

## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК: 577.17; 616-005

©Коллектив авторов

### ИЗАТИН ВЫЗЫВАЕТ БЫСТРОЕ НАКОПЛЕНИЕ АТР В СИНАПСОМАХ: ВОЗМОЖНОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПРИ СТРЕССЕ И РЕГУЛЯЦИИ РЕЦЕПТОРОВ НАТРИЙУРЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ

А.Г. Глоба<sup>1</sup>, В. Гловер<sup>2</sup>, А.Е. Медведев<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Институт хирургии им. А.В.Вишневского РАМН, Москва

<sup>2</sup>Институт биологии репродукции и развития, Имперский колледж Лондона,  
London, Du Cane Road, W12 0NN

<sup>3</sup>Институт биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича РАМН, 119121 Москва,  
Погодинская ул. 10; эл. почта: alexei.medvedev@ibmc.msk.ru

Изатин - эндогенный индол, содержание которого в мозге и периферических тканях увеличивается в условиях стресса. Физиологические концентрации изатина тормозят связывание натрийуретических пептидов со своими рецепторами (NPR) и NPR-зависимую сигнализацию. Присутствие негидролизуемого аналога АТР снижает эффект изатина на NPR-зависимую сигнализацию. В данной работе мы показали, что кратковременная инкубация синапсом мозга крысы с физиологической концентрацией изатина вызывает быстрое (3-кратное) увеличение АТР. Дополнительное увеличение уровня АТР в присутствии тирфостина - ингибитора тирозинкиназ (которые используют АТР для фосфорилирования ряда белков) свидетельствует в пользу зависимости этого феномена от активности систем, потребляющих АТР. Кроме того, АТР тормозил связывание [<sup>3</sup>H]изатина с растворимой и мембранной фракциями мозга крысы. Это свидетельствует о том, что изатин вызывает накопление АТР, который, в свою очередь, может вытеснять изатин из участков связывания мембранной и растворимой фракций. Поскольку натрийуретические пептиды снижают выделение гормонов стресса данная регуляторная петля может участвовать в поддержании натрийуретической сигнализации в условиях стресса и таким образом вносить определенный вклад в регуляцию ответов на стресс.

**Ключевые слова:** изатин, мозг, АТР, рецепторы натрийуретических пептидов, стресс.

**ВВЕДЕНИЕ.** Изатин - эндогенный индол, широко представленный в мозге, периферических тканях и биологических жидкостях млекопитающих (см. обзоры [1, 2]). Физиологические концентрации изатина в крови могут превышать 1 мкмоль/л [3, 4], базальные концентрации этого вещества в тканях обычно находятся в диапазоне концентраций 0,1-1 мкМ [1, 2], но в некоторых из них они могут достигать и более высокого уровня - 40-70 мкМ [2]. В условиях острого стресса у животных обнаружено увеличение уровня изатина в тканях [4], плазме крови [4] и моче [4, 5].

Изатин обладает широким спектром поведенческих и метаболических эффектов [6, 7]. Он может оказывать анксиогенные эффекты. В условиях *in vitro* физиологические концентрации изатина (0,01-0,4 мкМ) тормозят рецепторное связывание натрийуретических пептидов и NO-зависимую сигнализацию [1, 2]. Это - наиболее сильные (из известных в настоящее время) эффекты изатина. Торможение изатином эффектов натрийуретического фактора предсердий (ANP) продемонстрировано в разных лабораториях как в экспериментах *in situ* [8, 9], так и *in vivo* [7, 10, 11].

\* - адресат для переписки

## ИЗАТИН ВЫЗЫВАЕТ НАКОПЛЕНИЕ АТФ В СИНАПСОСОМАХ

Взаимодействие изатина с А-рецептором натрийуретических пептидов (NPR-A) может происходить как во внеклеточном рецепторном домене, ответственном за связывание натрийуретических пептидов и последующую активацию рецепторной гуанилатциклазы (каталитический домен NPR-A) [12], так и во внутриклеточном домене [13], гомологичном тирозинкиназе (см. обзор [14] и лекцию [15]). В отсутствие АТФ (или его аналога) гуанилатциклазная активность NPR-A очень низка, и есть данные, что АТФ "в обязательном порядке" необходим для активации NPR-A лигандами [14]. Ранее мы показали, что присутствие негидролизуемого аналога АТФ АМР-РNP не только потенцировало стимуляцию NPR-A рецепторной гуанилатциклазы натрийуретическим фактором предсердий, но и защищало ее от ингибирования изатином [12]. Последнее позволяет предположить, что АТФ является важным внутриклеточным фактором, который может вносить определенный вклад в регуляцию чувствительности NPR-A к изатину. Такого рода регуляция могла бы объяснить более низкую чувствительность NPR-A-зависимой сигнализации к торможению изатином в интактных клетках по сравнению с мембранными препаратами [16] (факт проникновения изатина в клетки был экспериментально установлен еще в 2002 г; см. [1, 2]).

Однако до сих пор нет данных о том, влияет ли изатин на накопление АТФ. В настоящей работе мы исследовали влияние изатина на накопление АТФ в синапсосомах мозга крысы и влияние АТФ на связывание [<sup>3</sup>H]изатина с препаратами мозга крысы.

**МЕТОДИКА.** Синапсосомы больших полушарий мозга крысы выделяли по методу Najos с незначительными модификациями, описанными ранее [17]. Влияние изатина на накопление АТФ в изолированных синапсосомах мозга исследовали, используя ранее описанную систему [18]. Синапсосомы мозга (1,1 мг/мл) инкубировали в среде (конечный объем 0,7 мл), содержащей 0,04 М трис-НСI-буфер, 0,25 М сахарозу, 2,5 мМ MgSO<sub>4</sub>, 0,2 мМ ADP (калиевая соль), 5 мМ КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, 20 мМ NaF, 0,1 мМ NADH, 10 мМ β-гидроксипутират натрия, 227 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, 0,1 мМ цитохром с (окисленный), 2 мкМ 5'-фторсульфонилбензоиладенозин (ингибитор протеинкиназ) и ингибиторы электронтранспортной цепи митохондрий (7,61 мкМ ротенон, 1,5 мкМ антимицин А и 1 мМ KCN), рН 7,5. Содержание АТФ определяли при помощи люциферин люциферазного метода [18].

Мембранную и растворимую фракции гомогената больших полушарий мозга крысы выделяли, как описано ранее [12]. Исследование эффекта АТФ на связывание [<sup>3</sup>H]изатина проводили, инкубируя препараты 60 мин при 0°С в 10 мМ Hepes-КОН буфере, рН 7,2, содержащем 0,20 М сахарозу и 0,01% бацитрацин [19]. Неспецифическое связывание определяли в присутствии 0,2 мМ немеченого изатина. Реакцию останавливали быстрой фильтрацией через стекловолоконные фильтры Whatman, предварительно смоченные в растворе полиэтиленimina; радиоактивность, оставшуюся на фильтрах, определяли, используя сцинтилляционный коктейль, как описано ранее [19].

Полученные результаты обрабатывали статистически, используя t-критерий Стьюдента для связанных выборок; различия считали статистически значимыми при p<0,05.

[<sup>3</sup>H]Изатин (26 Ки/ммоль) был синтезирован по индивидуальному заказу "Amersham" (Великобритания). Немеченый изатин и другие реактивы были приобретены у "Sigma" (представительства в России и Великобритании).

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Добавление 0,2 мкМ изатина в среду инкубации синапсосом мозга приводила к быстрому увеличению образования АТФ. Статистически значимое различие между уровнями АТФ в пробах с и без изатина определялось уже через 15 с после начала инкубации (p<0,02) и достигало плато через 180 с (p<0,01) (рис. 1). Добавление в среду инкубации ингибитора тирозинкиназ тирфостина (конечная концентрация 3 мкМ) потенцировало эффект изатина на накопление АТФ (таблица).

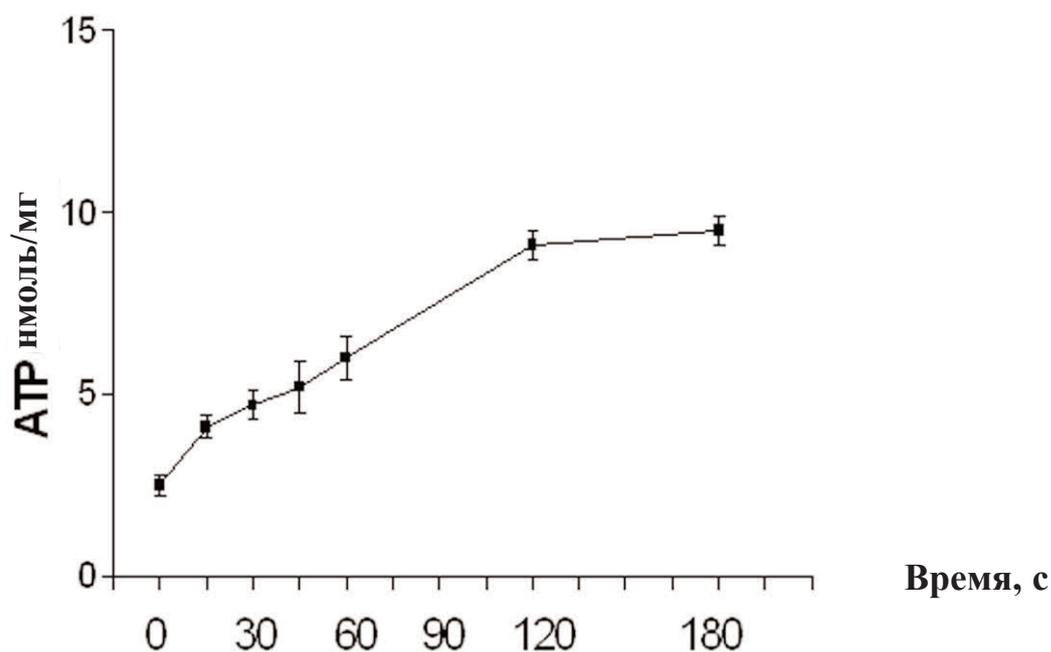


Рисунок 1.

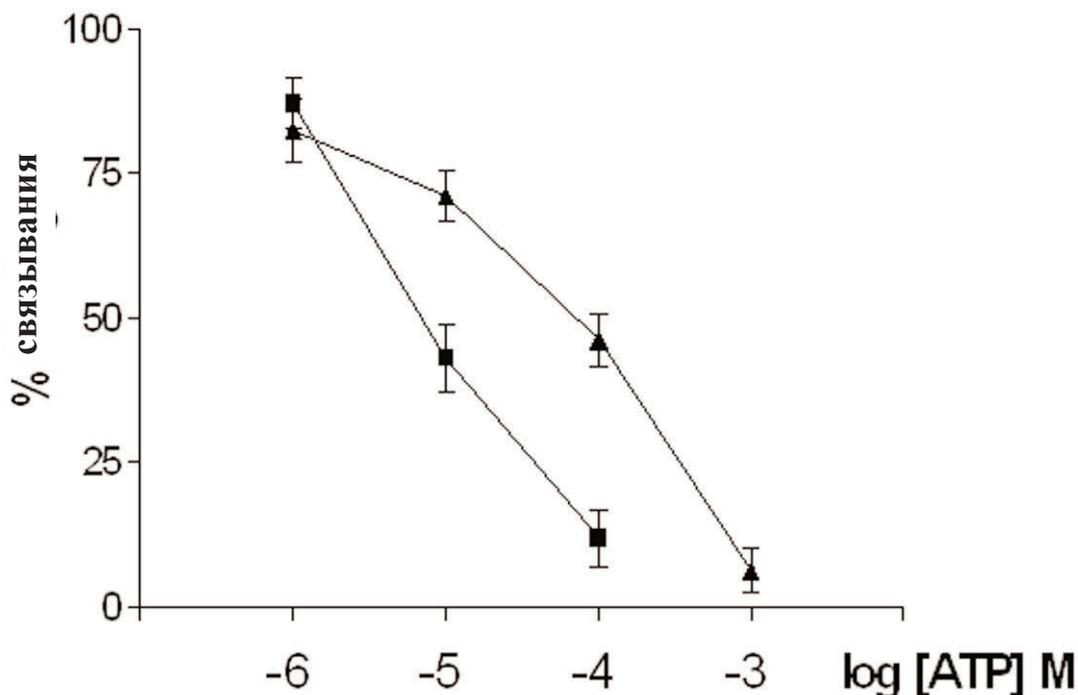
Влияние 0,2 мкМ изатина на накопление АТР в синапсах мозга крысы. Результаты, выраженные в нмоль АТР/мг белка представлены в виде средней  $\pm$  ошибка средней 4 экспериментов.

Таблица. Влияние тирфостина на индуцированное изатином накопление АТР в синапсах мозга крысы.

Условия опыта	- Тирфостин	+ 3 мкМ Тирфостин	p
Контроль	2,5 $\pm$ 0,28	2,1 $\pm$ 0,99	>0,3
0,2 мкМ Изатин	6,2 $\pm$ 0,34	7,8 $\pm$ 0,22	<0,02
p	<0,005	<0,002	

Примечание. Результаты (нмоль АТР/мг белка) представлены в виде средней  $\pm$  ошибка средней 4 экспериментов.

На рисунке 2 приведены данные об ингибировании АТР связывания [<sup>3</sup>H]изатина с препаратами растворимой и мембранной фракций мозга крысы. Как видно из представленных результатов, АТР вызывал концентрационно-зависимое торможение связывания 0,2 мкМ [<sup>3</sup>H]изатина с препаратами как мембранной, так и растворимой фракций мозга крысы. Эффект АТР был еще более выражен при использовании 0,02 мкМ [<sup>3</sup>H]изатина (данные не приведены).



**Рисунок 2.**

Ингибирование АТР связывания 0,2 мкМ [<sup>3</sup>H]изатина с растворимой (▲) и мембранной (■) фракций мозга крысы. Результаты представлены в виде % торможения специфического связывания [<sup>3</sup>H]изатина увеличивающимися концентрациями АТР. Результаты представлены в виде средней ± ошибка средней 4-6 экспериментов.

Это свидетельствует о том, что АТР эффективно вытесняет [<sup>3</sup>H]изатин из участков связывания, локализованных как в растворимой, так и в мембранной фракциях.

**ОБСУЖДЕНИЕ.** Накапливается все больше данных о том, что ANP оказывает множественное торможение активности гипоталамо-гипофазарно-надпочечниковой системы (т.н. НРА ось - hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis) [20-22] и поэтому тормозит ответные реакции на стресс. Эти антистрессорные эффекты ANP, очевидно, реализуются через NPR-A, поскольку другой натрийуретический пептид CNP (C-type natriuretic peptide), который не взаимодействует с NPR-A [14, 15], может оказывать противоположный эффект [21]. Поэтому регуляция работы NPR-A рецептора может иметь важное значение для ANP-зависимой модуляции реакций на стресс.

Эндогенный индол изатин является антагонистом, противодействующим поведенческим эффектам ANP и ANP-зависимой сигнализации, действуя на NPR-A [12, 19]. Поэтому изатин может выступать в качестве непрямого активатора НРА оси, ингибируя ANP-зависимую сигнализацию.

Ранее мы показали, что AMP-PNP - негидролизуемый аналог АТР - снижает чувствительность NPR-A к изатину [12]. Результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что физиологическая концентрация изатина (0,2 мкМ) также вызывает быстрое накопление АТР в синапсосомах. Дополнительное увеличение уровня АТР в присутствии тирфостина - ингибитора тирозинкиназ (которые используют АТР для фосфорилирования ряда белков) свидетельствует в пользу зависимости этого феномена от активности систем, потребляющих АТР.

В свою очередь, АТР сильно тормозил связывание [<sup>3</sup>H]изатина с препаратами растворимой и мембранной фракций гомогената больших полушарий мозга. Это свидетельствует о том, что АТР может эффективно вытеснять изатин из различных молекулярных мишеней, включая NPR-A.

Полученные результаты предполагают существование ранее неизвестной регуляторной петли: изатин вызывает бустрое увеличение уровня АТР, который "вызывает отсрочку" включения изатин-зависимого потенцирования работы НРА оси за счет торможения сигнальных механизмов натрийуретических пептидов. Последующее использование внутриклеточного АТР (плазматических мембран?) в различных метаболических реакциях (например, в реакциях, катализируемых тирозиновыми и другими киназами), типичных для стресса [23], будет способствовать появлению торможения NPR-A изатином и косвенно увеличивать активность НРА оси. Правомочность данной гипотезы требует прямой экспериментальной проверки.

Данная работа поддержана грантами The Wellcome Trust (072381/Z/03) и Российского Фонда Фундаментальных Исследований (N06-04-48355).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Medvedev A., Igosheva N., Crumeyrolle-Arias M., Glover V. (2005) *Stress*, **8**, 175-183.
2. Medvedev A.E., Buneeva O.A., Glover V. (2007) *Biological Targets and Therapeutics*, **1**(2), 151-162.
3. Mawatari K., Segawa M., Masatsuka R., Hanawa Y., Inuma F., Watanabe M. (2001) *Analyst*, **126**, 33-36.
4. Igosheva N., Matta S., Glover V. (2004) *Physiol. Behav.*, **80**, 665-668.
5. Tozawa Y., Ueki A., Manabe S., Matsushima K. (1998) *Biochem. Pharmacol.*, **56**, 1041-1046.
6. Bhattacharya S.K., Acharya S.B. (1993) *Biogenic Amines*, **9**, 453-463.
7. Glover V., Bhattacharya S.K., Chakrabarti A., Sandler M. (1998) *Stress Med.*, **14**, 225-229.
8. Lonardo G., Cerbai E., Casini E., Giunti G., Bonacchi M., Battaglia F., Fiorani B., Stefano P.L., Sani G., Mugelli A. (2004) *Cardiovasc. Res.*, **63**, 528-536.
9. Burley D.S., Baxter G.F. (2007) *Basic Res. Cardiol.*, **102**, 529-541.
10. Pataki I., Adamik A., Telegdy G. (2000) *Peptides*, **21**, 373-377.
11. Potter D.E., Russell K.M., Manhiani M. (2004) *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, **309**, 548-553.
12. Medvedev A., Sandler M., Glover V. (1998) *Life Sci.*, **62**, 2391-2398.
13. Medvedev A., Sandler M., Glover V. (1999) *Eur. J. Pharmacol.*, **384**, 239-241.
14. Potter L.R., Abbey-Hosch S., Dickey D.M. (2006) *Endocrine Rev.*, **27**, 47-72.
15. Медведев А.Е. (2007) *Биомед. химия*, **53**, 476-487.
16. Medvedev A.E., Abakutova O.Yu., Podobed O.V., Tsvetkova T.A., Sandler M., Glover V. (2001) *Life Sci.*, **69**, 1783-1790.
17. Medvedev A.E., Rajgorodskaya D.I., Gorkin V.Z., Fedotova I.B., Semiokhina A.F. (1992) *Mol. Chem. Neuropathol.*, **16**, 187-201.
18. Globa A.G., Solovyev A.S., Terentyev A.A., Demidova V.S., Shulgina M.F., Alesenko A.V., Karelin A.A. (1998) *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **45**, 1169-1178.
19. Medvedev A., Crumeyrolle-Arias M., Cardona A., Sandler M., Glover V. (2005) *Brain Res.*, **1042**, 119-124.
20. Fink G., Dow R.C., Casley D., Johnston C.I., Bennie J., Carroll S., Dick H. (1992) *J. Neuroendocrinol.*, **135**, 37-43.
21. Strohle A., Holsboer F. (2003) *Pharmacopsychiatry*, **36**(3), S207-S214.

## ИЗАТИН ВЫЗЫВАЕТ НАКОПЛЕНИЕ АТФ В СИНАПТОСОМАХ

22. *Wiedemann K., Jahn H., Kellner M.* (2000) *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, **108**, 5-13.
23. *Tamura S., Hanada M., Ohnishi M., Katsura K., Sasaki M., Kobayashi T.* (2002) *Eur. J. Biochem.*, **269**, 1060-1066.

Поступила 09. 04. 2008.

### ISATIN CAUSES A RAPID ACCUMULATION OF ATP IN SYNAPTOSOMES: IMPLICATION FOR STRESS AND REGULATION OF NATRIURETIC PEPTIDE RECEPTORS

*A.G. Globa<sup>1</sup>, V. Glover<sup>2</sup>, A.E. Medvedev<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Vishnevskii Institute of Surgery, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

<sup>2</sup>Institute of Reproductive and Developmental Biology, Imperial College London, Du Cane Road, London W12 0NN, UK

<sup>3</sup>Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya ul., 10, Moscow 119121, Russia; e-mail: alexei.medvedev@ibmc.msk.ru

Isatin is an endogenous indole, which is increased in mammalian brain and peripheral tissues under conditions of stress. Physiological concentrations of isatin inhibit natriuretic peptide (NPR) receptor binding and NPR-dependent signalling. The inhibition of NPR signalling by isatin is attenuated by a nonhydrolyzable ATP analogue. In this study we have demonstrated that short term incubation of rat brain synaptosomes with a physiological concentration of isatin caused a rapid 3-fold accumulation of ATP. The additional increase of ATP in the presence of tyrphostin, an inhibitor of tyrosine kinase, which uses ATP for phosphorylation of some proteins, suggests the dependence of this phenomenon on the activity of ATP-consuming systems.

ATP inhibited binding of [<sup>3</sup>H]isatin to both particulate and soluble fractions of the rat brain. These results suggest that isatin induces accumulation of ATP, which in turn may displace isatin from both membrane-bound and soluble binding sites. Since natriuretic peptides are known to decrease stress hormone release this regulatory loop may be involved in the maintenance of natriuretic peptide signalling under conditions of stress and thus contribute to the control of stress responses.

**Key words:** isatin, brain, ATP, natriuretic peptide receptors, stress.