субстанции (с уменьшением количества нейронов на 30%). На уровне поведения действие ротенона проявляется в виде снижения количества вертикальных стоек, гипокинезии и даже в выраженной каталепсии [3]. Высоковоспроизводимой моделью ПС у крыс является системное введение ротенона в дозе 2-3 мг/кг/день/7 дней внутрибрюшинно в специально приготовленном растворе. У животных развивается брадикинезия, постуральная неустойчивость и/или ригидность [4].

МФТП — широко используемый токсин для моделирования БП у грызунов. Он так же, как и ротенон, легко проникает через ГЭБ и воздействует на дофаминергические мозговые структуры [5].

Изатин (индолдион-2,3) — эндогенный регулятор, обнаруженный в тканях и биологических жидкостях млекопитающих и человека. Содержание изатина в организме изменяется в условиях различных видов стресса, а также при ряде патологических состояний, включая БП [6, 7]. Широкий спектр биологической активности изатина реализуется многочисленными изатин-связывающими белками, локализованными в различных внутриклеточных компартментах мозга и периферических тканей. Согласно данным протеомного профилирования мозга, ряд белков, связывающихся с изатином, играет важную роль в развитии нейродегенеративной патологии [8-12].

При этом физиологические реакции и профили изатин-связывающих белков мозга мышей с МФТП-индуцированным паркинсонизмом на высоте развития двигательных нарушений (через 90 мин) и через семь дней после введения этого нейротоксина различаются. Через семь дней после введения МФТП двигательная активность животных улучшалась, но уровня контрольных животных не достигала. На высоте двигательных нарушений, вызванных введением МФТП, число изатин-связывающих белков существенно снижалось, а через семь дней после введения МФТП вновь увеличивалось до уровня контроля [13].

Целью данной работы было изучение особенностей поведенческих реакций и профиля изатин-связывающих белков мозга у крыс с индуцированным ротеноном экспериментальным паркинсонизмом и сравнение их с соответствующими параметрами МФТП-индуцированного паркинсонизма у мышей.

## МЕТОДИКА

### Реактивы

В работе использовали следующие реактивы: бромциан-активированную сефарозу 4В, изатин, дитиотреитол, Трис (гидроксиметил)аминометан, мочевины, гидрокарбонат аммония, гуанидин гидрохлорид, хлористый натрий, тритон X-100, 4-винилпиридин, бикарбонат триэтиламония, Кумасси бриллиантовый синий G-250 (“Merck”, США); борную кислоту, тетраборат натрия, ацетат натрия, муравьиную кислоту, едкий натр (“Acros Organics”, США), ацетонитрил (“Fisher Chemical”, Великобритания); трифторуксусную кислоту, изопропанол (“Fluka”, США); трис-(2-карбоксиэтил)-фосфин (“Pierce”, США); модифицированный трипсин (mass spectrometry grade; “Promega”, США). Остальные реагенты были отечественного производства высшей степени чистоты. 5-Аминоизатин был синтезирован при помощи стандартных методов [14].

### Экспериментальные животные

Исследование выполнено на аутбредных белых крысах, полученных из питомника филиала Столбовая

Научного центра биомедицинских технологий. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к корму и воде при двенадцатичасовом световом режиме в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218-14 “Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)” от 29 августа 2014 г. № 51.

### Моделирование экспериментального паркинсонизма у крыс

Моделирование ПС с помощью системного введения ротенона проводили согласно методическим рекомендациям по доклиническому изучению лекарственных средств с противопаркинсонической активностью, изложенных в [15], путём ежедневного 7-дневного внутрибрюшинного введения крысам (21 крыса) токсина, разведённого в растворе миглиоля (Miglyol 840, “IOI Oleochemical”, Германия), в дозе 2,75 мг/кг. Контрольные животные (10 крыс) получали ежедневно (7 дней) физиологический раствор.

Приготовление раствора ротенона: для получения маточного раствора 50 мг ротенона растворяли в 0,5 мл 100% диметилсульфоксида (ДМСО) и затем необходимое количество раствора ротенона разбавляли нейтральным триглицеридом Miglyol 840 до достижения концентрации в 2,75 мг/мл ротенона. Маточный раствор хранили в темноте, перед введением тщательно перемешивали. Раствор вводили в расчёте 1 мл на 1 кг веса животного.

Физиологический раствор вводили внутрибрюшинно в эквивалентном объёме 0,2 мл на 100 г веса тела животного.

### 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 и через 24 ч после его последнего введения (на 8 сутки) проводили тестирование поведенческих реакций для выявления экстрапирамидных нарушений в тестах “Открытое поле”, “Вращающийся стержень”, оценку поструральной неустойчивости и ригидности.

Тест “Открытое поле” (ОП) проводили согласно методическим рекомендациям [15] с использованием установки TS0501-R (“НПК Открытая Наука”, Россия). В течение 2 мин регистрировали число перемещений животных в установке (горизонтальную двигательную активность), число стоек (вертикальную двигательную активность) и число заглядываний в отверстия в полу установки (норки).

Моторно-координатную активность крыс с ПС оценивали в тесте “Вращающийся стержень” на аппарате Rat Roda-Rod (“Ugo Basile”, Италия). Установка представляет собой барабан 6 см в диаметре, разделённый на 4 одинаковые части по 87 мм пятью дисками (49 см в диаметре). Барабан

вращается с постоянной скоростью 10 об/мин. В течение 3 мин регистрировали длительность удержания на вращающемся стержне.

Постуральную неустойчивость оценивали, держа крысу вертикально головой вниз так, чтобы только одна из её передних лап (попеременно) касалась поверхности стола. Регистрировали длину первого шага, совершаемого крысой, для восстановления баланса тела [16].

Для оценки ригидности крыс использовали показатель длина шага (Stride Length Test) [17]. Каждое животное с предварительно окрашенными нетоксичными красками (использовали фукорцин и бриллиантовый зелёный) лапами помещали на маркировочную ленту, выстилающую пенал (высота стенок 15 см, ширина 12 см, длина 60 см). Измеряли расстояние (по прямой) между следами между передними или задними лапами в 3-5 шагах животного. Шаги в начале и в конце аллеи не учитывали.

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*

После декапитации животных под лёгким эфирным наркозом ткань мозга гомогенизировали при помощи гомогенизатора Heidolph SilentCrusher ("Heidolph", Германия) (50000 об/мин) в 0,05 М калий-фосфатном буфере (pH 7,4) (буфер А) до конечной концентрации белка 30 мг/мл. После инкубации в присутствии 3% Тритона X-100 (4°C, 1 ч) лизаты разводили в 3 раза буфером А, центрифугировали при 16000 g в течение 30 мин при 4°C для получения осветлённой надосадочной жидкости.

#### *Аффинная хроматография белков мозга на 5-аминоизатинсефарозе*

Аффинный сорбент готовили согласно стандартной процедуре [9, 11, 13]. Лизаты ткани мозга (осветлённая надосадочная жидкость, концентрация белка примерно 10 мг/мл) добавляли к суспензии 5-аминоизатинсефарозы в соотношении 1:1 и инкубировали 16 ч при 4°C и медленном перемешивании. Аффинный сорбент промывали 100 объёмами буфера А для удаления неспецифически связавшихся белков, после чего остальные белки элюировали с использованием колонки (1×2 см) при комнатной температуре раствором 1 мМ изатина в буфере А. Элюат (30 мл) концентрировали до 0,25 мл при помощи мембранных центрифужных фильтров

Amicon Ultra ("Millipore", США). Белки экстрагировали смесью хлороформ-метанол [18], осадок белков растворяли в 8 М мочеvine, содержащей 20 мМ дитиотреитол и 100 мМ Трис-HCl (pH 8,5) и подвергали алкилированию и последующему трипсинолизу непосредственно на центрифужных мембранных фильтрах Vivaspin 500 ("Sartorius Stedim Biotech", Германия) с мембраной на 10000 Да, как описано в [19]. 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 с использованием оборудования центра коллективного пользования "Протеом человека" (Институт биомедицинской химии).

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

#### *Масс-спектрометрический анализ*

Масс-спектрометрический анализ осуществляли с использованием интегрированной системы высокоэффективного жидкостного разделения пептидов Ultimate 3000 RSLCnano ("Thermo Fisher Scientific", США) в нанопотоковом режиме. Хроматографическое разделение пептидов проводили на аналитической колонке с обращённой фазой Acclaim Pepmap® C18 (75 мкм × 150 мм, 2 мкм размер частиц, "Thermo Fisher Scientific") 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 60% при скорости потока 0,3 мкл/мин в течение 60 мин с последующим уравниванием хроматографической системы в начальных условиях градиента (А : Б = 2 : 98) в течение 5 мин.

В работе использовали масс-спектрометр Q Exactive HF-X ("Thermo Fisher Scientific"), оборудованный наноэлектроспрейным источником ионизации (nESI) в режиме положительной ионизации с разрешающей способностью 120000 при  $m/z$  200, объём накопления ионов в ловушке установлен как 1Е6, время накопления ионов в ловушке составляло максимум 50 мс. Доминантное зарядовое состояние прекурсорных ионов выставлено как 2<sup>+</sup>, зарядовые состояния более 6<sup>+</sup> и менее 2<sup>+</sup> исключали из последующего анализа. Сканирование tandemных спектров осуществляли в режиме автоматической селекции 20 доминантных пиков прекурсорных ионов, зарегистрированных при  $m/z$  = 350-1400. Разрешающая способность для регистрации дочерних ионов установлена на 15000 при  $m/z$  200, объём накопления ионов в ловушке составлял 1Е5, время накопления ионов в ловушке составляло максимум 50 мс. Родительские ионы изолированы в узком окне диапазоном 2,0  $m/z$  с отступом в 0,5  $m/z$  для лучшего захвата изотопов. Ранее изолированные родительские ионы исключали

из последующего анализа на 20 с после сканирования его дочерних ионов с точностью масс в 2 ppm. Полученные масс-спектрометрические данные с расширением .raw были процессированы программным обеспечением MaxQuant (v. 1.6.3.4) с встроенным поисковым алгоритмом Andromeda. База данных последовательностей белков полного протеома крысы (*Rattus norvegicus*) Swiss Prot/Uniprot загружена из Uniprot с добавлением обращенных последовательностей и часто встречаемых контаминирующих последовательностей для применения подхода target decoy. Метод применяли для расчёта параметра FDR (False Discovery Rate), в качестве отсека принимали параметр FDR 1% для регистрации белков. Для экстракции сигнала и его последующей обработки использовали следующие параметры: фермент протеолитического расщепления — трипсин; максимально допустимое количество внутривептидных остатков лизина или аргинина 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 [20].

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

Условия проведения экспериментов на мышах с индуцированным МФТП паркинсонизмом, выделения и идентификации изатин-связывающих белков мозга мышей приведены ранее [13].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В условиях экспериментального ПС, вызванного введением ротенона, у всех крыс, получавших токсин, на протяжении всего эксперимента наблюдали отрицательную динамику массы тела (от  $277,7 \pm 3,2$  г до  $239,5 \pm 8,5$  г) по сравнению с животными контрольной группы, у которых за время эксперимента отмечена положительная динамика массы тела (от  $279,3 \pm 3,3$  г до  $325,2 \pm 4,1$  г). Введение ротенона вызывало гибель животных, которая на 7 день эксперимента составила почти 29%, а к 8 дню — уже 43%; в контрольной группе животных, получавших инъекции физиологического раствора, гибели животных не наблюдалось.

Введение ротенона вызывало развитие у крыс 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”) у животных относительно группы “Контроль” (табл. 1).

У животных с индуцированным ротеноном ПС на 7 и 8 дни эксперимента выявлен моторный дефицит, проявлявшийся в достоверном снижении в 2,1 и 2,9 раз соответственно длительности их удержания на вращающемся стержне (табл. 2).

Системное введение ротенона вызывало развитие ригидности — появления “горба”, что выразилось в значимом уменьшении длины шага животного в 1,4 раза по сравнению с показателем группы “Контроль” (табл. 3).

Таблица 1. Поведение крыс с ПС вызванным системным 7-дневным введением ротенона в тесте “Открытое поле”

| Группа,<br>число животных | Двигательная активность на 7 день, ед. |                            | Заглядывания в отверстия<br>(норки) в полу установки, ед |
|---------------------------|--|----------------------------|--|
|                           | Горизонтальная (число перемещений)     | Вертикальная (число стоек) |  |
| Контроль, n=10            | $37,8 \pm 5,5$                         | $8,7 \pm 1,3$              | $11,4 \pm 1,5$   |
| Ротенон, n=12             | $10,2 \pm 1,9^*$                       | $1,6 \pm 0,5^*$            | $2,6 \pm 1,1^*$  |

Примечание: \* –  $p < 0,001$  в сравнении с группой “Контроль”.

Таблица 2. Двигательная активность и координация движений крыс с ПС, вызванным системным введением ротенона

| Группа,<br>число животных | Продолжительность удержания на горизонтальном<br>вращающемся с постоянной скоростью 10 об/ мин стержне, с |                   |
|---------------------------|---|-------------------|
|                           | 7 день  | 8 день            |
| Контроль, n=10            | $162,2 \pm 15,1$  | $146,7 \pm 17,9$  |
| Ротенон, n=8              | $78,6 \pm 17,2^*$   | $50,0 \pm 20,8^*$ |

Примечание: \* –  $p < 0,01$  в сравнении с группой “Контроль”.

Таблица 3. Ригидность и поструральная неустойчивость крыс с ПС вызванным системным введением ротенона (7 день введения)

| Группа,<br>число животных | Ригидность      | Постуральная неустойчивость |                 |
|---------------------------|-----------------|-----------------------------|-----------------|
|                           | Длина шага, см  | Левая лапа, см              | Правая лапа, см |
| Контроль, n=10            | $10,8 \pm 0,3$  | $2,7 \pm 0,2$               | $2,9 \pm 0,2$   |
| Ротенон, n=10             | $7,7 \pm 0,6^*$ | $4,8 \pm 0,2^*$             | $4,4 \pm 0,3^*$ |

Примечание: \* –  $p < 0,001$  в сравнении с группой “Контроль”.

## РОТЕНОНОВЫЙ ПАРКИНСОНИЗМ И ИЗАТИН-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ МОЗГА

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 (табл. 3).

Оценку уровня олигокинезии у крыс на 8 день опыта (через 24 ч после последнего введения ротенона) проводили в тесте “Открытое поле”. Отмеченное накануне уменьшение двигательной активности у крыс группы “Ротенон” сохранилось и на 8 сутки и выразилось в уменьшении в 2,1, 2,6 и в 2,1 раз горизонтальной, вертикальной и поисковой активности соответственно относительно животных группы “Контроль” (табл. 4).

Таким образом, системное введение ротенона моделирует тяжёлый ПС, характерный для развёрнутой стадии БП, сопровождающийся значимой потерей веса животных, их гибелью, олигокинезией, ригидностью и постуральной неустойчивостью. Влияние ротенона на двигательную активность животных было сопоставимо с эффектом от введения МФТП, а по некоторым параметрам даже превосходило его. Так, например, продолжительность удержания животных на вращающемся стержне (с) в случае ПС, вызванного системным 7-дневным введением ротенона, составляло 34% от такового у контрольных животных, а в случае МФТП-индуцированного ПС — 28,2% от контроля. Двигательная активность животных в тесте “Открытое поле” в случае ротенона-индуцированного ПС составляла: горизонтальная активность — 27,0% от контроля, вертикальная активность — 18,4% от контроля, в то время как в случае МФТП-индуцированного паркинсонизма горизонтальная активность

составляла 44,2%, а вертикальная активность — 24,0% от контроля [21].

Протеомная идентификация изатин-связывающих белков мозга животных показала, что в случае ротенона-индуцированного ПС пул изатин-связывающих белков, общих для контрольных крыс и крыс с ПС (146), значительно превышал пул общих белков контрольных мышей и мышей с МФТП-индуцированным ПС как непосредственно после введения нейротоксина (27), так и особенно через неделю после введения (14) (рис. 1, табл. S1-S4 дополнительных материалов, а также данные [13]).

Сравнение изатин-связывающих белков, специфичных для животных с МФТП-индуцированным и с ротенона-индуцированным ПС (по сравнению с контрольными животными), выявило полное отсутствие белков, общих для этих двух моделей БП как в случае первичной, так и в случае отсроченной реакции на введение нейротоксина МФТП (табл. 5 и рис. 2, а также табл. S3, S4 дополнительных материалов). Сопоставление эффектов МФТП и ротенона на распределение изатин-связывающих белков по функциям (табл. 6) показало, что в первую очередь влияние нейротоксинов в обоих случаях затрагивает белки, участвующие в передаче сигнала и регуляции активности ферментов. Однако под действием МФТП первоначально происходит уменьшение количества наименований таких белков более чем в два раза (с 23 до 11), а затем восстановление их до числа, превышающего исходное (до 37) (табл. 6). Под действием ротенона число индивидуальных белков возрастало более чем в полтора раза (с 18 до 30). То же самое можно сказать и о белках-регуляторах экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки (см. табл. 6). Эти результаты, по-видимому, указывают на то, что, несмотря на общую патогенетическую основу ПС, вызванного этими нейротоксинами, молекулярные механизмы и мишени действия ротенона и МФТП различаются.

Таблица 4. Поведение крыс с ПС, вызванным системным 7 дневным введением ротенона в тесте “Открытое поле” (через 24 ч после последнего введения – 8 день)

| Группа,<br>числ животных | Двигательная активность на 8 день, ед. |                            | Заглядывания в отверстия<br>(норки) в полу установки, ед |
|--------------------------|--|----------------------------|--|
|                          | Горизонтальная (число перемещений)     | Вертикальная (число стоек) |  |
| Контроль, n=10           | 30,1±5,6                               | 2,3±0,7                    | 9,2±2,1  |
| Ротенон, n=11            | 14,4±4,9*                              | 0,9±0,5                    | 4,3±1,1*   |

Примечание: \* –  $p < 0,05$  в сравнении с группой “Контроль”.

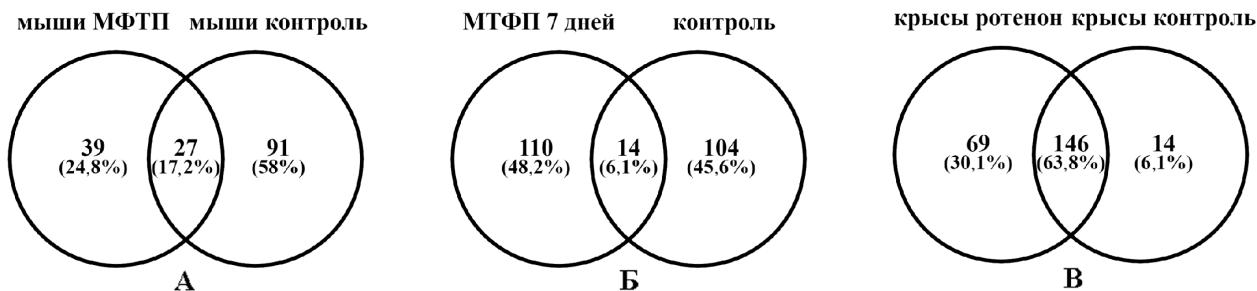


Рисунок 1. Диаграмма Венна. А – изатин-связывающие белки мозга мышей с МФТП-индуцированным паркинсонизмом (по сравнению с контрольными животными); Б – изатин-связывающие белки мозга мышей с МФТП-индуцированным паркинсонизмом (по сравнению с контрольными животными – отсроченный эффект); В – изатин-связывающие белки мозга крыс с ротенона-индуцированным паркинсонизмом (по сравнению с контрольными животными).

Таблица 5. Протеомная идентификация изатин-связывающих белков мозга крысы (69), специфичных для ротенон-индуцированного паркинсонизма

| №   | № в базе Uniprot | Ген по Uniprot      | Название белка по Uniprot  |
|---|------------------|---------------------|--|
| <b>Белки/ферменты, участвующие в процессах генерации энергии и углеводного обмена (n=6)</b> |                  |                     |  |
| 1   | P49432           | <i>Pdhb</i>         | Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial                |
| 2   | Q5BJX2           | <i>Pdhx</i>         | Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex |
| 3   | Q6P6R2           | <i>Dld</i>          | Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial                                     |
| 4   | P53534           | <i>Pygb</i>         | Glycogen phosphorylase, brain form (Fragment)                                  |
| 5   | D4A133           | <i>Hoga1</i>        | 4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase, mitochondrial                               |
| 6   | G3V7Y3           | <i>Atp5f1d</i>      | ATP synthase F1 subunit delta  |
| <b>Белки, участвующие в образовании цитоскелета и экзоцитозе (n=12)</b>                     |                  |                     |  |
| 1   | D3ZQ45           | <i>Dsg1</i>         | Desmoglein 1   |
| 2   | D3ZUY8           | <i>Ap2a1</i>        | AP-2 complex subunit alpha   |
| 3   | C6L8E0           | <i>Dbn1</i>         | Drebrin E  |
| 4   | D3ZZ99           | <i>Add1</i>         | Alpha-adducin  |
| 5   | F1LU27           | <i>Focad</i>        | Focadhesin   |
| 6   | P08082           | <i>Cltb</i>         | Clathrin light chain B   |
| 7   | P18484           | <i>Ap2a2</i>        | AP-2 complex subunit alpha-2   |
| 8   | P19527           | <i>Nefl</i>         | Neurofilament light polypeptide  |
| 9   | Q6AY84           | <i>Scrn1</i>        | Secernin-1   |
| 10  | D4A315           | <i>N/A</i>          | Actin-depolymerizing factor  |
| 11  | Q64715           | <i>Map2</i>         | Microtubule-associated protein   |
| 12  | P62744           | <i>Ap2s1</i>        | AP-2 complex subunit sigma   |
| <b>Белки, участвующие в передаче сигнала и регуляции активности ферментов (n=11)</b>        |                  |                     |  |
| 1   | P19139           | <i>Csnk2a1</i>      | Casein kinase II subunit alpha   |
| 2   | P05545           | <i>Serpina3k</i>    | Serine protease inhibitor A3K  |
| 3   | P20651           | <i>Ppp3cb</i>       | Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit beta isoform         |
| 4   | A0A0G2JYA4       | <i>LOC100362453</i> | Serine/threonine-protein phosphatase   |
| 5   | F1LQ63           | <i>Tnr</i>          | Tenascin R, isoform CRA_b  |
| 6   | G3V9A3           | <i>Sfn</i>          | RCG31390   |
| 7   | P02767           | <i>Ttr</i>          | Transthyretin  |
| 8   | Q8VBU2           | <i>Ndrp2</i>        | Protein NDRG2  |
| 9   | Q32PX7           | <i>Fubp1</i>        | Far upstream element-binding protein 1   |
| 10  | Q568Z9           | <i>Phyhip</i>       | Phytanoyl-CoA hydroxylase-interacting protein                                  |
| 11  | F1LMN8           | <i>Khdrbs3</i>      | KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 3    |
| <b>Антиоксидантные и защитные белки/ферменты (n=3)</b>                                      |                  |                     |  |
| 1   | Q9R063           | <i>Prdx5</i>        | Peroxiredoxin-5  |
| 2   | B6DYP7           | <i>Gsta2</i>        | Glutathione transferase  |
| 3   | P00502           | <i>Gsta1</i>        | Glutathione S-transferase alpha-1  |
| <b>Белки-регуляторы экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки (n=28)</b>       |                  |                     |  |
| 1   | P61354           | <i>Rpl27</i>        | 60S ribosomal protein L27  |
| 2   | M0R961           | <i>Khsrp</i>        | Far upstream element-binding protein 2   |
| 3   | M0RD75           | <i>Rps6</i>         | 40S ribosomal protein S6   |
| 4   | P12001           | <i>Rpl18</i>        | 60S ribosomal protein L18  |
| 5   | Q9Z0U8           | <i>pRM10</i>        | Nucleic acid binding factor pRM10  |
| 6   | P62804           | <i>H4c2</i>         | Histone H4   |
| 7   | B0BNA7           | <i>Eif3i</i>        | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I                           |
| 8   | P62902           | <i>Rpl31</i>        | 60S ribosomal protein L31  |
| 9   | F1LYQ7           | <i>LOC680700</i>    | Ribosomal protein  |
| 10  | Q5PQK2           | <i>Fus</i>          | RNA-binding protein  |
| 11  | Q5PQR0           | <i>Raly</i>         | RALY heterogeneous nuclear ribonucleoprotein                                   |
| 12  | Q566E4           | <i>HnrnpR</i>       | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R                                      |
| 13  | Q642E2           | <i>Rpl28</i>        | 60S ribosomal protein L28  |
| 14  | Q3SWU3           | <i>HnrnpDL</i>      | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like                                 |
| 15  | B5DF91           | <i>Elavl1</i>       | ELAV-like protein 1  |
| 16  | Q6P790           | <i>Rpl6</i>         | 60S ribosomal protein L6 (Fragment)  |
| 17  | A0A0G2JXW4       | <i>HnrnpC</i>       | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C, isoform CRA_a                       |

## РОТЕНОНОВЫЙ ПАРКИНСОНИЗМ И ИЗАТИН-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ МОЗГА

Таблица 5. Протеомная идентификация изатин-связывающих белков мозга крысы (69), специфичных для ротенон-индуцированного паркинсонизма (продолжение)

| №  | № в базе Uniprot | Ген по Uniprot      | Название белка по Uniprot   |
|--|------------------|---------------------|---|
| 18   | F1M2E9           | <i>LOC100361259</i> | 60S ribosomal protein L13   |
| 19   | B2RZB7           | <i>Snrpd1</i>       | Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1                                       |
| 20   | F1M013           | <i>Rpl7a</i>        | 60S ribosomal protein L7a   |
| 21   | B5DEP7           | <i>Snrpg</i>        | Small nuclear ribonucleoprotein G   |
| 22   | G3V6I9           | <i>Rpl26</i>        | 60S ribosomal protein L26   |
| 23   | D4A1Z2           |                     | KOW domain-containing protein   |
| 24   | G3V7Z8           | <i>Pabpn1</i>       | Poly(A) binding protein, nuclear 1, isoform CRA_a                           |
| 25   | P60892           | <i>Prps1</i>        | Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1  |
| 26   | D3ZXF9           | <i>Mrpl12</i>       | Mitochondrial ribosomal protein L12   |
| 27   | D4A6G6           | <i>LOC100362339</i> | 40S ribosomal protein S19   |
| 28   | D4ABK7           | <i>Hnrnp3</i>       | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 (2H9) (Predicted), isoform CRA_c |
| <b>Ферменты, участвующие в метаболизме белков, аминокислот и других азотистых соединений (n=7)</b> |                  |                     |   |
| 1  | Q00981           | <i>Uchl1</i>        | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1                            |
| 2  | Q3ZAU6           | <i>Rnf14</i>        | RBR-type E3 ubiquitin transferase   |
| 3  | Q45QL2           | <i>Gnb4</i>         | Guanine nucleotide binding protein beta 4 (Fragment)                        |
| 4  | Q4V8H5           | <i>Dnpep</i>        | Aspartyl aminopeptidase   |
| 5  | P00507           | <i>Got2</i>         | Aspartate aminotransferase, mitochondrial                                   |
| 6  | P09034           | <i>Ass1</i>         | Argininosuccinate synthase  |
| 7  | P52759           | <i>Rida</i>         | 2-iminobutanoate/2-iminopropanoate deaminase                                |
| <b>Ферменты, участвующие в метаболизме липидов (n=2)</b>   |                  |                     |   |
| 1  | P07483           | <i>Fabp3</i>        | Fatty acid-binding protein, heart   |
| 2  | Q07523           | <i>Hao2</i>         | Hydroxyacid oxidase 2   |



Рисунок 2. Диаграмма Венна. Сравнение изатин-связывающих белков, специфичных для животных с МФТП-индуцированным и с ротенон-индуцированным паркинсонизмом (по сравнению с контрольными животными): А – острый эффект МФТП; Б – отсроченный эффект МФТП.

Таблица 6. Сравнение эффектов МФТП и ротенона на распределение изатин-связывающих белков по функциям (соответственно у мышей и у крыс)

| Функции белков  | мыши контроль* | мыши МФТП* | мыши МФТП отдалённый эффект* | крысы контроль | крысы ротенон |
|---|----------------|------------|------------------------------|----------------|---------------|
| Белки/ферменты, участвующие в процессах генерации энергии и углеводного обмена        | 6              | 2          | 2                            | 22             | 27            |
| Белки, участвующие в образовании цитоскелета и экзоцитозе                             | 41             | 27         | 30                           | 49             | 59            |
| Белки, участвующие в передаче сигнала и регуляции активности ферментов                | 23             | 11         | 37                           | 18             | 30            |
| Антиоксидантные и защитные белки/ферменты   | 6              | 4          | 5                            | 22             | 20            |
| Белки-регуляторы экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки               | 30             | 17         | 40                           | 40             | 65            |
| Ферменты, участвующие в метаболизме белков, аминокислот и других азотистых соединений | 9              | 3          | 7                            | 9              | 12            |
| Ферменты, участвующие в метаболизме липидов   | 3              | 2          | 3                            | 0              | 2             |
| Общее количество  | 118            | 66         | 124                          | 160            | 215           |

Примечание: \* – исходные данные взяты из [13].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Модели ПС у грызунов, индуцированные введением нейротоксинов МФТП и ротенона, являются одними из наиболее востребованных моделей БП [1]. В обоих случаях развитие БП обусловлено развитием митохондриальной дисфункции, в основе которой лежат разные механизмы. Нейротоксин МФТП при участии моноаминоксидазы Б (МАО Б) превращается в ион метилфенилпиридиния МФТП<sup>+</sup>, ответственный за первичные нарушения в дыхательной цепи митохондрий [5]. Ингибиторы МАО Б (необратимый ингибитор депренил и обратимый изатин), препятствующие биотрансформации МФТП, снижают проявления БП [21, 22]. Повреждение митохондрий под действием пестицида ротенона происходит независимым от моноаминоксидазы путём и, следовательно, осуществляется при участии других белков. Данные о полном несовпадении отличных от контроля пулов изатин-связывающих белков мозга животных с МФТП- и ротенон-индуцированным паркинсонизмом согласуются с этими представлениями. В то же время, изменения профиля изатин-связывающих белков при введении ротенона позволяют предположить, что введение нейропротектора изатина будет оказывать позитивный эффект и в ротеноновой модели БП.

## 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. Работа выполнялась 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.

Дополнительные материалы доступны в электронной версии статьи на сайте журнала ([pbmc.ibmc.msk.ru](http://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., 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**, 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. Meredith G.E., Rademacher D.J. (2011) MPTP mouse models of Parkinson's disease: An update. *J. Parkinsons Dis.*, **1**(1), 19-33. DOI: 10.3233/JPD-2011-11023
6. Medvedev A., Igosheva N., Crumeyrolle-Arias M., Glover V. (2005) Isatin: Role in stress and anxiety. *Stress*, **8**, 175-183. DOI: 10.1080/10253890500342321
7. Medvedev A., Buneeva O., Glover V. (2007) Biological targets for isatin and its analogues: implications for therapy. *Biologics*, **1**, 151-162.
8. Crumeyrolle-Arias M., Buneeva O., Zgoda V., Kopylov A., Cardona A., Tournaire M.C., Pozdnev V., Glover V., Medvedev A. (2009) Isatin binding proteins in rat brain: *In situ* imaging, quantitative characterization of specific [<sup>3</sup>H]isatin binding, and proteomic profiling. *J. Neurosci. Res.*, **87**, 2763-2772. DOI: 10.1002/jnr.22104
9. 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
10. Medvedev A., Buneeva O., Gnedenko O., Ershov P., Ivanov A. (2018) Isatin, an endogenous nonpeptide biofactor: A review of its molecular targets, mechanisms of actions, and their biomedical implications. *Biofactors*, **44**(2), 95-108. DOI: 10.1002/biof.1408
11. 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
12. Medvedev A., Buneeva O. (2022) Tryptophan metabolites as mediators of microbiota-gut-brain communication: Focus on isatin. A mini review. *Front. Behav. Neurosci.*, **16**, 922274. DOI: 10.3389/fnbeh.2022.922274
13. Бунеева О.А., Копылов А.Т., Неробкова Л.Н., Капица И.Г., Згода В.Г., Медведев А.Е. (2017) Влияние нейротоксина МФТП на протеомный профиль изатин-связывающих белков мозга мышей. *Биомедицинская химия*, **63**(4), 316-320. [Buneeva O.A., Kopylov A.T., Nerobkova L.N., Kapitsa I.G., Zgoda V.G., Medvedev A.E. (2017) The effect of neurotoxin MPTP administration to mice on the proteomic profile of brain isatin-binding proteins. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **63**(4), 316-320.] DOI: 10.18097/PBMC20176304316



14. Medvedev A.E., Goodwin D.L., Sandler M., Glover V. (1999) Efficacy of isatin analogues as antagonists of rat brain and heart atrial natriuretic peptide receptors coupled to particulate guanylate cyclase. *Biochem. Pharmacol.*, **57**, 913-915. DOI: 10.1016/S0006-2952(98)00371-2
15. Воронина Т.А., Серединин С.Б., Яркова М.А., Воронин М.В. (2012) Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств, часть первая. А.Н. Миронов (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*. A.N. Mironov (ed.), Grif i K, Moskva, 994 p.]
16. Khaing Z.Z., Geissler S.A., Schallert T., Schmidt C.E. (2013) Assessing forelimb function after unilateral cervical SCI using novel tasks: Limb step-alternation, postural instability and pasta handling. *J. Vis. Exp.*, **79**, e50955. DOI: 10.3791/50955
17. Tillerson J.L., Miller G.W. (2003) Grid performance test to measure behavioral impairment in the MPTP-treated-mouse model of parkinsonism. *J. Neurosci. Methods*, **123**(2), 189-200. DOI: 10.1016/S0165-0270(02)00360-6
18. Walker J.M. (ed.) (2002) *The Protein Protocol Handbook*, Humana Press Inc., Totowa, N.Y.
19. Wiśniewski J.R., Zougman A., Nagaraj N., Mann M. (2009) Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat. Methods*, **6**(5), 359-362. DOI: 10.1038/nmeth.1322
20. Kapp E.A., Schütz F., Connolly L.M., Chakel J.A., Meza J.E., Miller C.A., Fenyo D., Eng J.K., Adkins J.N., Omenn G.S., Simpson R.J. (2005) An evaluation, comparison, and accurate benchmarking of several publicly available MS/MS search algorithms: Sensitivity and specificity analysis. *Proteomics*, **5**(13), 3475-3490. DOI: 10.1002/pmic.200500126
21. 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
22. Langston J.W. (2017) The MPTP story. *J Parkinsons Dis.*, **7**(s1), S11-S19. DOI: 10.3233/JPD-179006

Поступила в редакцию: 02. 02. 2023.  
После доработки: 08. 02. 2023.  
Принята к печати: 08. 02. 2023.

## CHARACTERISTICS OF BEHAVIORAL REACTIONS AND THE PROFILE OF BRAIN ISATIN-BINDING PROTEINS OF RATS WITH THE ROTENONE-INDUCED EXPERIMENTAL PARKINSONISM

I.G. Kapitsa<sup>1,2</sup>, L.Sh. Kazieva<sup>1</sup>, N.E. Vavilov<sup>1</sup>, V.G. Zgoda<sup>1</sup>, A.T. Kopylov<sup>1</sup>, A.E. Medvedev<sup>1</sup>, O.A. Buneeva<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, Moscow, Russia

The neurotoxins rotenone and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) are used for modeling Parkinson's disease in animals (PD). They induce the mitochondrial respiratory chain dysfunction, which leads to the dopaminergic (DA) neuron degeneration. The advantage of the rotenone model consists in ability of rotenone to cause neurodegeneration showing symptoms and molecular biological characteristics similar to those of PD. Isatin (indoldione-2,3) is an endogenous regulator found in tissues and biological fluids of humans and animals. It exhibits a broad range of biological activity mediated by numerous isatin-binding proteins. In this work we have investigated behavioral reactions and profiles of brain isatin-binding proteins of rats with Parkinson's syndrome (PS) in comparison with the corresponding parameters of MPTP-induced Parkinsonism in mice. Systemic injection of rotenone caused severe PS comparable with the effect of MPTP injection. It was accompanied by significant body weight loss, death, oligokinesia, muscular rigidity, and postural instability of animals. In spite of the same pathogenic basis of PS caused by rotenone and MPTP, the molecular mechanisms of their action differ. In the case of rotenone-induced PS, the pool of isatin-binding proteins common of the control rats and the rats with PS (146) significantly exceeded the pool of the common proteins of control mice and mice with PS induced by MPTP, whether right after neurotoxin injection (27), or (all the more) in a week after the MPTP injection (14). The comparison of isatin-binding proteins specific of the animals with MPTP-induced PS and with the rotenone-induced PS (as compared with the control animals) revealed total absence of proteins common of these two models of PD. It is to be noted that both neurotoxins particularly affected the proteins participating in the signal transmission and enzyme activity regulation. The changes of the profile of isatin-binding proteins in response to the injection of rotenone suggest that the neuroprotector isatin could also influence positively in the case of the rotenone model of PD.

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

**Key words:** parkinsonism; neurodegeneration; neurotoxin rotenone; neurotoxin MPTP; isatin; isatin-binding proteins; brain; proteomic profiling

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

Received: 02.02.2023; revised: 08.02.2023; accepted: 08.02.2023.