

## МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 577.174.5

© Коллектив авторов

### ИССЛЕДОВАНИЕ ТКАНЕВОГО И СУБКЛЕТОЧНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ИЗАТИН-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ ПРИ ПОМОЩИ ОПТИЧЕСКОГО БИОСЕНСОРА

**Ю.Д.Иванов, Н.Г.Панова, О.В.Гнеденко, О.А.Бунеева,  
А.Е.Медведев, А.И.Арчаков**

НИИ биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича РАМН, Погодинская ул. 10,  
тел.: (095)246-1641; факс: (095)245-0857; Эл. почта: medvedev@ibmh.msk.su

Предложен метод интегративной оценки тканевого и субклеточного распределения изатин-связывающих белков. Принцип метода основан на мониторинге изменения оптических характеристик поверхности биосенсора при образовании комплексов между растворимым белком и иммобилизованным лигандом - изатином. Важным условием применения этого метода является возможность солиubilизации исследуемых субклеточных фракций детергентом (1% раствор тритона X-100). В качестве иммобилизованного лиганда использован 5-аминоизатин. Иммобилизацию осуществляли за счет образования пептидной связи между аминогруппой этого аналога изатина и активированной карбоксильной группой декстрановой подложки ячейки биосенсора. В митохондриях печени изатин-связывающие белки сосредоточены преимущественно во фракции внешних мембраны. Обработка митохондрий ацетиленовыми ингибиторами хлоргилином и депренилом в концентрации (1 мкМ), преимущественно тормозящей активность МАО А и МАО Б, соответственно, приводила к существенному уменьшению интенсивности сигнала и изменению формы кинетической кривой. Эти результаты согласуются с представлениями о том, что в митохондриях именно МАО является основной мишенью действия изатина.

Добавление обработанных раствором тритона X-100 препаратов мембранной и растворимой фракций мозга, печени, сердца и почек в кювету также приводило к появлению характерного ответа, свидетельствующего о связывании белков иммобилизованным 5-аминоизатином. В мозге, печени и сердце связывание преобладало в случае мембранных фракций, в то время как в почках связывание с изатином было выше в растворимой фракции.

**Ключевые слова:** изатин, изатин-связывающие белки, тканевое и субклеточное распределение, оптический биосенсор.

**ВВЕДЕНИЕ.** Изатин - (индолдион-2,3) - эндогенный индол, обнаруженный в тканях и биологических жидкостях млекопитающих и человека [1-4]. Низкие дозы изатина обладают анксиогенным действием, высокие - оказывают седативный и антиконвульсивный эффекты [1-3].

Количественно изатин определяют методом газовой хроматографии-масс спектрометрии [1, 2, 4]. Кроме того, разработаны иммуноферментный и ВЭЖХ- методы определения изатина в биологических жидкостях [4-7].

*In vitro* основными мишенями изатина являются моноаминоксидаза (МАО) Б [1-4] и А-рецепторы натрийуретических пептидов [8, 9]. Величина  $IC_{50}$  (0,4 мкМ) для торможения изатином рецепторного связывания натрийуретического пептида предсердий (ANP) соответствует физиологическому диапазону концентраций изатина в мозге и других тканях [1-3]. При более высокой концентрации (соответствующей верхнему физиологическому диапазону - 10 мкМ) изатин тормозит (на 20-40%) связывание лигандов с рецепторами некоторых подтипов медиаторных аминокислот, не влияя на рецепторы многих гормонов и нейромедиаторов [1-4].

Практически ничего неизвестно о том, какие рецепторы (и каких органов и тканей) связывают изатин и могут ли лиганды вышеупомянутых рецепторов, чувствительных к 10 мкМ изатину, в свою очередь тормозить связывание изатина. Идентификация тканевых рецепторов изатина позволила бы более точно очертить круг функциональную роль этого недавно открытого регулятора.

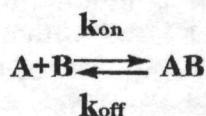
Отсутствие данных о тканевом и субклеточном распределении изатин-связывающих белков во многом обусловлено ограниченностью методических подходов. Используя изатин в качестве обратимого ингибитора МАО, защищающего этого фермент от действия необратимых механизм-активируемых ингибиторов (методические подходы экспериментов подобного рода изложены в [10]), было показано, что *in vivo* с изатином взаимодействует главным образом МАО Б [11]. Данные фармакологических экспериментов свидетельствуют о функциональном антагонизме изатина и натрийуретических пептидов [3].

В последнее время для анализа лиганд-рецепторных взаимодействий все более широкое применение получают методы, основанные на использовании оптических биосенсоров [12-20]. Их отличает высокая чувствительность. Одним из важных условий применения оптических биосенсоров является оптическая прозрачность исследуемой среды. Другим - возможность иммобилизации лиганда (или его рецептора) на подложке кюветы сенсора [21].

Целью данной работы было изучение возможности использования оптического сенсора IAsys для выявления рецепторов изатина в мембранной и растворимой фракциях мозга, сердца, печени и почек крысы.

**МЕТОДИКА.** Принцип метода основан на мониторинге в реальном времени изменения оптических характеристик поверхности биосенсора при образовании специфического комплекса между растворимым белком и лигандом - 5-аминоизатином, иммобилизованным на декстрановом носителе кюветы IAsys. Иммобилизация осуществляется за счет образования пептидной связи между аминокислотной группой аналога изатина и активированной карбоксильной группой декстрановой подложки (схема 1). При добавлении в кювету изатин-связывающих белков на декстрановой поверхности происходит комплексообразование. Мониторинг изменения коэффициента преломления среды в приповерхностном слое во времени позволяет регистрировать кинетическую кривую образования комплексов. Анализируя кривые, полученные при исследовании образцов с различной концентрацией лиганда, можно рассчитать константы скорости ассоциации и диссоциации. Реакцию комплексообразования иммобилизованный

лиганд А - растворимый белок В описывают уравнением:



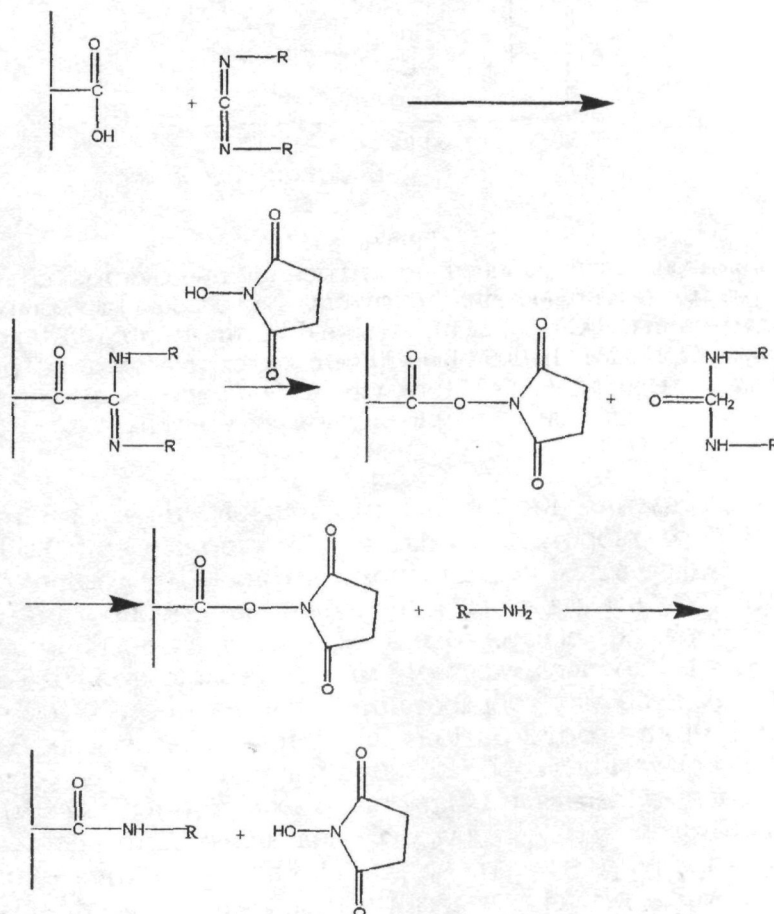
Сигнал, соответствующий отклику R оптического биосенсора на образование комплекса в условиях, когда  $[\text{B}] \gg [\text{A}]$ , можно записать как [21]:  
 $dR/dt = d[\text{AB}]/dt = k_{\text{on}}[\text{A}][\text{B}] - k_{\text{off}}[\text{AB}] = k_{\text{on}}[\text{B}]R_{\text{max}} - (k_{\text{on}}[\text{B}]R + k_{\text{off}}R)$ ,  
 где [A] и [B] - концентрации иммобилизованного и добавляемого компонентов соответственно,  $k_{\text{on}}$  и  $k_{\text{off}}$  - константы скорости ассоциации и диссоциации, а R и  $R_{\text{max}}$  - показания прибора в текущий момент времени t и при  $t \rightarrow \infty$ .

Зависимость  $dR/dt$  от R - прямая с коэффициентом пропорциональности  $K = k_{\text{on}}[\text{B}] + k_{\text{off}}$ . Поэтому, получая эту зависимость для разных концентраций B, определяют значение  $k_{\text{on}}$ . При замене раствора в кювете на рабочий буфер наблюдается диссоциация комплекса, что позволяет зарегистрировать кинетическую кривую диссоциации и рассчитать значения  $k_{\text{off}}$  из уравнения диссоциации:

$$dR/dt = -k_{\text{off}}R$$

С помощью этого метода было исследовано комплексообразование иммобилизованного 5-аминоизатина с препаратами растворимой и мембранной фракций органов крысы.

Иммобилизацию 5-аминоизатина иллюстрирует схема:





Карбоксиметилированный декстран подложки кюветы активировали смесью 0,4 М 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид/0,1 М N-оксисукцинимид (EDC/NHS) в течение 7 минут и промывали 10 мМ калий-фосфатным буфером (рН 7,4), содержащим 138 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl и 0,05 % Твин-20 (PBS/t). Затем добавляли раствор 5-аминоизатина (60 мкг/мл). Иммунизацию проводили в течение 20 минут в 10 мМ формиатном буфере, рН 3,0. Карбоксильные группы декстрана, активированные EDC/NHS, но не связавшиеся с 5-аминоизатином, дезактивировали 1М раствором этаноламина (рН 8,5) в течение 2 минут. (см. схему).

Типичный профиль иммобилизации 5-аминоизатина на кювете оптического биосенсора показан на рис.1.

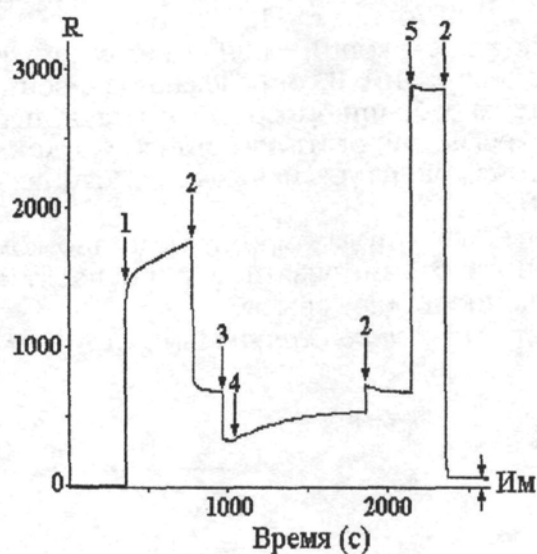


Рисунок. 1.

Профиль иммобилизации 5-аминоизатина на кювете оптического сенсора. Стрелками указаны добавки: 1 - смесь 0,4М 1-этил-3-(3-диметил-аминопропил)карбодиимид/ 0,1М N-гидроксисукцинимид (EDC/NHS); 2 - 10 мМ калий-фосфатный буфер (PBS/t), содержащий 138 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl и 0,05% Твин-20; 3 - иммобилизационный буфер, рН 3,0; 4 - 5-аминоизатин (60 мкг/мл); 5 - 1 М этаноламин; Им - количество иммобилизованного 5-аминоизатина. R - интенсивность сигнала.

**Ход определения.** Кювету с иммобилизованным 5-аминоизатином промывали 2% раствором холата натрия +1М хлорид натрия + 50 мМ калий-фосфатный буфер, затем 1% раствором Тритона X-100 в калий-фосфатном буфере, рН 7,4 для удаления неспецифически сорбированных молекул. Объем раствора, добавляемого в кювету, составлял 200 мкл. В кювету вносили 180 мкл рабочего буфера и 3 минуты прописывали базовую линию. Затем добавляли 20 мкл обработанных 1% тритоном X-100 препаратов мембранной или растворимой фракции исследуемых органов и регистрировали комплексообразование в течение 10 мин. Далее кювету последовательно промывали 1 М раствором хлорида натрия в 50 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7,4 для удаления электростатически связанных молекул и 2% раствором холата натрия +1М хлорид натрия + 50 мМ калий-фосфатный буфер, рН 7,4 для разрушения комплексов, сформированных



за счет гидрофобных взаимодействий.

Препараты мембранной и растворимой фракций получали методом дифференциального центрифугирования 10% гомогенатов органов в 50 мМ фосфатном буфере крысы (рН 7,4). Гомогенаты первоначально центрифугировали при 500 g 7 мин для удаления обломков клеток, не разрушенных при гомогенизировании тканей, и ядер. Безъядерный гомогенат центрифугировали при 20000 g 30 мин. Осадки суспендировали в том же буфере. Выделенные мембранные и растворимые фракции мозга, сердца, печени и почек обрабатывали 1,5% раствором тритона X-100 30 мин. Для удаления неразрушенных детергентом частиц подвергнутые действию тритона X-100 препараты мембранной фракции центрифугировали при 20000 g 20 мин, используя в дальнейшей работе надосадочную жидкость.

Митохондрии печени крысы и фракцию внешних мембран выделяли, как описано ранее [22]. Для контроля чистоты фракции внешних мембран определяли активность ферментов внешней (МАО А и Б) и внутренней мембраны (сукцинатдегидрогеназа) митохондрий. Активность МАО А и Б определяли радиометрически, используя 100 мкМ [ $^{14}$ C]5-окситриптамиин креатинсульфат (серотонин) и [ $^{14}$ C]2-фенилэтиламин гидрохлорид соответственно [23]. Активность сукцинатдегидрогеназы определяли в системе сопряженного восстановления феназинметосульфата и дихлорфенолиндифенола [24, 25].

Белок определяли методами Лоури и Брэдфорд [26, 27].

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** В предварительных опытах было установлено, что 5-аминоизатин тормозит активность стимулируемой натрийуретическим пептидом предсердий мембраносвязанной гуанилатциклазы мозга и сердца крысы [28], а также (хотя и в меньшей степени, чем сам изатин) активность МАО А и Б [29]. Поэтому 5-аминоизатин и был выбран в качестве иммобилизуемого аналога изатина, сохраняющего биологическую активность в отношении наиболее изученных внутриклеточных мишеней последнего. Ранее 5-аминоизатин был с успехом использован для иммуноферментного определения содержания изатина в моче; его результаты совпадали с данными газохроматографического-масс спектрометрического определения [5].

Поскольку среди известных мишеней действия наиболее изучена моноаминоксидаза внешней мембраны митохондрий, мы исследовали распределение изатин-связывающей активности этих органелл более подробно. При фракционировании митохондрий с помощью дигитонина [22], которое позволяет разделить эти органеллы на фракцию внешних мембран и митопласты (митохондрии, лишенные внешних мембран и межмембранного пространства) оказалось, что внешние мембраны характеризуются большей изатин-связывающей активностью, чем митохондрии (рис. 2). В этих опытах активность сукцинатдегидрогеназы во фракции внешних мембран не превышала 4% активности митохондрий, а удельная активность маркерных ферментов внешней мембраны митохондрий - МАО А и Б - увеличивалась примерно в 1,5 раза по сравнению с интактными митохондриями.

Это свидетельствует о достаточной высокой чистоте фракции внешних мембран.

Ранее было установлено, что изатин является конкурентным ингибитором МАО А и МАО Б, эффективно защищая оба фермента от

необратимой инактивации специфическими ингибиторами [11, 29]. Обработка митохондрий ацетиленовыми ингибиторами хлоргилином и депренилом в концентрации (1 мкМ), преимущественно тормозящей активность МАО А и МАО В, соответственно, приводила к существенному уменьшению интенсивности сигнала и изменению формы кинетической кривой (рис. 3). При увеличении концентрации хлоргилина и депренила на 3 порядка, когда каждый ингибитор полностью тормозит активность и МАО А, и МАО В, происходит дальнейшее снижение ответа, особенно заметное в течение первой минуты. Эти результаты согласуются с представлениями о том, что в митохондриях именно МАО является основной мишенью действия изатина. В то же время следует отметить, что даже после полной

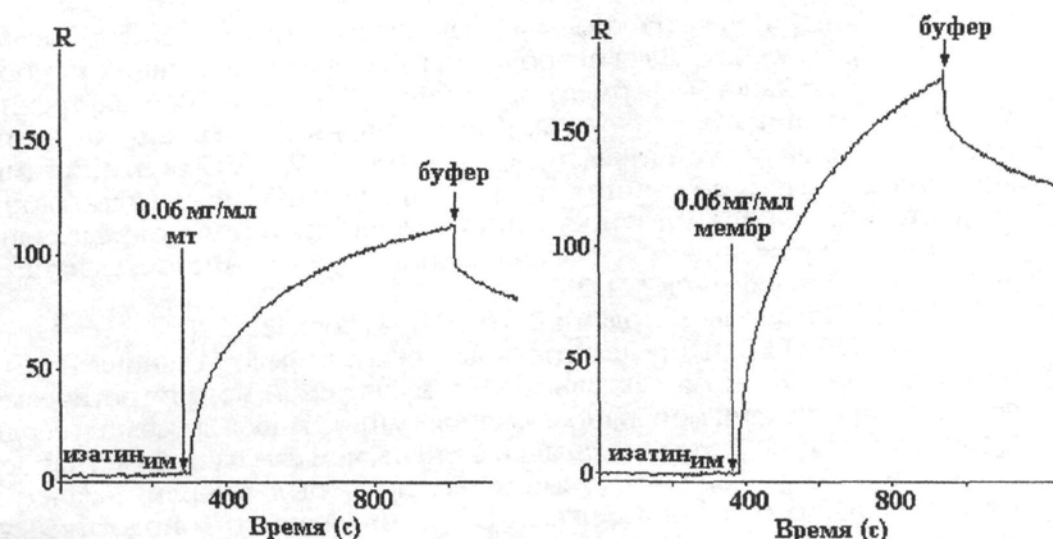


Рисунок 2.

Взаимодействие препаратов митохондрий печени крысы (а) и внешних мембран митохондрий (б) с иммобилизованным изатином. R - интенсивность сигнала.

инактивации обеих форм МАО в митохондриях остается изатин-связывающая активность, нечувствительная к ацетиленовым ингибиторам.

Добавление обработанных раствором тритона X-100 препаратов мембранной и растворимой фракций мозга, печени, сердца и почек в кювету приводило к появлению характерного ответа, свидетельствующего о связывании иммобилизованным 5-аминоизатином (рис. 4, 5). Величина ответа и форма кинетической кривой в образцах исследованных органов отличались между собой. Важно отметить также, что связывание с иммобилизованным аналогом изатина в исследованных органах было неодинаковым. В мозге, печени и сердце связывание преобладало в мембранной фракции, в то время как в почках оно была выше в растворимой фракции (рис. 4, 5).

**ОБСУЖДЕНИЕ.** До сих пор биосенсорные технологии преимущественно применялись для изучения белок-белковых или белок-липидных взаимодействий очищенных реконструированных систем [12-20].

Как показали предварительные эксперименты, 5-аминоизатин - аналог изатина, ранее использованный при разработке иммуноферментного

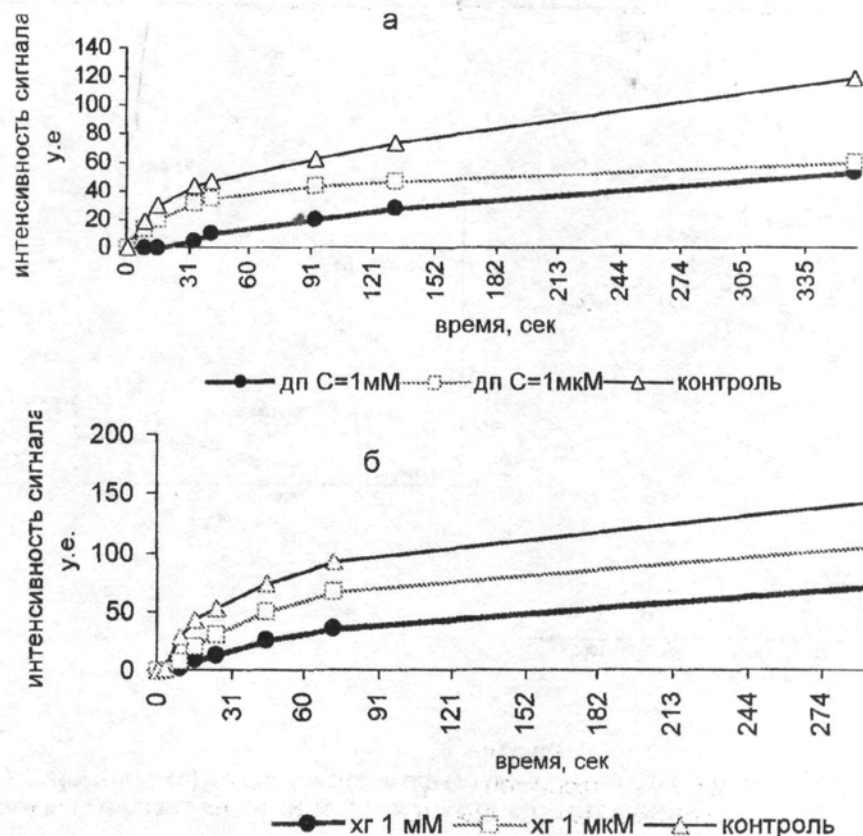


Рисунок 3.

Влияние депренила дп (а) и хлоргилина хг (б) на взаимодействие препаратов митохондрий печени крысы с иммобилизованным изатином. В представленных результатах внесена поправка на неспецифическое связывание, которое определяли в кювете без иммобилизованного изатина.

метода определения изатина в биологических жидкостях - может быть иммобилизован на кювете биосенсора (рис. 1).

Анализ связывания препаратов митохондрий с иммобилизованным аналогом изатина позволяет предположить, что именно МАО внешних мембран является основным изатин-связывающим компонентом этих органелл. Об этом свидетельствует увеличение амплитуды ответа сенсора при использовании препаратов внешних мембран по сравнению с препаратами митохондрий, а также снижение ответа в препаратах митохондрий, обработанных ацетиленовыми ингибиторами хлоргилином и депренилом. Сохранение остаточной связывания препаратов митохондрий с изатином после полного необратимого торможения МАО может быть следствием двух причин:

- 1) помимо МАО в митохондриях есть и другие изатин-связывающие белки;
- 2) возможно, что полное торможение каталитической активности МАО механизм-активируемыми ингибиторами (к числу которых относятся хлоргилин и депренил) не блокирует связывание изатина в субстрат-связывающем участке активного центра.

Для окончательного выяснения вопроса о том, какое из этих предположений окажется правильным, необходимы дополнительные эксперименты.



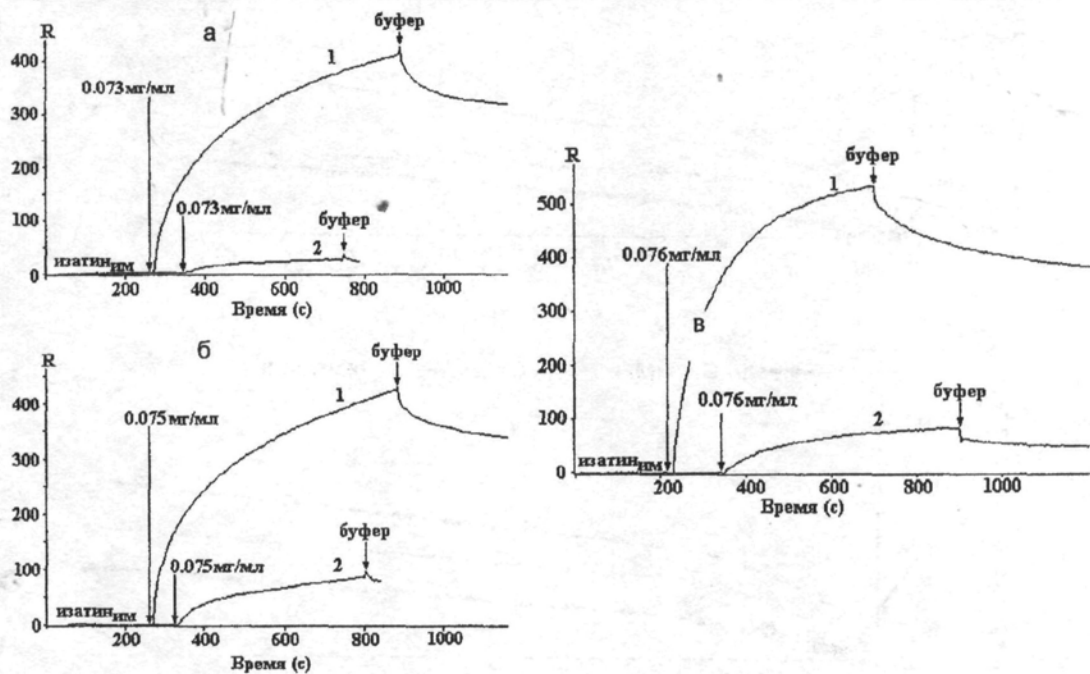


Рисунок 4.

Связывание мембранной (1) и растворимой (2) фракций мозжечка (а), полушарий (б) и ствола (в) мозга крысы с иммобилизованным изатином. R - интенсивность сигнала.

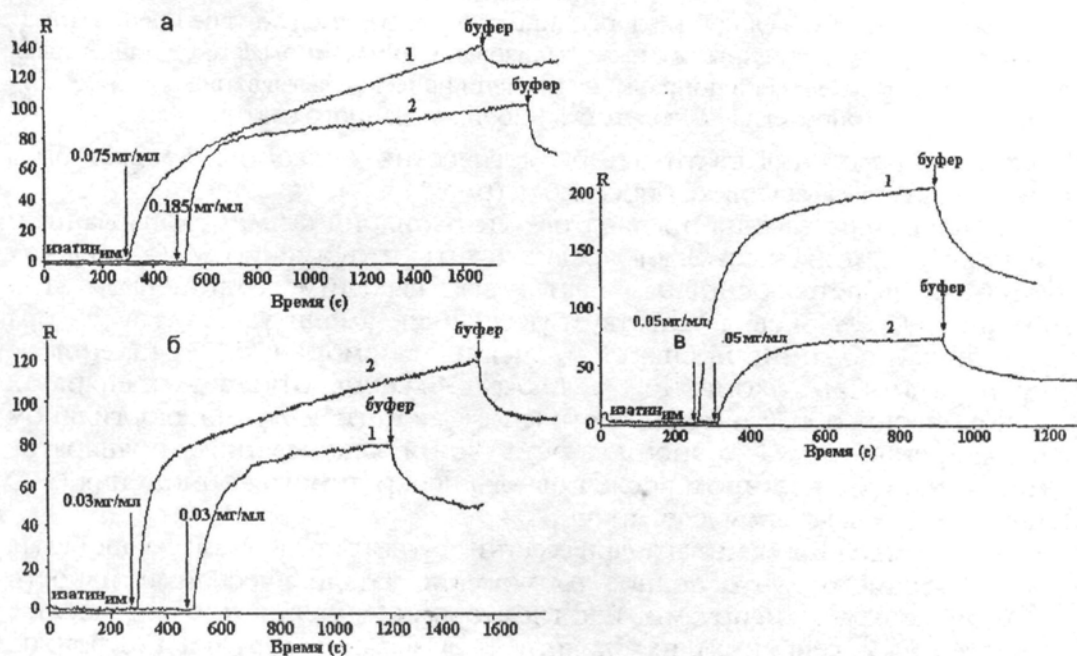


Рисунок 5.

Связывание мембранной (1) и растворимой (2) фракций печени (а), почек (б) и сердца (в) с иммобилизованным изатином. R - интенсивность сигнала.

Анализ связывания препаратов мозга, сердца, почек и печени с иммобилизованным аналогом изатина позволил выявить неравномерное распределение изатин-связывающих белков в растворимой и мембранной фракциях исследованных органов. Наивысшее связывание было обнаружено в стволе и далее в порядке убывания в полушариях  $\geq$  мозжечке  $>$  сердце  $>$  почках  $>$  печени. В растворимой фракции связывание препаратов исследуемых органов с иммобилизованным аналогом изатина было иным: почки  $>$  сердце  $>$  ствол  $\geq$  полушария  $>$  печень  $>$  мозжечок. Это позволяет предположить существование в растворимой мембранной фракциях мозга и периферических тканей целого ряда изатин-связывающих белков. В предварительных экспериментах был идентифицирован один из растворимых изатин-связывающих белков, которым оказался фермент гликолиза глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа [29, 30].

Данная работа осуществлена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 00-04-48446, 01-04-48245), ИНТАС (97-1818), Королевского Общества Великобритании и Благотворительного Фонда содействия отечественной медицине.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Medvedev A.E., Clow A., Sandler M., Glover V. (1996) *Biochem. Pharmacol.*, **52**, 385-391.
2. Гловер В., Медведев А.Е., Сандлер М. (1997) *Вопр. мед. химии*, **43**, 515-521.
3. Glover V., Bhattacharya S.K., Chakrabarti A., Sandler M. (1998) *Stress Med.*, **14**, 225-229.
4. Sandler M., Medvedev A.E., Panova N.G., Matta S., Glover V. (2000) In: *Milestones in monoamine oxidase research: discovery of (-)-deprenyl* (K.Magyar and E.S.Visi eds.) Meditcina Publishing House Co., Budapest, pp. 237-251.
5. Pang F.-Y., Hucklebridge F.H., Forster G., Tan K., Clow A. (1996) *Stress Med.*, **12**, 35-42.
6. Hamanue N., Yamazaki N., Minami M., Endo T., Hirabuji M., Monma Y., Togashi H. (1998) *Gen. Pharmacol.* **30**, 387-91.
7. Mowatari K., Segawa M., Nasatsuka R., Hanawa Y., Imuma F., Watanabe M. (2001) *Analyst*, **126**, 33-36.
8. Medvedev A.E., Sandler M., Glover V. (1998) *Life Sci.*, **62**, 2391-2398.
9. Glover V., Medvedev A., Sandler M. (1995) *Life Sci.*, **57**, 2073-2079.
10. Медведев А.Е. (1996) *Вопр. мед. химии*, **42**, 95-103.
11. Panova N. G., Zemskova M.A., Axenova L.N., Medvedev A.E. (1997) *Neurosci. Lett.* **233**, 58-60.
12. Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Karuzina I.I., Archakov A.I., Hoa G.H., Sligar S.G. (2001) *Arch. Biochem. Biophys.* **391**, 255-64.
13. Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Gnedenko O.V., Pozdnev V.F., Shumyantseva V.V., Samenkova N.F., Kuznetsova G.P., Tereza A.M., Schmid R.D., Archakov A.I. (2001) *J. Mol. Recognit.* **14**, 185-96.
14. Ivanov Yu. D., Kanaeva I.P., Eldarov M.A., Skryabin K.G., Lebnerer M., Schulze J., Hlavica P., Archakov A. I. (1997) *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **42**, 731-737.
15. Ivanov Yu. D., Kanaeva I.P., Kuznetsov V.Yu., Lebnerer M., Schulze J., Hlavica P.,

- Archakov A.I.* (1999) Arch. Biochem. Biophys., **362**(1), 87-93.
16. *Ivanov Yu.D., Usanov S.A., Archakov A.I.* (1999) Biochem. Mol. Biol. Int., **47**, 327-336.
17. *Archakov A.I., Ivanov Yu.D.* (1999) In Biophysics of Electron Transfer and Molecular Bioelectronics, Plenum Publication Corporation, pp. 173-194..
18. *Koval V.V., Gnedenko O.V., Ivanov Yu.D., Fedorova O.S., Archakov A.I., Knorre D.G.* (1999) IUBMB LIFE, **48**, 1-4.
19. Морозов С.Г., Иванов Ю.Д., Учайкин В.Ф., Каражас Н.В., Вахрушина С.В., Гнеденко О.В., Конев В.А., Ковалев О.Б., Арчаков А.И. (1999) Новости Науки и Техники. Серия Медицина. Аллергия, Астма и клиническая иммунология, **9**, 187-189.
20. *Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Archakov A.I.* (2000) Biochem. Biophys. Res Commun. **273**, 750-752.
21. IAsys Cuvette System Method Guide (1993)
22. *Pedersen P.L., Greenawalt J.W., Reynafarje, B., Hullihen J., Decker G.L., Soper J.W., Bustamente F.* (1978) Meth. Cell. Biol. **20**, 411-481.
23. *Medvedev A.E., Kirkel A.Z., Kamysbanskaya N.S., Axenova L.N., Moskvitina T.A., Gorkin V.Z., Andreeva N.I., Golovina S.M., Mashkovsky M.D.* (1994) Biochem. Pharmacol., **47**, 303-308.
24. *Kotlyar A.B., Vinogradov A.D.* (1984) Biochim. Biophys. Acta., **784**, 24-34.
25. *Медведев А.Е.* (1990) Вопр. мед. химии, **36** (5), 18-21.
26. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* (1951) J. Biol. Chem., **193**, 165-175.
27. *Bradford M.* (1976) Analyt. Biochem. **72**, 248-254.
28. *Medvedev A.E., Goodwin B.L., Sandler M., Glover V.* (1999) Eur. J. Pharmacol. **57**, 913-915.
29. *Панова Н.Г.* (2001) Исследование обмена компонентов эндогенного ингибитора моноаминоксидаз трибулина и его взаимодействия с ферментами *in vivo* и *in vitro*. Дисс. канд биол. наук. НИИ биомедицинской химии РАМН
30. *Panova N.G., Buneeva O.A., Gnedenko O.V., Medvedeva M.V., Ivanov Yu.D., Glover V., Sandler M., and. Medvedev A.E.* (2000) 9th Amine oxidase work shop. The millenium meeting. Universitat Autònoma, Barcelona, p. 60.

Поступила 03.09.02



**THE STUDY OF TISSUE AND SUBCELLULAR  
DISTRIBUTION OF ISATIN BINDING PROTEINS  
BY MEANS OF OPTICAL BIOSENSOR TECHNIQUE**

***Yu. D. Ivanov, N. G. Panova, O. V. Gnedenko, O. A. Buneeva, A. E. Medvedev,  
A. I. Archakov***

Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, 10  
Pogodinskaya street, Moscow, 119992 Russia; tel: (095)246-1641; fax: (095)245-0857;  
E-mail: medvedev@ibmh.msk.su

An original method for the integral evaluation of tissue and subcellular distribution of isatin binding proteins has been developed. This method is based on continuous monitoring of changes of optical characteristics that accompany complex formation between a ligand (immobilized on dextran bed of IAsys biosensor cell) and its soluble receptor. Solubilisation of tissue preparations and subcellular fractions with detergent (1% Triton X-100) is the important preconditions for the applicability of this method. The immobilisation of 5-aminoisatin was achieved by peptide bond formation between amino group of this isatin analogue and carboxyl group of the dextran bed of the biosensor cell. Addition of Triton X-100 treated preparations of membrane and soluble fractions of rat brain, liver, heart, and kidneys to the biosensor cell resulted in appearance of the characteristic response, indicating complex formation with the immobilised isatin analogue. The magnitude and a shape of kinetic curve vary in these samples. Isatin binding proteins predominated in membrane fractions of brain, liver and heart preparations whereas in the kidneys the highest isatin-binding response was detected in the soluble fraction. The distribution of isatin binding sites in the particulate fraction reduced in the following order: brainstem>brain hemispheres=cerebellum>heart>kidneys>liver. In the soluble fraction there was different rank of isatin binding activity: kidneys>heart>brainstem=brain hemispheres >liver>cerebellum.

Liver outer mitochondrial membranes are characterised by the higher isatin-binding than mitochondria. Treatment of mitochondria with clorgyline and deprenyl, specifically inhibiting MAO A and B, respectively, significantly reduced the magnitude of the biosensor response and changed the shape of the kinetic curve. These data are consistent with the notion that within mitochondria MAOs are the major targets of isatin.

**Key words:** isatin, isatin-binding proteins, tissue and subcellular distribution, optical biosensor