

ИЗАТИН: ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ В ФУНКЦИОНАЛЬНОМ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ НАТРИЙУРЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ И МОНОАМИНОВ.

В.Г.ГЛОВЕР, А.Е.МЕДВЕДЕВ*, М.САНДЛЕР

Госпиталь Королевы Шарлотты и Челси, Лондон, Великобритания (Queen Charlotte's and Chelsea Hospital, Goldhawk Road, London W6 OXG, UK) Факс 44 181 741 1948;

*Институт Биомедицинской Химии, Российская Академия Медицинских Наук, Москва, 119832 Россия; факс: 7 095 245 0857

Изатин - эндогенное вещество, обнаруженное недавно в тканях и биологических жидкостях млекопитающих. Он неравномерно распределен в различных отделах мозга крысы; самая высокая концентрация изатина обнаружена в гиппокампе - 0,1 мг/г. Происхождение изатина и пути его метаболизма остаются неясными. *In vitro*, изатин избирательно тормозит активность моноаминоксидазы (МАО) В (IC_{50} 3-8 мкМ, K_i ~20 мкМ) и рецепторное связывание натрийуретического фактора предсердий (ANP) (IC_{50} , 0,4 мкМ). Введение проконвульсанта пентилентетразола, вызывающего развитие судорог у крыс, приводит к увеличению уровня изатина в мозге. Низкие дозы изатина обладают анксиогенным действием на различных экспериментальных моделях, высокие дозы обладают седативным и антиконвульсивным действием. Введение изатина животным также увеличивает уровень моноаминов в мозге и уменьшает суточную экскрецию мочи.

Ключевые слова: моноаминоксидаза, натрийуретические пептиды, ингибиторы, изатин, стресс, возбуждение и беспокойство, функциональный антагонизм

Введение. Изатин (индолдион-2,3) давно известен как фармакологический агент, оказывающий различные метаболические и поведенческие эффекты *in vitro* и *in vivo*. Он был обнаружен в первой половине прошлого века в качестве продукта окисления красителя индиго [1, 2]. В биологических объектах, изатин был обнаружен в 1940, в моче кроликов, которым скармливали о-нитрофенилглиоксиловую кислоту [3]. Недавно, в 1988, изатин был идентифицирован у здоровых людей как компонент эндогенного ингибитора моноаминоксидазы (МАО) трибулина [4]. Хотя в настоящее время и становится очевидным, что изатин не может объяснить всей биологическую активности, свойственной трибулину (см. обзоры [5,6]), в некоторых тканях и жидкостях организма изатин можно рассматривать в качестве МАО В-ингибиторного компонента трибулина, например, в спинномозговой жидкости (Medvedev, Przyborowska, Halket, Sandler, Glover, неопубликованные данные; см. Табл. 1). Количественно изатин определяют методом газовой хроматографии-масс спектрометрии [7]. Совсем недавно был разработан метод иммуноферментного определения, пригодный для анализа изатина в моче [8], но его применимость для определения тканевого содержания этого вещества пока не проверена.

Изатин неравномерно распределен в различных отделах мозга крысы [9]. Иммуногистохимические данные указывают на локализацию в определенных специфических клетках, особенно в гиппокампе, мозжечке и сосудистой оболочке (choroid plexus) (A.Clow, неопубликованное наблюдение; см. также [5]). Концентрация изатина в гиппокампе около 0,1 мг/г, что соответствует концентрации 1 мкМ. Сравнение содержания изатина в моче

обычных и стерильных (germ-free) крыс выявило существенное снижение его уровня в моче стерильных животных. Однако содержание изатина в мозге животных этих групп

Таблица 1. Содержание изатина и трибулина в спинномозговой жидкости (СПЖ) человека

Содержание изатина	42 ± 4,6 нг/мл
Концентрация изатина в среде определения трибулина СПЖ	1,2 ± 0,2 мкМ
Ингибирование MAO В трибулином СПЖ	23,9 ± 2,9 %
Ингибирование MAO В 1 мкМ изатином	23 ± 3,8%
10 мкМ изатином	57±2%

Приведены данные 3-8 независимых экспериментов.

животных существенно не различались [10]. Это свидетельствует в пользу эндогенного происхождения тканевого изатина, в то время как микрофлора кишечника, очевидно, вносит решающий вклад в образование изатина мочи.

Метаболизм. Почти ничто не известно о синтезе изатина и его возможных биологических предшественниках. Давние и довольно косвенные данные предполагают, что изатин может образовываться в ходе микросомального окисления индола [11]. Нагрузка животных введением фенилаланина, тирозина или триптофана незначительно (и статистически незначимо) увеличивала уровень изатина в мозге [12]. Введение проконвульсанта пентилентетразола приводило к увеличению изатина в мозге, но не в печени [12, 13]. При введении *in vivo* изатин легко проникает через гемато-энцефалический барьер в мозг; доза 50 мг/кг приводила к увеличению уровня изатина в мозге до 9 мг/г [12]. Таким образом возможно, что изатин синтезируется в других органах и тканях и транспортируется в мозг. *In vitro* изатин метаболизируется ксантинооксидазой в присутствии ксантина; другой генератор перекиси водорода, уратоксидаза + мочева кислота, был неэффективен [14].

Ингибирование моноаминоксидазы и влияние на уровень моноаминов мозга.

Несколько групп исследователей показали, что изатин - селективный ингибитор MAO В [4; 15-17] с кажущейся константой ингибирования около 3-20 мкМ. Ингибирование MAO А появляется при более высоких концентрациях (K_i для фермента крысы 60-70 мкМ). Высокая обратимость эффекта изатина на MAO [17], по-видимому, может объяснить, почему некоторые авторы не смогли обнаружить уменьшение активности MAO в тканевых гомогенатах и митохондриях, выделенных после введения изатина животным [18]. Высокие дозы изатина (80-200 мг/кг) обладают антиконвульсивным эффектом на различных экспериментальных моделях таких как электроконвульсивный шок [19], вызванные пентилентетразолом конвульсии [20] и аудиогенная эпилепсия [21-24]. Это действие изатина может быть обусловлено торможением MAO А. У крыс с наследственной аудиогенной эпилепсией антиконвульсивное действие изатина наблюдали при дозе 80 мг/кг. Оно было сопоставимо с эффектом селективного ингибитора MAO А короткого действия пиразидола [25-26].

Введение изатина (10-300 мг/кг) вызывает увеличение содержания нейромедиаторов-моноаминов в мозге (см. табл. 2). Эффект, по-видимому, зависит от дозы и времени после введения изатина. Возможно также, что разные линии крыс характеризуются неодинаковой чувствительностью к изатину. Более высокие дозы, по-видимому, тормозят MAO А и MAO В, что может служить возможным объяснением увеличения уровней норадреналина и 5-гидрокситриптамина (5-НТ), которые преимущественно метаболизируются в мозге крысы

МАО А. Однако, эти результаты довольно сложны и вариабельны при высокой дозе изатина и зависят от области мозга, в которой измеряли содержание моноаминов (табл. 2). Кроме того, большинство данных свидетельствует о том, что увеличение содержания 5-НТ не сопровождалось соответствующим уменьшением 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-НИАА), чего можно ожидать при функциональном торможении МАО [18, 27-29]: содержание 5-НИАА остается неизменным. В отличие от влияния на целом мозге, введение изатина не влияло на содержание 5-НТ и 5-НИАА в шишковидной железе [30].

Таблица 2. Влияние изатина на содержание моноаминов в мозге (по [5] с изменениями)

Амин	Доза изатина мг/кг	Время после введения, мин	Линия крыс	Область мозга	Эффект
Серотонин	80	60	Спрэгг-Доули	гипоталамус	+60%
				передняя кора	+37%
Серотонин	80	120	Фишер 344N	цельный мозг	+15%
Серотонин	10	30	Чалз Форстер (альбиносы)	цельный мозг	+33%
	10	60		цельный мозг	+77%
	20	15		цельный мозг	+96%
	20	60		цельный мозг	+97%
Дофамин	20	15	Вистар Киото	цельный мозг	+55%
	20	30		цельный мозг	+81%
	20	60		цельный мозг	+60%
Серотонин	50	120	Вистар Киото	кора	+47%
	50	120		гипоталамус	+18%
	200	120		кора	+329%
	200	120		гипоталамус	+82%
Норадреналин	50	120	Вистар Киото	кора	+27%
	50	120		гипоталамус	-34%
	200	120		кора	+428%
	200	120		гипоталамус	-46%
Серотонин	300	120	Альбиносы	цельный мозг	+27%
	300	360		цельный мозг	+15%

Исследование других биологических мишеней изатина: взаимодействие с рецепторами натрийуретического фактора предсердий.

Помимо ингибирования активности МАО, изатин тормозит также связывание центральных бензодиазепиновых рецепторов с относительно высокой IC_{50} (около 120 мкМ [4]). Торможение других биологических процессов, таких как транспорт глюкозы и аминокислот [32], активность кислой [33] и щелочной фосфатазы [34], ацетилхолинэстеразы и Na, K-АТФазы [18] наблюдалось при более высоких концентрациях, с величинами IC_{50} в миллимолярном диапазоне.

При исследовании эффекта 10 мкМ изатина на более чем 50 рецепторов различных гормонов и нейромедиаторов оказалось, что наиболее сильно (на 96%) изатин тормозил только связывание натрийуретического фактора предсердий (atrial natriuretic peptide, ANP) [35]. В меньшей степени 10 мкМ изатин тормозил (на 20-40 %) также некоторые другие рецепторы (Таблица 3). Величина IC_{50} для торможения изатином рецепторного связывания ANP - 0,4 мкМ - соответствует физиологическому диапазону концентраций изатина в мозге [35]. Торможение изатином связывания ANP характеризовалось выраженной отрицательной

Таблица 3. Влияние 10 мкМ изатина на связывание на рецепторное связывание основных регуляторов *in vitro* (по [35] с изменениями)

Ингибирование менее 20%	Ингибирование 20-40%	Ингибирование более 50%
аденозиновые рецепторы (1 и 2) адренорецепторы ($\alpha 1$, $\alpha 2$, β) рецепторы дофамина (D1, D2) ГАМК-А, ГАМК-В, рецепторы гистамина* (H1, H2, H3) мускариновые рецепторы (M-1, M-3) серотониновые рецепторы (5HT-1, 5- HT2, 5-HT3), рецепторы ангиотензина II (2 тип) вазопрессин-1 фактор роста нервов нейротензин соматостатин вазоактивный пептид кишечника ионные каналы (хлоридный, натриевый, калиевый, кальциевый) форсколин лейкотриены B4 и D4 тромбоксан A2	калиевые каналы фактор роста эпидермиса NMDA AMPA рецепторы дофамина D4 инозитолтрифосфат моноаминоксидаза А протеинкиназа С мускариновые рецепторы (M-2) стрихнин-чувствительные рецепторы глицина	моноаминоксидаза В натрийуретический фактор предсердий

кооперативностью (с коэффициентом Хилла 0,28), что свидетельствует в пользу сложного механизма этого эффекта, а не простой конкуренции.

Изатин дозозависимо ингибировал также ANP-стимулируемую гуанилатциклазу мембран мозга, сердца, и почек крысы, уменьшая образование cGMP [35]. Эффект был слабее при более высоких концентрациях ANP. Однако, взаимодействия не были чисто конкурентными.

Анксиогенные и седативные эффекты: данные в пользу функционального антагонизма между ANP и изатином *in vivo*.

Изатин в низких дозах (10-20 мг/кг) оказывал анксиогенное действие, обнаруженное на ряде [28,36], но не на всех экспериментальных моделях на животных [37]. Эти эффекты были схожи с действием иохимбина и пентилентетразола [12]. Увеличение дозы изатина до 50 мг/кг приводит к противоположному, седативному эффекту, показанному для грызунов и обезьян [28,37]. Анксиогенное действие изатина на мышах уменьшали неселективные антагонисты 5-HT рецепторов или селективные антагонисты 5-HT₃ рецепторов, антагонист дофаминовых D₂ рецепторов, пимозид, а также серотонинергический нейротоксин, 5,6-дигидрокситриптамин [28]. Флуоксетин - ингибитор обратного нейронального захвата 5-HT - потенцировал анксиогенное влияние субоптимальной дозы изатина [28]. Все эти результаты указывают на взаимодействие между моноаминами и изатином в химических механизмах анксиогенного эффекта.

В отличие от моноаминов и изатина внутрижелудочковое введение ANP в мозг вызывало анксиолитический эффект [38]. ANP в введенный в желудочки мозга в дозах 0,2-0,5 мкг/крысу вызвал существенный анксиолитический эффект, сопоставимый с эффектом лоразепала (500 мкг/кг), в ряде экспериментальных моделей (тест открытого поля и т.д.). На анксиолитический эффект ANP не влиял флумазенил - антагонист

бензодиазепиновых рецепторов флумазенил. Субанксиогенная доза изатина (10 мг/кг) предотвращала анксиолитическое действие ANP [38]. Анксиогенные дозы изатина также тормозили облегчающие память эффекты вводимого в мозг крысам ANP [39]. Все это предполагает существование функционального антагонизма между ANP и изатином *in vivo*.

Влияние изатина на экскрецию воды.

Натрийуретические пептиды участвуют в регуляции экскреции воды и натрия, а также в контроле артериального давлением [40, 41]. Открытие эндогенного лиганда, который эффективно влияет на рецепторное связывание ANP и тормозит внутриклеточную передачу (сGMP) может представлять действие нового модулятора этих функций *in vivo*. Введение изатина крысам вызывает снижение суточного объема мочи и содержания натрия в ней [42] (рассчитанное на экскретируемый объем мочи, ВГ, АМ, МС), что может указывать на функциональное торможение изатином эффекта эндогенного ANP на водный баланс. Однако, это действие наблюдалось при довольно высокой дозе изатина (50 мг/кг). Анксиогенная доза (20 мг/кг) была неэффективной [42]. Хроническое введение изатина (20 или 50 мг/кг) в течение 4 недель не изменяло объем суточной мочи у WKY крыс (экскрецию натрия не исследовали) [43]. У пациентов с нервным перееданием (*bulimia nervosa*), -заболевание, сопровождающееся нарушением водно-солевого баланса, - уровень изатина в спинномозговой жидкости был вдвое выше, чем у здоровых добровольцев [44].

Возможная роль изатина во взаимосвязи между моноаминами и натрийуретическими пептидами.

В настоящее время имеется достаточно данных, свидетельствующих в пользу антагонизма между эффектами ANP и моноаминов. ANP тормозит освобождение катехоламинов из мозгового слоя надпочечников и в мозге, является функциональным антагонистом ангиотензина II, который потенцирует выброс катехоламинов [45-48]. Открытие эндогенного вещества, которое может ингибировать MAO и рецепторное связывание ANP и внутриклеточную передачу его сигнала предполагает возможность более прямых регуляторных взаимоотношений между системами натрийуретических пептидов и моноаминов. Одновременное торможение ключевого фермента обмена метаболизма (MAO) и экскреции натрия может представлять новый регуляторный механизм.

Собственные данные были получены при финансовой поддержке Королевского Общества Великобритании и Российского Фонда Фундаментальных Исследований (N 97-04-48320).

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Erdmann O.L. (1841) J. Prakt. Chem. 24, 1-18.
- 2 Laurent A. (1842) J. Prakt. Chem. 25, 430-474.
- 3 Bohm F. (1940) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 265, 210-221.
- 4 Glover, V., Halket, J. M., Watkins, P. J., Clow, A., Goodwin, B. L., Sandler, M. (1988). J. Neurochem 51, 656-659.
- 5 Medvedev A.E., Clow A., Sandler M., Glover V. (1996) Biochem. Pharmacol. 52, 385-391.
- 6 Medvedev A.E. (1996) Вопр. мед. химии 42, 95-103.
- 7 Halket, J. M., Watkins, P. J., Przyborowska, A., Goodwin, B. L., Clow, A., Glover, V., and Sandler, M. (1991) J Chromatog Biomed Appl: 562, 279-287.
- 8 Pang, F.-Y., Hucklebridge, F. H., Forster, G., Tan, K., & Clow, A. (1996) Stress Med. 12, 35-42.

- 9 *Watkins, P., Clow, A., Glover, V., Halket, J., Przyborowska, A., and Sandler, M.* (1990). *Neurochem Int* 17: 321-323.
- 10 *Sandler, M., Przyborowska, A., Halket, J. M., Watkins, P., Glover, V., and Coates, M. E.* (1991). *J Neurochem* 57: 1074-1075.
- 11 *King L., Parke, D.V., and Williams, R.T.* (1966) *Biochem. J.* 98, 266-277.
- 12 *Bhattacharya, S. K., Clow, A., Przyborowska, A., Halket, J., Glover, V., and Sandler, M.* (1991) *Neurosci. Lett.* 132, 44-46.
- 13 *Clow, A., Davidson, J., Glover, V., Halket, J. M., Milton, A. S., Sandler, M., and Watkins, P.* (1989) *Neurosci. Lett.* 107, 327-330.
- 14 *Medvedev A.E., Halket J., and Glover V.* (1994) *Med. Sci. Res.* 22, 713-714.
- 15 *Medvedev A.E., Goodwin, B.L., Clow, A., Halket J., Glover V., and Sandler M.* (1992) *Biochem. Pharmacol.* 44, 590-592.
- 16 *Hamaue, N., Minami, M., Kanamaru, Y., Togashi, M., Monma Y., Ishikura M., Mahara R., Yamazaki, N., Togashi, H., Saito H., and Parvez S.H.* (1992) *Biogenic Amines*, 8, 401-412.
- 17 *Medvedev A.E., Ivanov, A.S., Kamyshanskaya, N. S., Kirkel, A.Z., Moskvitina T.A., Gorkin V.Z., Li N-Y., and Marshakov V.Yu.* (1995) *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 36, 113-122.
- 18 *Kumar R., Bansal R.C., and Mahmood A.* (1994) *Indian J. Med. Res.* 100, 246-250.
- 19 *Sareen K., Kohli R.P., Amma, M.K.P., and Gujral M.L.* (1962) *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, 6, 87-89.
- 20 *Muller, M.* (1962) *Med. Exp.* 7, 155-160.
- 21 *Chocholova, L., and Kolinova M.* (1979) *Physiol. Bohemosl.* 28, 495-502.
- 22 *Chocholova, L., and Kolinova M.* (1981) *Physiol. Bohemosl.* 30, 129-137.
- 23 *Medvedev A.E., Gorkin, V.Z., Fedotova, I.B., and Semiokhina, A.F.* (1994) *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 71 (Suppl.) 400.
- 24 *Medvedev A.E., Gorkin, V.Z., Fedotova I.B., Semiokhina A.F., Sandler, M. and Glover V.* (1994) *Med. Sci. Res.*, 22, 555-556.
- 25 *Medvedev A., Gorkin, V., Shvedov, V., Fedotova O., Fedotova I., and Semiokhina A.F.* (1992) *Drug. Invest.*, 4, 501-507.
- 26 *Medvedev A.E., Kirkel, A.Z., Kamyshanskaya, N.S., Axenova, L.N., Moskvitina, T.A., Gorkin, V.Z., Andreeva, N.I., Golovina, S.M., and Mashkovsky, M.D.* (1994) *Biochem. Pharmacol.* 47, 303-308.
- 27 *McIntyre, I.M., Norman, T.R.* (1990) *J. Neural Transm. [Gen.Sect.]*, 79, 35-40.
- 28 *Bhattacharya, S. K., Acharya, S. B.* (1993). *Biogenic Amines*, 9: 453-463.
- 29 *Hamaue, N., Minami, M., Kanamaru, Y., Ishikura, M., Yamazaki, N., Saito, H., and Parvez, S.H.* (1994). *Biogenic Amines*: 10, 99-110.
- 30 *Yuwiler, A.* (1990). *Neurochem Res* 15: 95-100.
- 31 *Glover, V. and Sandler M.* (1993) in *Monoamine Oxidase Basic and Clinical Aspects*, Eds H Yasuhara, S.H. Parvez, K. Oguchi, M.Sandler, and T. Nagatsu VSP, Utrecht, pp.61-71.
- 32 *Patil S.D., Prakash, K., and Hedge, S.N.* (1985) *Indian J. Biochem. Biophys.*, 22, 249-251.
- 33 *Singh, B., Sharma, R. M., Sareen, K.N., and Sohal, M.S.* (1977) *Enzyme*, 22, 256-261.
- 34 *Kumar, P.* (1979) *Enzyme*, 24, 152-157.
- 35 *Glover, V., Medvedev, A., and Sandler, M.* (1995). *Life Sci.*, 57: 2073-2079.
- 36 *Bhattacharya S.K., Mitra, S.K., and Acharya, S.B.* (1991) *J. Psychopharmacol.* 5, 202-206.
- 37 *Abel E.L.* (1995) *Physiol. Behav.*, 57, 611-613.
- 38 *Bhattacharya, S. K., Chakrabarti, A., Sandler, M., and Glover, V.* (1996). *Neuropsychopharmacology*, 15: 199-206.

- 39 *Bhattacharya S.K. Chakrabarti A., Sandler M., and Glover V. (1996) Med. Sci. Res. 24, 299-301.*
- 40 *Wilkins, M.R., Nunez, D.J., and Wharton, J. (1993) J. Endocrinol., 137, 347-359.*
- 41 *Nicholls, M.G. (1994) J. Int. Med. 235, 507-514*
- 42 *Hota, D., and Acharya, S. B. (1994). Indian J. Exp. Biol. 32, 710-717.*
- 43 *Hamaue, N., Minami, M., Hirafuji, M., Monma, Y., Yamazaki, N., Togashi, H., Saito, H., and Parvez, S.H. (1996) Biogenic Amines 12, 395-405.*
- 44 *Brewerton, T. D., Zealberg, J. Z., Lydiard, R. B., Glover, V., Sandler, M., and Ballenger, J. C. (1995). Biol Psychiat 37: 481-483.*
- 45 *Wuttke, W., Dietrich, M., and Jarry, H. (1992) in Stress: Neuroendocrine and Molecular Approaches (Eds. Kvetnansky, R., MacCarty, R., and Axelrod J.), Gordon and Breach, New York, pp. 171-179.*
- 46 *Peng, N., Oparil, S., Meng, Q.C., and Wyss J.M. (1996) J. Clin. Invest. 98, 2060-2065.*
- 47 *Galli S.M., and Phillips, M.I. (1996) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 213, 128-137.*
- 48 *Matsukawa T., and Mano T. (1996) Amer. J. Physiol. - Regulat. Integr. Comp. Physiol. 40, R464-R471.*

ISATIN; POSSIBLE ROLE IN THE FUNCTIONAL INTERACTION OF NATRIURETIC PEPTIDES AND MONOAMINES.

VIVETTE GLOVER, A.E.MEDVEDEV, M. SANDLER

Queen Charlotte's and Chelsea Hospital, Goldhawk Road, London W6 OXG, UK;
Fax 44 181 741 1948;
Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences,
Moscow, 119832 Russia; fax: 7 095 245 0857

Isatin is an endogenous compound recently discovered in mammalian tissues and body fluids. It has a distinct distribution in rat brain, with a highest concentration, in the hippocampus, of 0.1 µg/g. Its origin and metabolic pathways remain unclear. In vitro, isatin selectively inhibits monoamine oxidase (MAO) B (IC₅₀ 3-8 µM, K_i~20 µM) and, more potently, atrial natriuretic peptide (ANP) binding (IC₅₀, 0.4 µM). Convulsant doses of pentylenetetrazole result in increased isatin level in the brain. Small amounts of isatin are anxiogenic in rodent models, but higher doses cause sedation and possess anticonvulsant action. Isatin administration also increases monoamine levels in the brain and reduces daily urine output.

Key words: monoamine oxidase, natriuretic peptides, inhibitors, isatin, stress, anxiety, functional antagonism