

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616.155.16.615.9

© Коллектив авторов

### ИНГИБИРОВАНИЕ NO-ЗАВИСИМОЙ АКТИВАЦИИ РАСТВОРИМОЙ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ИЗАТИНОМ

*И.С. Северина, А.Ю. Щеголев, Г.В. Пономарев, А.Е. Медведев\**

Учреждение Российской академии медицинских наук, Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, РАМН,  
Погодинская ул., 10, 119121 Москва; факс (499)245-0857;  
эл. почта: professor57@yandex.ru

Изатин (индол-дион-2,3) - эндогенный индол, обладающий широким спектром биологической и фармакологической активности. В физиологических концентрациях (в интервале от 1 нМ до 10 мкМ) изатин не влияет на базальную активность растворимой гуанилатциклазы (рГЦ) тромбоцитов человека, но вызывает колоколообразное торможение активности фермента, активированного оксидом азота (NO). Ингибирование NO-зависимой активации изатином не зависит от химической природы NO доноров. Ингибиторные эффекты ODQ (гем-зависимого ингибитора рГЦ) и изатина не аддитивны, что может указывать на участие железа гема в ингибировании изатином и эксперименты с геминем выявили некоторые изменения в спектре последнего, связанные с изатином. Изатин ингибирует также активацию рГЦ YC-1, NO-независимым, аллостерическим активатором фермента. Это позволяет предположить, что колоколообразный характер торможения NO-зависимой активации рГЦ изатином может быть обусловлен комплексным взаимодействием изатина с гем-связывающим доменом и с аллостерическим центром рГЦ, ответственным за связывание с YC-1.

**Ключевые слова:** растворимая гуанилатциклаза, оксид азота (NO), изатин.

**ВВЕДЕНИЕ.** Изатин (индолдион-2,3) - эндогенный индол, широко распространенный в мозге, периферических тканях и биологических жидкостях млекопитающих [1-3], содержание которого резко увеличивается при стрессе [2]. Изатин обладает широким спектром биологических эффектов *in vivo* и *in vitro* [1-3]. В физиологических концентрациях (в диапазоне от 1 нМ до 10 мкМ) изатин служит эндогенным ингибитором стимуляции мембраносвязанной гуанилатциклазы натрийуретическими пептидами [4, 5]; он также тормозит активность моноаминоксидазы Б [6] и ингибирует индуцированную нитропруссидом натрия активацию растворимой гуанилатциклазы [7].

Растворимая гуанилатциклаза (рГЦ, GTP-пирофосфатлиаза (циклизующая); КФ 4.6.1.2) – основной физиологический рецептор эндогенного оксида азота (NO), который активирует фермент и усиливает образование вторичного посредника, циклического 3',5'-гуанозинмонофосфата (сGMP) [8, 9]. Последний опосредует широкий спектр физиологических функций через взаимодействие со специфическими сGMP-зависимыми протеинкиназами, ионными каналами и фосфодиэстеразой [9]. Этот путь передачи сигналов лежит в основе физиологических действий сигнальной системы NO-растворимая гуанилатциклаза-сGMP и является важным для этиологии различных патологических состояний. Считается, что агенты, которые могут селективно модулировать активность фермента, должны обладать значительным терапевтическим потенциалом [10, 11].

\* - адресат для переписки

## ИНГИБИРОВАНИЕ ИЗАТИНОМ NO-ЗАВИСИМОЙ АКТИВАЦИИ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ

Несколько лет назад мы показали, что изатин ингибирует индуцированную нитропруссидом натрия (SNP) активацию рГЦ [7]. Наиболее выраженное торможение, наблюдаемое при  $10^{-8}$  М концентрации изатина, - самый мощный (в концентрационном плане) эффект изатина. Кривая зависимости торможения рГЦ от концентрации изатина имела колоколообразную форму, и торможение этого фермента при высоких концентрациях изатина становилось менее сильным. Изатин не влиял на гем-независимую стимуляцию гуанилатциклазы протопорфиритном IX [7]. Это дает основание предположить, что в регуляции рГЦ изатином возможно участвует гем гуанилатциклазы. Однако, какие именно участки ответственны за взаимодействие фермента с изатином до сих пор не выяснено.

В настоящей работе мы исследовали влияние изатина на базальную активность рГЦ тромбоцитов человека, на стимуляцию фермента NO-донором (нитропруссидом натрия, SNP), YC-1 (NO -независимым активатором фермента) и на синергичное усиление индуцированной SNP активации фермента в присутствии YC-1.

**МЕТОДИКА.** В качестве источника рГЦ мы использовали тромбоциты человека, которые выделяли из крови здоровых доноров (мужского пола, в возрасте от 20 до 40, лет давших информированное согласие на использование крови для данных экспериментов) [12]. Суспензию отмытых тромбоцитов в 50 мМ Трис-HCl буфере (pH 7,6), содержащим 0,2 мМ дитиотрейтол, озвучивали в ультразвуковом дезинтеграторе MSE-78 (Великобритания) в течение 20 с при 2°C и центрифугировали 1 ч при 105000 g. Супернатант озвученной суспензии тромбоцитов, полученной из 40 мл крови одного донора, использовали в качестве препарата растворимой гуанилатциклазы в одном эксперименте.

Активность гуанилатциклазы измеряли как описано в работе [13]. Пробы (общий объём 150 мкл) содержали 50 мМ Трис-HCl буфер (pH 7,6), 1 мМ GTP, 4 мМ  $MgCl_2$ , 4 мМ креатинфосфат, 20 мкг креатинфосфокиназы, 10 мМ теofilлин, 20 мкг супернатанта 105000 g (по белку) и при необходимости другие добавки. Исползованная концентрация теofilлина вызывает полное торможение активности фосфодиэстеразы тромбоцитов человека [12]. Влияние изатина исследовали в диапазоне концентраций от 1 нМ до 10 мкМ. Нитропруссид натрия использовали в интервале концентраций от 0,1 мкМ до 10 мкМ. Изатин сначала преинкубировали (7 мин при 2°C) с рГЦ, а затем (в опытах с YC-1) перед добавлением NO-донора дополнительно преинкубировали с YC-1 (7 мин при 2°C).

Количество образовавшегося cGMP (15 мин при 37°C) определяли иммуноферментным (ELISA) методом с использованием наборов реактивов для количественного определения cGMP ("Медицина. Аналитика. Ветеринария", Россия). Белок определяли по методу Bradford [14]. Все использованные реактивы максимально доступной чистоты были фирмы "Sigma" (США).

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** В соответствии с результатами наших предыдущих исследований [7], изатин в диапазоне концентраций от 1 нМ до 10 мкМ не влиял на базальную активность рГЦ тромбоцитов человека, но вызывал "колоколообразное торможение" активации рГЦ, индуцированной 10 мМ нитропруссидом натрия (SNP) (рис. 1). Изатин (1 нМ) тормозил также NO-зависимую активацию фермента классическим прямым NO-донором спермин NONO (использованным в оптимальной концентрации 20 мкМ), а также другим NO-донором - бензодифуроксаном (10 мкМ) (табл. 1) [15]. Поскольку 1 нМ изатин вызывал примерно 40% торможение рГЦ, активированной тремя различными NO-донорами, можно предположить, что этот эффект не зависит от химической структуры NO-доноров (табл. 1). Изатин также тормозил активацию рГЦ NO-независимым, но гем-зависимым, аллостерическим активатором YC-1 (3-[5-оксиметил-2-фурил]-1-бензил индазол) ( $40,0 \pm 11,2\%$ ,  $n=9$ ;  $p<001$ ). Однако, следует отметить, что хотя % торможения аллостерической активации был аналогичен эффекту изатина на NO-стимулированную активность рГЦ, абсолютные изменения (в пмоль cGMP/мин/мг белка) были значительно меньше:

активация базальной активности рГЦ YC-1 (3 мкМ) была всего трехкратной, тогда как стимуляция фермента индуцированного SNP (10 мкМ) составляла 80 раз. Поскольку YC-1 не только стимулирует фермент, но и потенцирует активацию рГЦ NO-донорами [16, 17], мы исследовали влияние изатина на активацию фермента YC-1 и на синергичное усиление активации рГЦ SNP в присутствии YC-1.

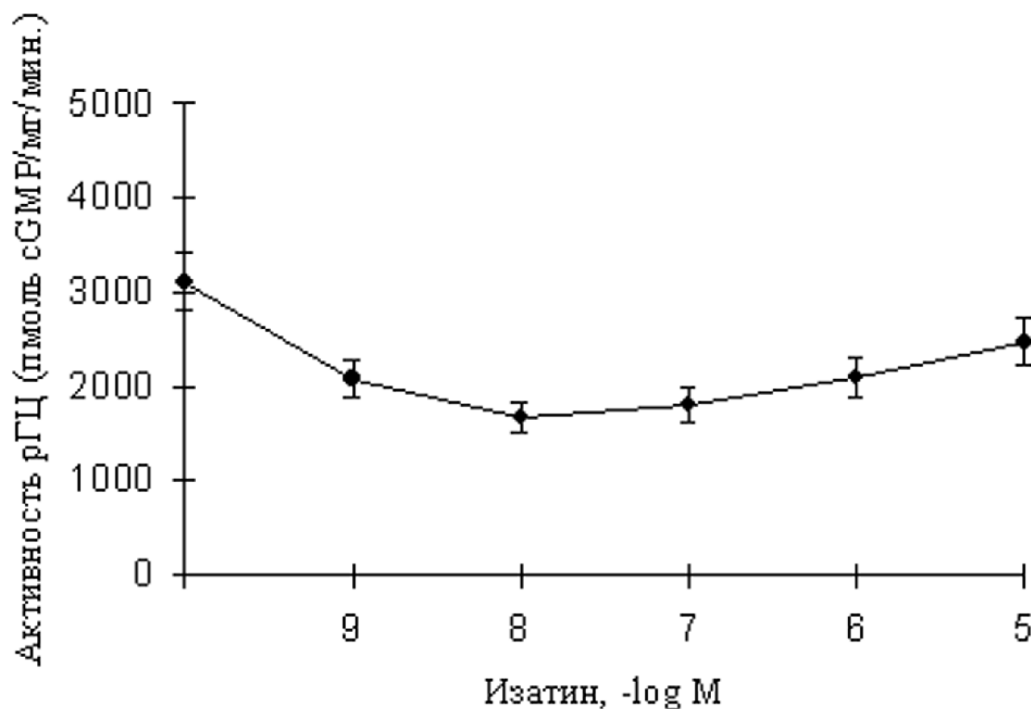


Рисунок 1.

Влияние изатина на активацию растворимой гуанилатциклазы (рГЦ) тромбоцитов человека нитропруссидом натрия (SNP).

Ордината: Стимулированная SNP активность рГЦ (пмоль сGMP/мг/мин).

Абсцисса: концентрация SNP (- log M). Приведены средние значения из трех независимых экспериментов ( $\pm$  стандартные отклонения).

Таблица 1. Влияние изатина на активацию рГЦ тромбоцитов человека различными донорами NO.

Добавки	Торможение изатином (%)
Контроль	—
SNP 10 мкМ	32,7 $\pm$ 8,0%
Спермин NONO 20 мкМ	41,3 $\pm$ 5,7%
Бензодифуроксан 10 мкМ	37,0 $\pm$ 5,8%

Примечание. Результаты выражены в % от активности рГЦ, стимулированной донорами NO и принятой за 100%. Приведены средние значения из трех независимых экспериментов ( $\pm$  стандартные отклонения)

Рисунок 2а показывает, что 3 мкМ YC-1 потенцировал активацию рГЦ увеличивающимися концентрациями SNP (ср. кривые 1 и 3), и этот эффект достигал уровня статистической достоверности при 10 мкМ ( $p < 0,01$ ). 1 нМ изатин снижал активацию рГЦ не только в опытах с одним SNP (кривая 2), но и при его комбинации с 3 мкМ YC-1 (кривая 4). Однако, в присутствии 1 нМ изатина различие между активностью рГЦ, стимулированной комбинацией SNP + YC-1 и одним SNP (рис 2а, кривые 4 и 2), не только остается статистически значимым ( $p < 0,001$ ), но и определенно меньше ( $p < 0,02$ ), чем без изатина (рис. 2а, кривые 3 и 1).

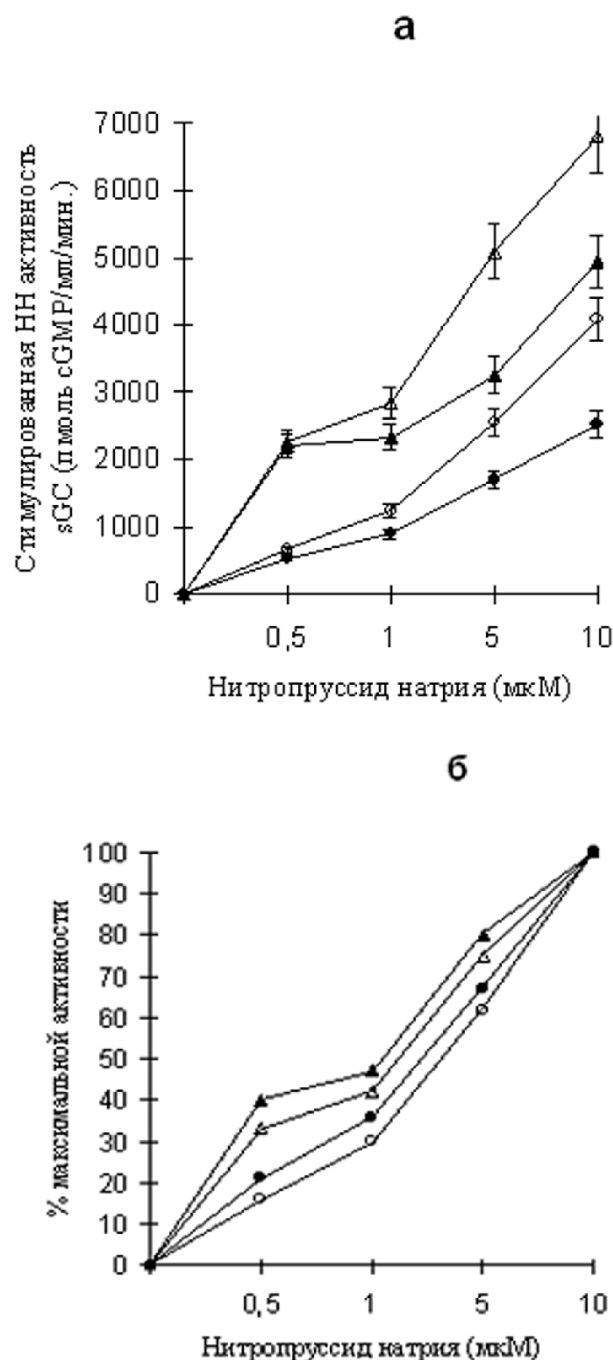


Рисунок 2.

Торможение индуцированной SNP активации растворимой гуанилатциклазы (pГЦ) тромбоцитов человека и снижение синергичного увеличения стимуляции фермента в присутствии YC-1 изатином.

а) увеличивающиеся концентрации NO-донора (SNP) добавлены в отсутствие (кривая 1(○)) или в присутствии 1 нМ изатина (кривая 2(●)), и в присутствии 3 мкМ YC-1 (кривая 3(△)) или 3 мкМ YC-1 после добавления 1 нМ изатина (кривая 4(▲)).

Ордината: стимулированная SNP активация pГЦ (пмоль cGMP/мг/мин).

б) влияние 1 нМ изатина на величины  $EC_{50}$  концентрационных кривых зависимости активации pГЦ от концентрации NO-донора в отсутствие (кривая 1(○)) или в присутствии 1 нМ изатина (кривая 2(●)) и в присутствии 3 мкМ YC-1 (кривая 3(△)) или 3 мкМ YC-1 после добавления 1 нМ изатина (кривая 4(▲)).

Ордината: % максимальной активности; абсцисса: концентрация SNP в пробе (мкМ).

Синергичное усиление активации рГЦ NO-донорами в присутствии YC-1 обусловлено увеличением сродства железа гема к NO; это приводит к сдвигу концентрационной кривой зависимости активации рГЦ от концентрации NO-донора [18, 19]. Данные, представленные на рисунке 2б, показывают, что изатин не влиял на величину  $EC_{50}$  (концентрация, равная половине максимальной, вызывающей наибольшее стимулирование активности рГЦ) активации рГЦ одним нитропруссидом натрия (3,5 и 3,0 мкМ без и в присутствии изатина, соответственно), или SNP в комбинации с YC-1 (1,7 и 1,4 мкМ без, и в присутствии изатина, соответственно). Это предполагает отсутствие конкурентных отношений между YC-1 и изатином.

Для того чтобы оценить возможность участие железа гема в связывании с изатином мы исследовали взаимодействие  $Fe^{2+}$  восстановленного гема с изатином. Рисунок 3 показывает существование характерного пика при 386 нм для гема в 1 М растворе бикарбоната натрия. Добавление дитионита натрия приводит к восстановлению  $Fe^{3+}$  гема в  $Fe^{2+}$ , что приводит к появлению нового пика при 395 нм. Добавление 2 М изатина вызывало резкое снижение интенсивности этого пика (с 0,267 до 0,239). Это указывает (по крайней мере качественно) на возможность взаимодействия изатина с  $Fe^{2+}$  гема.

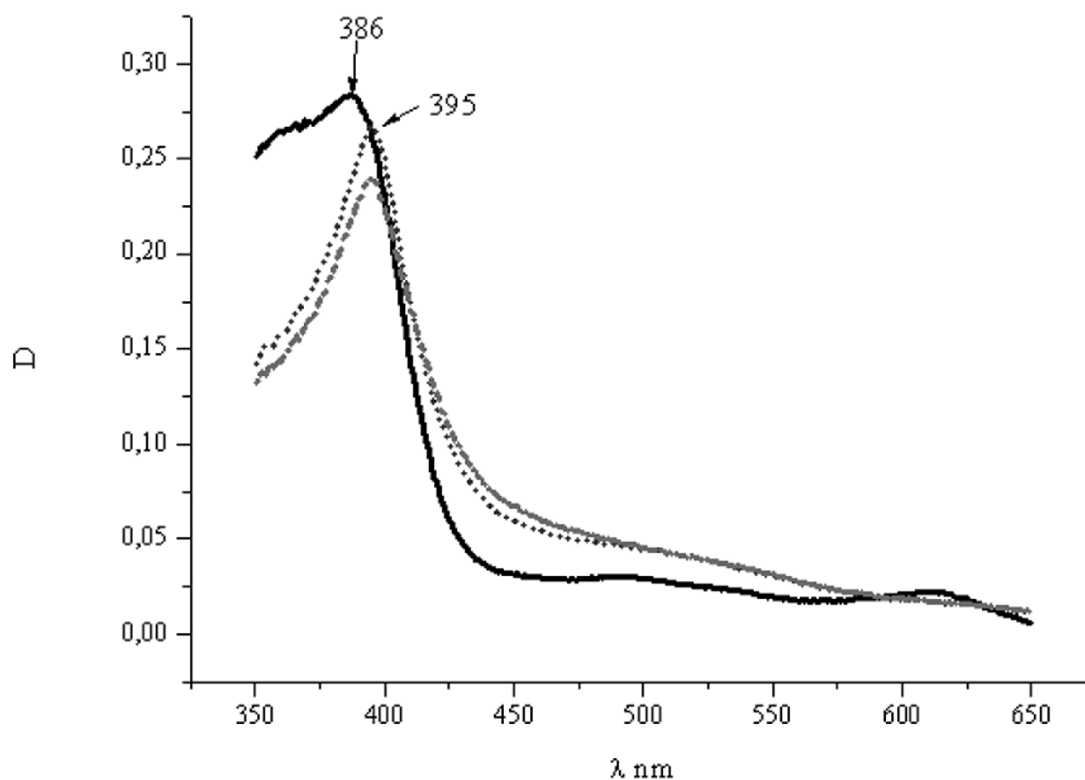


Рисунок 3.

УФ-видимый спектр гема. Влияние изатина на спектр восстановленного гема.

Спектры: гема (—), гема, восстановленного дитионитом натрия до (•••) и после добавления изатина (- - -). Данные получены на спектрофотометре Termorectoric Helias α. 0,2 мМ гемин в 1 М растворе бикарбоната натрия показывал характерный пик при 386 нм. Добавление дитионита натрия (конечная концентрация 23 мМ) восстанавливало  $Fe^{3+}$  гема в  $Fe^{2+}$  и характеризовалось появлением нового пика при 395 нм. Добавление 2 мМ изатина вызывало снижение интенсивности этого пика (с 0,267 до 0,239).

## ИНГИБИРОВАНИЕ ИЗАТИНОМ NO-ЗАВИСИМОЙ АКТИВАЦИИ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ

Известно, что ODQ (1-Н [1,2,4-оксадиазол [4,3- $\alpha$ ] хиноксалин-1) является гем-зависимым ингибитором активации рГЦ NO-донорами [20]. Данные таблицы 2 показывают, что ODQ вызывает концентрационно-зависимое торможение рГЦ, и в присутствии 10 нМ изатина наблюдается незначительное увеличение этого торможения рГЦ. Это дает основание предположить, что эффекты ODQ и изатина не аддитивны.

Таблица 2. Влияние 10 нМ изатина на торможение индуцированной SNP активности рГЦ ODQ.

Добавки	- изатина	+ 10 нМ изатин
10 мкМ SNP	100%	78,2 $\pm$ 6,2%*#
10 мкМ SNP+ 3 нМ ODQ	77,4 $\pm$ 6,2%	68,1 $\pm$ 6,1%*
10 мкМ SNP+ 30 нМ ODQ	52,5 $\pm$ 3,7%	45,3 $\pm$ 3,6%*
10 мкМ SNP+ 300 нМ ODQ	8,8 $\pm$ 0,6%	7,0 $\pm$ 0,5%*

Примечание. Результаты выражены в % от активности рГЦ, стимулированной 10 мкМ SNP (1256 $\pm$ 88 пмоль сGMP/мин/мг) и принятой за 100%. \* - Статистическая достоверность эффекта изатина по отношению к контролю (10 мкМ SNP); # - Статистическая достоверность торможения рГЦ ODQ + 10 нМ изатином.

**ОБСУЖДЕНИЕ.** Представленные в настоящей работе результаты подтверждают колоколообразный характер торможения изатином стимулированной NO (но не базальной) активности рГЦ [7]; в диапазоне концентраций изатина от 1 до 100 нМ интенсивность торможения остается примерно на одном и том же уровне (38, 46 и 43%, соответственно) и затем снижается при более высоких концентрациях (до 33 и 19% при 1 и 10 мкМ, соответственно) (рис. 1). Мы также показали, что 1 нМ изатин вызывал примерно такое же торможение рГЦ, стимулированной и другими NO-донорами (табл. 1). Это дает основание предположить, что наблюдаемый феномен, очевидно, связан с непосредственным взаимодействием изатина с NO-активированным ферментом. Колоколообразный характер торможения изатином NO-активированной рГЦ (рис. 1) может быть обусловлен взаимодействием изатина с несколькими (регуляторными?) участками на молекуле фермента. Известно, что каталитически активная рГЦ является гетеродимером, состоящим из большей –  $\alpha$ -субъединицы и меньшей, гем-связывающей,  $\beta$ -субъединицы [21]. Существование на молекуле растворимой гуанилатциклазы нескольких потенциальных мишеней взаимодействия традиционно привлекает большое внимание. Подобными центрами могут быть гем-связывающий домен (в частности, железо гема), являющийся мишенью для NO и специфического ингибитора ODQ, а также аллостерический центр связывания YC-1. Хотя аллостерический активатор YC-1 взаимодействует с аллостерическим участком, расположенным в N-концевой области  $\alpha$ -субъединицы [22], существуют веские доказательства того, что YC-1 может взаимодействовать и с каталитическим центром рГЦ [23].

В наших экспериментах ингибиторные эффекты изатина и ODQ не являются аддитивными (табл. 2). Это дает основание предположить, что изатин может взаимодействовать с гем-связывающим доменом (возможно, с железом гема). Действительно, изменения в спектре восстановленного гема, вызванные изатином (рис. 3) показывают, что такая возможность действительно существует. Однако, следует отметить, что эти спектральные изменения наблюдаются при высоких концентрациях изатина. В любом случае представленные



в настоящей работе данные, вместе с ранее полученными данными об отсутствии ингибиторного эффекта изатина на гем-независимую активацию рГЦ протопорфирином IX [7], дают основание предположить участие гем-связывающего домена во взаимодействии с изатином.

Изатин также ингибировал активацию рГЦ аллостерическим регулятором YC-1. Поскольку изатин тормозил активацию рГЦ как SNP так и YC-1, можно предположить, что он способен взаимодействовать с обоими центрами, ответственными за связывание SNP и YC-1. Ранее было показано, что изатин ингибирует активацию гуанилатциклазы А-рецептора натрийуретических пептидов NPR-A, действуя на рецепторный домен и на регуляторный киназо-подобный домен [5, 24]. Когда рецепторный и регуляторный участки заняты их лигандами (ANP и АТР, соответственно) NPR-A проявляет меньшую чувствительность к изатину.

Присутствие YC-1 вызывало некоторое снижение чувствительности стимулированной SNP рГЦ к изатину (рис. 2а). По аналогии с влиянием изатина на NPR-A [25], мы полагаем, что чувствительность рГЦ к изатину также зависит от восприимчивости более чем одного центра (железо гема или YC-1) к этому регулятору. Поскольку изатин не влиял на величины  $EC_{50}$  для активации рГЦ одним SNP или в комбинации с YC-1, взаимодействие изатина с аллостерическим участком YC-1 и железом гема не является конкурентным. Последнее предполагает, что изменения в комплексной регуляции рГЦ могут быть связаны с взаимодействием изатина с несколькими центрами. Мы не можем исключить взаимодействие изатина с двумя регуляторными участками рГЦ.

Недавно проведенное исследование кристаллов MAO Б (первой идентифицированной молекулярной мишени изатина) свидетельствует о возможности множественного взаимодействия этого фермента с изатином, которое включает многочисленные вандерваальсовы контакты между изатином и аминокислотными остатками, расположенными в недоступной для растворителя гидрофобной субстратной полости [6]. Недавно появилось сообщение о взаимодействии двух аналогов изатина: 1-метилизатин и 1-фенилизатин с гемоглобином человека, которое сопровождалось конформационными изменениями в четвертичной структуре этого белка [25].

Таким образом, представленные в настоящей работе данные показывают, что торможение NO-стимулированной активности рГЦ изатином, очевидно, определяется взаимодействием изатина с несколькими участками на молекуле фермента включая гем-связывающий домен (железо гема?) и связывающий YC-1 центр и одновременная (синергичная) активация рГЦ у этих центров снижает чувствительность фермента к эндогенному регулятору.

Возможно, что одновременное взаимодействие изатина с несколькими связывающими участками и объясняет колоколообразную кривую торможения рГЦ увеличивающимися концентрациями изатина.

Данная работа частично поддержана грантом РФФИ (№ 09-04-00462-а).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Medvedev A.E., Clow A., Sandler M. (1996) *Biochem. Pharmacol.*, **52**, 385-391.
2. Medvedev A.E., Igosheva N., Crumeyrolle-Arias N., Glover V. (2005) *Stress*, **8**, 175-183.
3. Medvedev A.E., Buneeva O.A., Glover V. (2007) *Biological Targets & Therapeutics*, **2**, 1-12.
4. Glover V., Medvedev A.E., Sandler M. (1995) *Life Sci.*, **57**, 89-94.
5. Medvedev A.E., Sandler M., Glover V. (1998) *Life Sci.*, **62**, 2391-2398.
6. Binda C., Li M., Hubaler F., Restelli N., Edmondson D.E., Mattevi A. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 9750-9755.

## ИНГИБИРОВАНИЕ ИЗАТИНОМ NO-ЗАВИСИМОЙ АКТИВАЦИИ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ

7. *Medvedev A.E., Bussygina O.G., Pyatakova N.V., Glover V., Severina I.S.* (2002) *Biochem. Pharmacol.*, **63**, 763-766.
8. *Ignarro L.J., Napoli C., Loscalzo J.* (2002) *Circ. Res.*, **90**, 21-28.
9. *Kotz A.Y., Martin E., Sharina I.G., Murad F.* (2009) *Hand Exp. Pharmacol.*, **191**, 1-14.
10. *Hobbs A.J.* (2002) *Br. J. Pharmacol.*, **136**, 637-640.
11. *Stasch J.P., Hobbs A.J.* (2009) *Hand Exp. Pharmacol.*, **191**, 277-308.
12. *Чирков Ю.Ю., Тыщук И.А., Белушкина Н.Н., Северина И.С.* (1987) *Биохимия*, **52**, 956-963.
13. *Garbers D.S., Murad F.* (1979) *Adv.Cycl. Nucl. Res.*, **10**, 57-67.
14. *Bradford H.M.* (1976) *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
15. *Бусыгина О.Г., Пятакова Н.В., Хропов Ю.В., Овчинников И.В., Махова Н.Н., Северина И.С.* (2000) *Биохимия*, **65**, 457-462.
16. *Schmidt K., Schrammel A., Koesling D.* (2001) *Molec. Pharmacol.*, **59**, 220-224.
17. *Friebe A., Koesling D.* (2003) *Circulation Res.*, **93**, 96-106.
18. *Russwurm M., Mergia M., Mullershausen E., Koesling D.* (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 24883-24888.
19. *Behrends S.* (2003) *Current Medical Chemistry*, **10**, 291-301.
20. *Bellamy T.C., Cartwaite J.* (2002) *Br. J. Pharmacol.*, **136**, 95-103.
21. *Evgenov O.V., Pacher P., Schmidt P.M., Hasko G., Schmidt H.H.H., Stasch J.P.* (2006) *Reviews Drug Discovery*, **5**, 755-768.
22. *Yazawa S., Tsichiya H., Hori H., Makino R.* (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 21763-21770.
23. *Lamothe M., Chang F.J., Balashova N., Shirokov R., Beuve A.* (2004) *Biochemistry*, **43**, 3039-3048.
24. *Medvedev A.E., Sandler M., Glover V.* (1999) *Eur. J. Pharmacol.* **384**, 239-241.
25. *Mandal P., Ganguli T.* (2009) *J. Phys.Chem. B*, **113**(45), 14904-14913.

Поступила 24. 08. 2010.

## INHIBITION OF NO-DEPENDENT SOLUBLE HUMAN PLATELET GUANYLATE CYCLASE BY ISATIN

*I.S. Severina, A.Yu. Schegolev, G.V. Ponomarev, A.E. Medvedev*

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Pogodinskaya, 10, Moscow, 119121 Russia; fax: +7 499 2450857; e-mail: professor57@yandex.ru

Isatin (indole-dione-2,3) is an endogenous indole that exhibits a wide spectrum of biological and pharmacological activities. Physiologically relevant concentrations of isatin (ranged from 1 nM to 10 M) did not influence basal activity of soluble human platelet guanylate cyclase (sGC), but caused a bell-shaped inhibition of the NO-activated enzyme. Inhibition of the NO-dependent activation by isatin did not depend on a chemical nature of the NO donors. The inhibitory effects of ODC (a heme-dependent inhibitor of sGC) and isatin were non-additive suggesting that the inhibitory effect of isatin may involve the heme binding domain (possibly heme iron) and experiments with hemin revealed some isatin-dependent changes in its spectrum. Isatin also inhibited sGC activation by the allosteric activator YC-1. It is suggested that the bell shaped inhibition of the NO-dependent activation of sGC by isatin may be attributed to complex interaction of isatin with the heme binding domain and the allosteric YC-1-binding site of sGC.

**Key words:** guanylate cyclase, nitric oxide (NO), isatin.