

©Коллектив авторов

ОТСРОЧЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ РОТЕНОНА НА ОТНОСИТЕЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ИЗАТИН-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ МОЗГА У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ПАРКИНСОНИЗМОМ

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

¹НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
119121 Москва, Погодинская ул., 10; *эл. почта: olbuneeva@gmail.com
²НИИ фармакологии им. В.В. Закусова, 125315 Москва, Балтийская ул., 8

Изатин (индолдион-2,3) — эндогенный биологический регулятор, обнаруженный в мозге, периферических тканях и биологических жидкостях человека и животных. Его биологическую активность опосредуют изатин-связывающие белки, многие из которых были идентифицированы в ходе протеомного профилирования препаратов мозга мышей и крыс. Ряд этих белков имеет отношение к развитию нейродегенеративных заболеваний. Ранее на модели экспериментального паркинсонизма, индуцированного семидневным введением пестицида ротенона, были обнаружены выраженные нарушения поведенческих реакций, а также изменения профиля и относительного содержания изатин-связывающих белков мозга. В данной работе мы исследовали поведенческие реакции и относительное содержание изатин-связывающих белков мозга крыс с индуцированным ротеноном экспериментальным паркинсонизмом через 5 дней после завершения курсового введения этого нейротоксина. Несмотря на отмену введения ротенона, у животных сохранялись нарушения двигательной активности и координации движений. По результатам протеомного анализа выявлены изменения в относительном содержании 120 белков мозга (относительное содержание 83 белков увеличивалось, а 37 белков снижалось). Сравнительный анализ изатин-связывающих белков, относительное содержание которых в мозге менялось после последней инъекции ротенона (n=16) и через 5 дней (n=11), выявил совпадение только двух (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и субъединицы В протонной АТФазы V-типа). При этом большинство обнаруженных белков ассоциировано с нейродегенерацией, включая болезни Паркинсона и Альцгеймера.

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

DOI: 10.18097/PBMC20247001025

ВВЕДЕНИЕ

Изатин (индолдион-2,3) — эндогенный регулятор, обнаруженный в организме млекопитающих и человека, обладающий большим спектром биологической активности [1–4]. Ряд белков, связывающихся с изатином, играет важную роль в развитии нейродегенеративной патологии (болезни Альцгеймера и Паркинсона) [3, 5]. Исследования, выполненные на моделях паркинсонизма, вызванных введением нейротоксинов МФТП (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина) мышам и ротенона крысам, показали, что изатин оказывает нейропротекторный эффект и изменяет профиль изатин-связывающих белков [5–8]. Паркинсонический синдром (ПС), вызванный обоими нейротоксинами, характеризуется значимой потерей веса животных, их гибелью, олигокинезией, ригидностью и постуральной неустойчивостью. Однако, в отличие от МФТП-индуцированного ПС, в случае ротенон-индуцированного паркинсонизма пул изатин-связывающих белков, общих для контрольных крыс и крыс с ПС, значительно превышает пул общих белков контрольных мышей и мышей с МФТП-индуцированным ПС. То есть спектр изатин-связывающих белков при введении ротенона изменяется незначительно [9]. Сравнение профилей изатин-связывающих белков, специфичных для крыс с ПС, индуцированным

каждым из этих нейротоксинов, выявило полное отсутствие белков, общих для двух моделей, что свидетельствует о различии тонких молекулярных механизмов действия ротенона и МФТП. Исследование количественных параметров изатин-связывающих белков в случае ротеноновой модели паркинсонизма показало, что, несмотря на отсутствие изменений спектра этих белков по сравнению с контролем, введение нейротоксина влияет на их относительное содержание [10]. Обнаружено увеличение относительного содержания 65 белков и снижение относительного содержания 21 белка.

Целью данной работы было сравнение физиологических реакций и количественных изменений протеомного профиля изатин-связывающих белков мозга крыс непосредственно после курсового введения ротенона и спустя 5 дней после последнего введения этого нейротоксина.

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-карбокситил)-фосфин (“Pierce”, США); модифицированный трипсин (mass spectrometry grade, “Promega”, США). Остальные реактивы были отечественного производства максимально 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 проводилось согласно руководству [11], путём ежедневного 7-дневного внутрибрюшинного введения крысам раствора ротенона в нейтральном триглицериде миглиоле (Miglyol 840), в дозе 2,75 мг/кг. Раствор ротенона готовили, как описано ранее [9]. Контрольные животные получали ежедневно физиологический раствор внутрибрюшинно в эквивалентном объёме 0,2 мл на 100 г веса тела животного.

Тестирование поведенческих реакций

У животных с экспериментальным ПС на 12 день эксперимента, через 5 дней после последнего введения ротенона, проводили оценку олигокинезии в тестах “Открытое поле” и “Вращающийся стержень”, как это подробно описано ранее [9].

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 \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.

Получение лизатов гомогенатов мозга

Животных декапитировали под лёгким эфирным наркозом при помощи гильотины через 5 дней после последнего введения ротенона. Ткань мозга (большие полушария) гомогенизировали при помощи гомогенизатора Heidolph SilentCrusher (50000 об/мин) в 0,05 М калий-фосфатном буфере (pH 7,4) до конечной концентрации 30 мг/мл. Для оценки относительных количественных изменений содержания

белков мозга у животных разных экспериментальных групп при подготовке проб использовали одинаковое количество общего белка, которое контролировали с помощью метода Бредфорда [12]. После инкубации в присутствии 3% Тритона X-100 (4°C, 1 ч) лизаты разводили в 3 раза тем же буфером и центрифугировали 30 мин при 16000 g для получения осветлённой надосадочной жидкости.

Пробы для масс-спектрометрического анализа (экстракцию белков, алкилирование и трипсинолиз) готовили, как описано ранее [10].

Масс-спектрометрический анализ

Масс-спектрометрический анализ осуществляли с использованием оборудования центра коллективного пользования “Протеом человека” НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича (ИБМХ) — системы высокоэффективного жидкостного разделения пептидов Ultimate 3000 RSLCnano (“Thermo Scientific”, США) в нанопотоковом режиме масс-спектрометрического детектора Q-Exactive HFX (“Thermo Scientific”, США) как описано ранее [9].

Биоинформатическую обработку данных проводили согласно [9].

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Отсроченное влияние ротенона на поведенческие реакции крыс

Оценка уровня олигокинезии у крыс через 5 дней после последнего введения ротенона в тесте “Открытое поле” показала сохранение двигательных нарушений. Так, горизонтальная и вертикальная активности и число заглядываний в норки, оставались сниженными на 53%, 41% и 61,4% ($p < 0,05$) соответственно относительно показателей контрольной группы. Отсроченное влияние ротенона также проявлялось и в моторном дефиците: длительность удержания животных на вращающемся стержне была снижена на 51% по сравнению с контрольной группой (табл. 1).

Отсроченное влияние ротенона на относительное содержание белков мозга крыс

Согласно данным протеомного анализа, через 5 дней после курсового введения ротенона сохраняются различия в относительном содержании в мозге крыс с ПС белков, относящихся к различным функциональным группам по сравнению с контрольной группой. Сравнивая данные эффекта ротенона непосредственно после его курсового введения и через 5 дней, можно отметить, что через 5 дней сохраняется изменение относительного содержания (по сравнению с контролем) лишь шести белков (рис. 1). Это альфа-синуклеин, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, субъединицы В и D1 протонной АТФазы V-типа, аминокислотный транспортер, 4 субъединица 1 бета-субкомплекса

Таблица 1. Отсроченное влияние курсового введения ротенона на двигательную активность и координацию движений крыс

Группа, число животных	Двигательная активность, ед.		Число заглядываний в отверстия (норки) в полу установки, ед.	Продолжительность удержания на горизонтальном стержне, вращающемся с постоянной скоростью 12 об/мин, с
	Горизонтальная (число перемещений)	Вертикальная (число стоек)		
Контроль, n=10	14,67±2,42	9,67±2,22	7,56±1,76	177,75±2,25
Ротенон, n=12	6,92±0,95	5,67±0,54	2,92±0,56	87,17±12,43
<i>p</i>	<0,01	<0,075	<0,05	<0,001

Примечание. Ротенон вводили в течение 7 дней [9], двигательную активность и координацию движений анализировали через 5 дней после последнего введения ротенона. Данные представлены в виде средней величины ± ошибка средней.

Таблица 2. Распределение белков мозга, количественно меняющихся в динамике развития индуцированного ротеноном ПС, по функциям

Функция	Всего белков		Количество белков после воздействия ротенона			
	7 дней	12 дней	↑		↓	
			7 дней	12 дней	7 дней	12 дней
Белки/ферменты, участвующие в процессах генерации энергии и углеводного обмена	19	19	17	7	2	12
Белки, участвующие в образовании цитоскелета и экзоцитозе	23	33	17	26	6	7
Белки, участвующие в передаче сигнала и регуляции активности ферментов	24	34	17	27	7	7
Антиоксидантные и защитные белки/ферменты	7	15	4	10	3	5
Белки-регуляторы экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки	7	3	4	3	3	0
Ферменты, участвующие в метаболизме белков, аминокислот и других азотистых соединений	2	14	2	9	0	5
Ферменты, участвующие в метаболизме липидов	4	2	4	1	0	1
Всего	86	120	65	83	21	37

Примечание: знак “↑” показывает увеличение количества белка, а знак “↓” – уменьшение.

курс ротенона через 5 дней

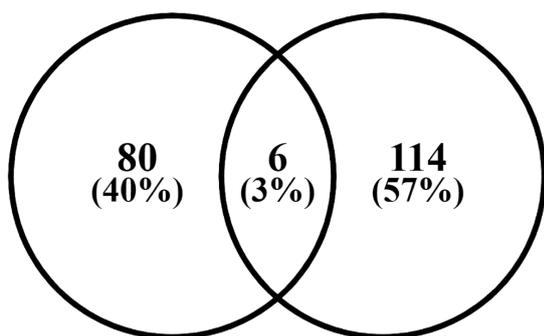


Рисунок 1. Диаграмма Венна. Сравнение изменения относительного содержания белков мозга крыс (по сравнению с контролем) непосредственно после курсового введения ротенона и через 5 дней.

NADH-дегидрогеназы дыхательной цепи переноса электронов (табл. S1, Дополнительные материалы, а также Дополнительные материалы к статье [10]). При этом количественные значения этого изменения на разных стадиях эксперимента значительно отличаются. Например, непосредственно после

курсного введения ротенона относительное содержание альфа-синуклеина возрастает в 5,6 раза по сравнению с контролем, а через 5 дней оно лишь в 1,4 раза больше, чем в контроле. Для глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы рост этих показателей составил соответственно 1,6 и 0,7 раз, для субъединицы NADH-дегидрогеназы — 2,0 и 1,3 раз, а для аминокислотного транспортера и для субъединицы и D1 протонной АТФазы 9,2 и 0,5 раз и 21,1 и 1,3 раз соответственно (ср. табл. S1 Дополнительные материалы [10] и данной статьи). То есть количество первоначально затронутых действием нейротоксина белков постепенно возвращается к норме. В то же время, происходит изменение относительного содержания других белков. В таблице 2 приведены данные об изменении относительного содержания белков разных функциональных групп сразу после последней инъекции ротенона и через 5 дней. Интересно, что, хотя это и разные белки, количество белков определенных функциональных групп в значительной степени совпадает. В обоих случаях наиболее выраженные изменения под действием ротенона обнаружены у ферментов, ответственных за генерацию энергии и углеводный обмен, белков

ИЗАТИН-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ МОЗГА: ОТСРОЧЕННЫЙ ЭФФЕКТ РОТЕНОНА

цитоскелета и экзоцитоза и белков передачи сигнала и регуляции активности ферментов. Гораздо меньше меняется в результате воздействия нейротоксина относительное содержание антиоксидантных и защитных белков, регуляторов экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки, ферментов метаболизма белков и других азотистых соединений и ферментов метаболизма липидов (табл. 2). При этом в большинстве своём относительное содержание количества белков меняется в сторону увеличения в обоих случаях. Исключение составляет группа ферментов генерации энергии и углеводного обмена. Из 19 белков этой группы, изменяющих своё относительное содержание под действием ротенона, на седьмой день эксперимента содержание 17 белков увеличивается, а 2 уменьшается. Через 5 дней после курсового введения ротенона из 19 белков, изменяющих своё относительное содержание, содержание 7 увеличивается, а 12 уменьшается.

Сравнительный анализ изатин-связывающих белков, относительное содержание которых в мозге менялось после последней инъекции ротенона (n=16) и через 5 дней (n=11), выявил совпадение только двух: глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и субъединицы В протонной АТФазы V-типа (рис. 2, табл. 3 и 4). Непосредственно после курсового введения нейротоксина относительное содержание изатин-связывающих белков изменялось значительно и в основном в сторону увеличения. Через 5 дней после курсового введения ротенона изменения были не столь значительными, у 7 из 16 белков относительное содержание увеличивалось не более чем в 2 раза, а у остальных немного уменьшалось.

При этом подавляющее большинство обнаруженных изатин-связывающих белков, претерпевающих количественные изменения на обеих стадиях эксперимента, ассоциировано с нейродегенерацией, включая болезни Паркинсона и Альцгеймера [13–53].

Таблица 3. Изатин-связывающие белки, относительное содержание которых значимо меняется на 5 день после курсового введения животным ротенона по сравнению с контролем (отсроченный эффект)

№	№ по базе Uniprot	Ген по Uniprot	Название белка по Uniprot	Функция	Локализация	Отличие от контроля при введении ротенона		Литература
						Кратность изменения	-Log(P-значение)	
1	A0A815Y1E2	<i>Add1</i>	Alpha-adducin	2	PM, M, C	2,2	1,1	[13, 14]
2	A0A816GDI3	<i>Actn1</i>	Alpha-actinin-1	2	PM, M, C	1,7	1,2	[15, 16]
3	P31000	<i>Vim</i>	Vimentin	2	C, PM, M, N	1,6	1,8	[17]
4	Q6AY84	<i>Scrn1</i>	Secernin-1	2	C	1,4	1,8	[18, 19]
5	Q00981	<i>Uchl1</i>	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	6	C, ER, N, Mch, PM	1,4	1,7	[20, 21]
6	P05065	<i>Aldoa</i>	Fructose-bisphosphate aldolase A	1	C	1,3	1,8	[22, 23]
7	P62815	<i>Atp6v1b2</i>	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	2	M, PM, Ve, S	1,3	2,2	[24]
8	P60203	<i>Plp1</i>	Myelin proteolipid protein	3	PM, M	0,7	3,0	[25]
9	Q5XIF6	<i>Tuba4a</i>	Tubulin alpha-4A chain	2	C	0,5	1,9	[26–28]
10	B4F7C2	<i>Tubb4a</i>	Tubulin beta chain	2	C	0,7	1,7	[29, 30]
11	P07323	<i>Eno2</i>	Gamma-enolase	1	C, PM	0,7	3,3	[31]
12	P04797	<i>Gapdh</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1	C, N	0,7	2,7	[32, 33]
13	P48500	<i>Tpi1</i>	Triosephosphate isomerase	1	C	0,6	3,4	[34]
14	P07335	<i>Ckb</i>	Creatine kinase B-type	1	C, PM, Mch	0,6	4,6	[35, 36]
15	P00507	<i>Got2</i>	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	6	Mch, PM	0,4	3,9	[37]
16	Q5M7A7	<i>Cnr1p1</i>	CB1 cannabinoid receptor-interacting protein 1	3	C, PM	0,7	2,3	[38–41]

Примечание. Здесь и в таблице 4 названия белков указаны, как они фигурируют в базе Uniprot. Цифры в колонке “функции” обозначают следующие функциональные группы 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: C – цитоплазма, N – ядро, M – мембраны, PM – плазматическая мембрана, ER – эндоплазматический ретикулум, G – комплекс Гольджи, Mch – митохондрии, L – лизосомы, Mic – микросомы, E – эндосомы, Ve – везикулы, S – синапс.

Таблица 4. Изатин-связывающие белки, относительное содержание которых значительно меняется в конце курсового введения животным ротенона (по сравнению с контролем)^a

№	№ по базе Uniprot	Ген по Uniprot	Название белка по Uniprot	Функция	Локализация	Отличие от контроля при введении ротенона		Литература
						Кратность изменения	-Log(P-значение)	
1	P04797	<i>Gapdh</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1	C, N	1,6	2,4	[32, 33]
2	P07943	<i>Akr1b1</i>	Aldo-keto reductase family 1 member B1	7	C	2,0	3,4	—
3	P19527	<i>Nefl</i>	Neurofilament light polypeptide	2	C, S	0,5	3,1	[42]
4	P38983	<i>Rpsa</i>	40S ribosomal protein SA	5	C, N, PM	2,8	4,0	[43]
5	P62744	<i>Ap2s1</i>	AP-2 complex subunit sigma	2	M, PM	2,4	3,4	[44, 45]
6	P62815	<i>Atp6v1b2</i>	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	2	M, PM, Ve, S	1,7	4,4	[24]
7	Q63198	<i>Cntn1</i>	Contactin-1	3	PM	3,7	3,0	[46]
8	Q6P0K8	<i>Jup</i>	Junction plakoglobin	2	C, M	10,5	3,0	[47, 48]
9	A0A8I6A1Y1	<i>Ogdh</i>	Oxoglutarate dehydrogenase (succinyl-transferring)	1	Mch, N	0,7	3,4	[49, 50]
10	A0A8I6A7U6	<i>Sfpq</i>	Splicing factor proline and glutamine rich	5	C, N	0,3	4,9	[51, 52]
11	A0A8I6A304	<i>Baspl</i>	Brain abundant, membrane attached signal protein 1	3	C, N	18,3	5,1	[53]

^a Модифицирована из [10] и дополнена.

курс ротенона через 5 дней

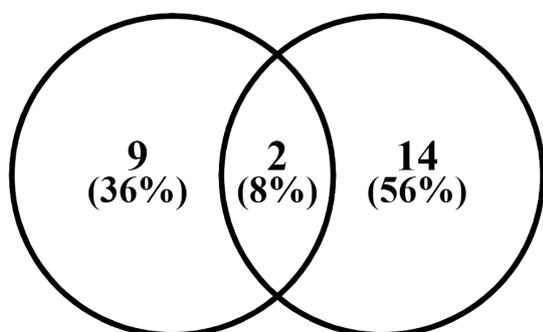


Рисунок 2. Диаграмма Венна. Сравнение изменения относительного содержания изатин-связывающих белков мозга крыс (по сравнению с контролем) непосредственно после курсового введения ротенона и через 5 дней.

На фоне всех изатин-связывающих белков, относительное содержание которых изменяется под действием ротенона и изучаемых нами нейропротекторов, выделяются плакоглобин и относящийся к группе кислоторастворимых белков мозга белок BASP1 (brain acid-soluble protein 1). Их относительное содержание при введении животным ротенона возрастает приблизительно в 10 и в 20 раз соответственно.

Плакоглобин, известный также как гамма-катенин, — цитоплазматический компонент десмосом, гомологичный бета-катенину. Помимо

формирования десмосом, плакоглобин участвует также в образовании адгезивных межклеточных контактов, ассоциированных с актиновыми микрофиламентами. Мутация гена *Jup*, кодирующего плакоглобин, вызывает кардиомиопатии. Кроме того, известно, что белки семейства катенинов участвуют в регуляции микроокружения клеток-предшественников нейронов, пролиферации и дифференциации клеток коры больших полушарий [48].

BASP1, относящийся к группе кислоторастворимых белков мозга, наряду с белком GAP-43 (growth-associated protein-43) регулирует поддержание цикла пресинаптических везикул и выброс нейромедиаторов. Посттрансляционные модификации и функции этого белка, его участие в процессах роста аксонов, их регенерации и пластичности сейчас активно исследуются в контексте нейродегенеративных заболеваний [53].

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).

ЛИТЕРАТУРА

1. 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
2. Medvedev A., Buneeva O., Glover V. (2007) Biological targets for isatin and its analogues: Implications for therapy. *Biologics*, **1**(2), 151-162. PMID: 19707325
3. 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
4. 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
5. 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
6. Buneeva O., Kopylov A., Kapitsa I., Ivanova E., Zgoda V., Medvedev A. (2018) The effect of neurotoxin MPTP and neuroprotector isatin on the profile of ubiquitinated brain mitochondrial proteins. *Cells*, **7**(8), 91. DOI: 10.3390/cells7080091
7. Medvedev A., 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
8. 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 ротенонным 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
9. Капица И.Г., Казиева Л.Ш., Вавилов Н.Э., Згода В.Г., Копылов А.Т., Медведев А.Е., Бунеева О.А. (2023) Особенности поведенческих реакций и профиля изатин-связывающих белков мозга у крыс с индуцированным ротенонем 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
10. 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 ротенонем 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
11. 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.]
12. Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999
13. Yu H., Xiong M., Liu C., Xia D., Meng L., Zhang Z. (2023) The γ -adducin 1-357 fragment promotes tau pathology. *Front. Aging Neurosci.*, **15**, 1241750. DOI: 10.3389/fnagi.2023.1241750
14. Gallardo G., Barowski J., Ravits J., Siddique T., Lingrel J.B., Robertson J., Steen H., Bonni A. (2014) An α 2-Na/K ATPase/ α -adducin complex in astrocytes triggers non-cell autonomous neurodegeneration. *Nat. Neurosci.*, **17**(12), 1710-1719. DOI: 10.1038/nn.3853
15. Oikonomou K.G., Zachou K., Dalekos G.N. (2011) Alpha-actinin: A multidisciplinary protein with important role in B-cell driven autoimmunity. *Autoimmun. Rev.*, **10**(7), 389-396. DOI: 10.1016/j.autrev.2010.12.009
16. Foley K.S., Young P.W. (2014) The non-muscle functions of actinins: An update. *Biochem. J.*, **459**(1), 1-13. DOI: 10.1042/BJ20131511
17. Jang B., Kim M.J., Lee Y.J., Ishigami A., Kim Y.S., Choi E.K. (2020) Vimentin citrullination probed by a novel monoclonal antibody serves as a specific indicator for reactive astrocytes in neurodegeneration. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **46**(7), 751-769. DOI: 10.1111/nan.12620
18. Pires G., McElligott S., Drusinsky S., Halliday G., Potier M.C., Wisniewski T., Drummond E. (2019) Secernin-1 is a novel phosphorylated tau binding protein that accumulates in Alzheimer's disease and not in other tauopathies. *Acta Neuropathol. Commun.*, **7**(1), 195. DOI: 10.1186/s40478-019-0848-6
19. Weiner S., Sauer M., Brinkmalm G., Constantinescu J., Constantinescu R., Gomes B.F., Becker B., Nellgård B., Dalla K., Galasko D., Zetterberg H., Blennow K., Gobom J.

- (2023) SCRN1: A cerebrospinal fluid biomarker correlating with tau in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.*, **19**(10), 4609-4618. DOI: 10.1002/alz.13042
20. Sharma A., Liu H., Tobar-Tosse F., Chand Dakal T., Ludwig M., Holz F.G., Loeffler K.U., Wüllner U., Herwig-Carl M.C. (2020) Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolases (UCHs): Potential mediators for cancer and neurodegeneration. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**(11), 3910. DOI: 10.3390/ijms21113910
 21. Buneeva O., Medvedev A. (2024) Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 and its role in Parkinson's disease. *Int. J. Mol. Sci.*, **25**(2), 1303. DOI: 10.3390/ijms25021303
 22. Mor F., Izak M., Cohen I.R. (2005) Identification of aldolase as a target antigen in Alzheimer's disease. *J. Immunol.*, **175**(5), 3439-3445. DOI: 10.4049/jimmunol.175.5.3439
 23. Dukes A.A., van Laar V.S., Cascio M., Hastings T.G. (2008) Changes in endoplasmic reticulum stress proteins and aldolase A in cells exposed to dopamine. *J. Neurochem.*, **106**(1), 333-346. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2008.05392.x
 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. Fu Y., Zhou L., Li H., Hsiao J.T., Li B., Tanglay O., Auwyang A.D., Wang E., Feng J., Kim W.S., Liu J., Halliday G.M. (2022) Adaptive structural changes in the motor cortex and white matter in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.*, **144**(5), 861-879. DOI: 10.1007/s00401-022-02488-3
 26. Mazzetti S., Calogero A.M., Pezzoli G., Cappelletti G. (2023) Cross-talk between α -synuclein and the microtubule cytoskeleton in neurodegeneration. *Exp. Neurol.*, **359**, 114251. DOI: 10.1016/j.expneurol.2022.114251
 27. Mazzetti S., Giampietro F., Calogero A.M., Isilgan H.B., Gagliardi G., Rolando C., Cantele F., Ascagni M., Bramerio M., Giaccone G., Isaias I.U., Pezzoli G., Cappelletti G. (2024) Linking acetylated α -tubulin redistribution to α -synuclein pathology in brain of Parkinson's disease patients. *NPJ Parkinsons Dis.*, **10**(1), 2. DOI: 10.1038/s41531-023-00607-9
 28. Amadeo A., Pizzi S., Comincini A., Modena D., Calogero A.M., Madaschi L., Faustini G., Rolando C., Bellucci A., Pezzoli G., Mazzetti S., Cappelletti G. (2021) The association between α -synuclein and α -tubulin in brain synapses. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**(17), 9153. DOI: 10.3390/ijms22179153
 29. Pellegrini L., Wetzel A., Grannó S., Heaton G., Harvey K. (2017) Back to the tubule: Microtubule dynamics in Parkinson's disease. *Cell Mol. Life Sci.*, **74**(3), 409-434. DOI: 10.1007/s00018-016-2351-6
 30. Ren Y., Zhao J., Feng J. (2003) Parkin binds to alpha/beta tubulin and increases their ubiquitination and degradation. *J. Neurosci.*, **23**(8), 3316-3324. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.23-08-03316.2003
 31. 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
 32. 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
 33. 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
 34. Orosz F., Oláh J., Ovádi J. (2006) Triosephosphate isomerase deficiency: Facts and doubts. *IUBMB Life*, **58**(12), 703-715. DOI: 10.1080/15216540601115960
 35. 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
 36. 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. *Ageing Dis.*, **10**(3), 601-610. DOI: 10.14336/AD.2018.0615
 37. He T., Lin X., Su A., Zhang Y., Xing Z., Mi L., Wei T., Li Z., Wu W. (2023) Mitochondrial dysfunction-targeting therapeutics of natural products in Parkinson's disease. *Front. Pharmacol.*, **14**, 1117337. DOI: 10.3389/fphar.2023.1117337
 38. Brotchie J.M. (2003) CB1cannabinoid receptor signalling in Parkinson's disease. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **3**(1), 54-61. DOI: 10.1016/s1471-4892(02)00011-5
 39. Lastres-Becker I., Cebeira M., de Ceballos M.L., Zeng B.Y., Jenner P., Ramos J.A., Fernández-Ruiz J.J. (2001) Increased cannabinoid CB1 receptor binding and activation of GTP-binding proteins in the basal ganglia of patients with Parkinson's syndrome and of MPTP-treated marmosets. *Eur. J. Neurosci.*, **14**(11), 1827-1832. DOI: 10.1046/j.0953-816x.2001.01812.x
 40. Oliver E.E., Hughes E.K., Puckett M.K., Chen R., Lowther W.T., Howlett A.C. (2020) Cannabinoid receptor interacting protein 1a (CRIP1a) in health and disease. *Biomolecules*, **10**(12), 1609. DOI: 10.3390/biom10121609
 41. Smith T.H., Sim-Selley L.J., Selley D.E. (2010) Cannabinoid CB1 receptor-interacting proteins: Novel targets for central nervous system drug discovery? *Br. J. Pharmacol.*, **160**(3), 454-466. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.00777.x
 42. 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
 43. 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
 44. 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
 45. 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
 46. 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

47. 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
48. 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
49. 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
50. 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
51. 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
52. 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
53. 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

Поступила в редакцию: 11. 01. 2024.
После доработки: 01. 02. 2024.
Принята к печати: 15. 02. 2024.

THE DELAYED EFFECT OF ROTENONE ON THE RELATIVE CONTENT OF BRAIN ISATIN-BINDING PROTEINS OF RATS WITH EXPERIMENTAL PARKINSONISM

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 (IBMC),
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: olbuneeva@gmail.com
²Zakusov Institute of Pharmacology, 8 Baltiyskaya str., Moscow, 125315 Russia

Isatin (indoldione-2,3) is an endogenous biological regulator found in the brain, peripheral tissues, and biological fluids of humans and animals. Its biological activity is realized via isatin-binding proteins, many of which were identified during proteomic profiling of the brain of mice and rats. A number of these proteins are related to the development of neurodegenerative diseases. Previously, using a model of experimental Parkinsonism induced by a seven-day course of rotenone injections, we have observed behavioral disturbances, as well as changes in the profile and relative content of brain isatin-binding proteins. In this study, we have investigated behavioral responses and the relative content of brain isatin-binding proteins in rats with rotenone-induced Parkinsonism 5 days after the last administration of this neurotoxin. Despite the elimination of rotenone, animals exhibited motor and coordination impairments. Proteomic profiling of isatin-binding proteins revealed changes in the relative content of 120 proteins (the relative content of 83 proteins increased and that of 37 proteins decreased). Comparison of isatin-binding proteins characterized by the changes in the relative content observed in the brain right after the last injection of rotenone (n=16) and 5 days later (n=11) revealed only two common proteins (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and subunit B of V-type proton ATPase). However, most of these proteins are associated with neurodegeneration, including Parkinson's and Alzheimer's diseases.

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

Key words: Parkinsonism; neurotoxin rotenone; neurodegeneration; isatin-binding proteins; neuroprotectors; isatin; brain; proteomic profiling

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

Received: 11.01.2024; revised: 01.02.2024; accepted: 15.02.2024.