

УДК 616—008.939.633.2—02:616—008.931:577.152.311

АНАЛИЗ ПАРАМЕТРОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО ФРАГМЕНТА (11—19) С-МОДУЛИНА 3 С КАЛЬМОДУЛИНЗАВИСИМОЙ ФДЭ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ ГИПОТАЛАМУСА

АБРАМЯН Г. Э., ИСАДЖАНЫН М. А., ЧАИЛЯН С. Г.,
КИРАКОСОВА А. С., ГАЛОЯН А. А.

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятыана НАН Армении, Ереван

Настоящей работой установлено, что активным участком молекулы С-модулина 3 является фрагмент 11—19, обладающий высоким сродством к молекуле кальмодулинзависимой ФДЭ гипоталамуса. Взаимодействие фрагмента с ферментом приводит к существенной стимуляции гидролиза сАМР: степень активации ФДЭ сравнима с таковой для индуцированной кальмодулином активности ФДЭ. На молекуле ФДЭ предполагается существование некоего центра, отличного от кальмодулинрегуляторного и способного взаимодействовать с Ca^{2+} -независимыми модуляторами.

Ионы кальция—важнейшие регуляторы клеточных метаболических процессов. Они, как и циклические нуклеотиды, ответственны за запуск многих ферментативных механизмов, обеспечивающих жизнедеятельность клетки. Действие Ca^{2+} опосредовано через Ca^{2+} -связывающие белки парвальбуминового ряда, характерной чертой которых является наличие в них специфических Ca^{2+} -связывающих центров. Одним из основных представителей этого семейства является кальмодулин, который, связываясь с Ca^{2+} , способен активировать многие важнейшие ферментативные системы, например, аденилатциклазу, ФДЭ циклических нуклеотидов, киназу легких цепей миозина, Ca^{2+} /Mg²⁺-АТФазу и т. д. [1].

Между тем, регуляторная функция кальмодулина внутри клетки лимитирована, поскольку известно, что образование активного комплекса Ca^{2+} -кальмодулин возможно лишь при увеличении внутриклеточного содержания Ca^{2+} до 10^{-5} М, в то время как в интактной клетке оно может колебаться в пределах 10^{-7} М, что исключает участие кальмодулина как внутриклеточного регулятора [2], вызывая в то же время недоумение в связи с обнаруживаемым в нормально функционирующем мозгу высокой активности многих чувствительных к кальмодулину ферментативных систем. В связи с вышеотмеченным, не исключено, по-видимому, существование альтернативного механизма регуляции клеточной активности как возможного заместителя многих функций, приписываемых кальмодулину при лимитированном внутриклеточном уровне Ca^{2+} . Иными словами проблема ком-

пенсаии регуляторной функции кальмодулина в данной ситуации Ca^{2+} -независимыми механизмами становится наиболее актуальной.

В этой связи несомненный интерес представляют обнаруженные впервые в 1986 г. Галояном и соавт. в гипоталамусе крупного рогатого скота ранее неизвестные нейропептиды под общим названием С-модулины, проявляющие высокое сродство к кальмодулинстимулируемым ферментам в отсутствие Ca^{2+} . На примере ФДЭ циклических нуклеотидов было показано, что С-модулины проявляли значительное сходство в регуляторной активности с кальмодулином. Однако, в отличие от последнего, процесс стимуляции гидролиза циклических нуклеотидов носил Ca^{2+} -независимый характер [3, 4]. В дальнейшем было показано участие С-модулинов в регуляции активности и других Ca^{2+} -кальмодулинзависимых ферментов, таких, например, как киназа легких цепей мюзуина, кальмодулинстимулируемая протеникиназа, 5'-нуклеотидаза и др. [5].

С использованием масс-спектрального анализа и микросеквенирования была полностью расшифрована первичная структура двух С-модулинов. Молекула одного из них была идентифицирована как тимозин $\beta 4$ (1—39) [5]. Была высказана гипотеза о причастности С-модулинов гипоталамуса к регуляторной системе нервной и мышечной тканей, ответственной за обеспечение функциональной активности питательной клетки. Значительный интерес представляет выявление участков молекулы С-модулина 3, реализующего действие этого регуляторного нейропептида. В этой связи были синтезированы фрагменты нативной молекулы С-модулина 3. Детальному изучению механизма Ca^{2+} -независимого взаимодействия синтетического фрагмента (11—19) молекулы С-модулина 3 с кальмодулинстимулируемой ФДЭ циклических нуклеотидов гипоталамуса и посвящено настоящее исследование.

Материалы и методы

В работе были использованы cAMP, cGMP, ЭГТА, препараты кальмодулина 5-нуклеотидазы из яда *Ophiophagus Hannah* («Sigma», США), Dowex 1×2, трис-HCl, MgCl_2 , CaCl_2 , NaN_3 («Serva», ФРГ), Phenyl-Sephadex («Pharmacia», Швеция), $8[^3\text{H}]$ cAMP, $8[^3\text{H}]$ cGMP и остальные реактивы отечественного производства квалификации ос. ч.

Эксперименты проводили на двухкомпонентной системе ВЭЖХ «Biotronik BT-8100» (ФРГ). Система оснащена инжектором «Rheodyne» с петлей для образца объемом 10 мкл и детектором с изменяемой длиной волны. Спектральный диапазон дейтерисовой лампы — 190—370 нм. Все растворы постоянно дегазировали гелием для предупреждения образования пузырьков в системе. Для регистрации результатов хроматографии использовали систему хранения и поиска данных, включающую компьютер «IBM PC/AT 286» (США). Для аффинной ВЭЖХ использовали колонки Si-1000 CaM-Biosphere:

(7,5×80 мм) и одноразовый концентрирующий патрон cAMB-Biosphere («Bioservis», Армения).

Активность ФДЭ определяли по методу Thompson, Appleman [6] с применением меченого $8[^3\text{H}]\text{cAMP}$ или $8[^3\text{H}]\text{cGMP}$. Инкубационная смесь (200 мкл) содержала 50 мМ трис- HCl , pH 7,0, 10 мМ MgCl_2 , 2 мМ CaCl_2 или 2 мМ ЭГТА, 100 кБк $8[^3\text{H}]\text{cAMP}$ или $8[^3\text{H}]\text{cGMP}$, 5 мМ β -меркаптоэтанол и 5 мкМ cAMP. Реакцию начинали добавлением фермента. Через 5—15 мин инкубации при 30° пробы кипятили 1,5 мин, охлаждали до 30° и добавляли в них 0,2 мг/мл раствора 5'-нуклеотидазы яда *Opheophagus Nauphae*. Реакцию, катализируемую этим ферментом, проводили при 30° в течение 10 мин. Сорбцию негидролизованного субстрата осуществляли на анионообменнике Dowex 1×2 (Cl-форма), добавляя 1 мл суспензии смолы (1/2) в среду инкубации. После перемешивания пробы центрифугировали 5 мин при 12000 g, 0,3 мл супернатанта помещали в 5 мл сцинтиллятора ЖС-7 и проводили измерения радиоактивности на жидкостном сцинтилляционном спектрометре «Intertechnique 2000» (Франция). Скорость ферментативной реакции выражали в относительных единицах активности (о.е.а)—процент гидролиза субстрата/концентрация субстрата в пробе за 1 мин/1 мкл фермента.

Очистку кальмодулинзависимой ФДЭ проводили по ранее описанному методу [7]. Измельченную ткань гипоталамуса (100 г), хранившуюся при температуре -70° , гомогенизировали 3—5 мин в 300 мл буферного раствора А (25 мМ трис- HCl , pH 7,0, содержащего 2 мМ MgCl_2 , 1 мМ азид натрия, 1%-ную антипенную эмульсию и 1 мМ PMSP) при 4° на гомогенизаторе «Политрон». Гомогенат центрифугировали в течение 60 мин при 24000 g, («Beckman G-21», ротор JA-14, США). В супернатант добавляли раствор CaCl_2 в конечной концентрации 2 мМ и наносили на колонку Phenyl-Sepharose (15×200 мм), предварительно уравновешенную буфером В, содержащим 0,2 М NaCl . Скорость элюции 3 мл/мин. ФДЭ элюировали буфером В с добавлением 0,2 мМ ЭГТА. Скорость элюции составляла 2 мл/мин. Контроль осуществляли по изменению оптической плотности (λ 280 нм) и активности ФДЭ. Все операции проводили при 4° жидкостным хроматографом высокого давления «Кнауег» (ФРГ).

Элюат с Phenyl-Sepharose, обладающий наибольшей ферментативной активностью (30 мл), концентрировали на ультрафильтраторе («Amicon», США), мембрана PM-30 («Pellicon membrane 30000», США). Давление в ячейке поддерживали на уровне 3,5 атм. при 0°. 1 мл образца наносили на tandemную систему последовательно соединенных аффинных ВЭЖХ колонок Si-1000 CaM-Biosphere (7,5×80 мм), где в качестве неподвижной фазы применяли иммобилизованный кальмодулин. Систему предварительно уравновешивали 0,1 М фосфатным буфером С, pH 7,0, содержащим 0,5 М сульфат аммония, 2 мМ CaCl_2 , 0,1 мМ ЭГТА и 10%-ный глицерин. Колонки промывали тем же буфером, после чего первую колонку отсоединяли и регене-

рировали. Колонку 2 промывали пятью объемами буфера С, содержащего 0,1%-ный Brij 35 и дополнительно десятью объемами буфера С. Через инжектор на колонку наносили 1 мл буфера D, (0,1 М Na-фосфат, pH 7,0, содержащего 5 мМ MgCl_2 , 5 мМ ЭГТА, 0,5 М сульфата аммония и 20%-ный глицерин) и останавливали поток. Через 20 мин элюцию ФДЭ с колонки 2 на одноразовый концентрирующий патрон cAMP Biosphere осуществляли в режиме линейного градиента сульфата аммония от 0,5 до 0 М в присутствии 2 мМ ЭГТА и 20%-ного глицерина при скорости потока 0,8 мл/мин за 60 мин. Концентрирующий одноразовый патрон отсоединяли и хранили при температуре -20° в 45%-ном глицерине в течение двух недель. За это время активность фермента и степень активации существенно не менялись.

Аффинные колонки CaM-Biosphere регенерировали после каждой хроматографии следующим образом: колонки промывали пятью объемами буфера регенерации F (50 мМ натрий-ацетатный буфер, pH 4,5, содержащий 0,5 М NaCl, 10 мМ ЭДТА и 6 М мочевины) с последующей промывкой десятью объемами воды и буфера С.

Результаты и обсуждение

Аффинная ВЭЖХ может служить не только методом препаративного выделения ФДЭ циклических нуклеотидов, но быть гибким аналитическим методом, так как степень хроматографического удерживания подвижного реагирующего вещества на иммобилизованном лиганде позволяет определять равновесную константу связывания для взаимодействия аффинной матрицы с подвижным компонентом [8]. Кроме того, если в ходе зонального элюирования в подвижную фазу включаются биологически активные вещества, влияющие на связывание с аффинной матрицей путем прямого взаимодействия с элюирующим подвижным компонентом (например, вследствие конкуренции с иммобилизованным ферментом), то могут быть измерены также параметры взаимодействия этих эффекторов. И поскольку для аффинной матрицы можно варьировать конкурирующие вещества и другие эффекторы, а также химическую природу подвижного аффината, то могут быть определены специфичность связывания и его зависимость от влияния различных биоактивных соединений. Поэтому константы связывания для иммобилизованного лиганда можно сравнить с таковыми для растворимого аналога. Сопоставление взаимодействий в случае аффинной матрицы и раствора может быть использовано для конструирования модели и оценки механизма регуляции ферментативной активности ФДЭ. Основываясь на вышеизложенном, провели серию экспериментов по изучению межмолекулярного взаимодействия синтетического фрагмента (11—19) молекулы С-модулина 3 и кальмодулинстимулируемой ФДЭ гипоталамуса.

На рис. 1, а представлены результаты, полученные при элюировании зон синтетического фрагмента с колонки PDE-Biosphere. Как видно из хроматограммы, элюция в режиме линейного градиента

NaCl от 0 до 1 М приводит к появлению пика в области высоких концентраций элюента (0,75 М). Следовательно, можно предположить, что лишь значительное увеличение ионной силы элюента изменяет гидрофобные свойства синтетического фрагмента, что приводит к потере способности пептида связываться с иммобилизованным ферментом и с последующей его элюцией. Иными словами, можно говорить о высоком сродстве синтетического

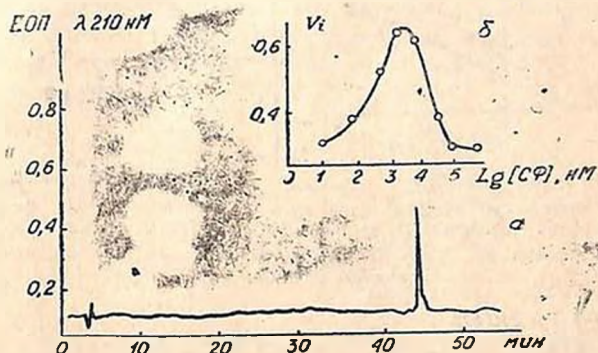


Рис. 1. Аффинная ВЭЖХ синтетического фрагмента (11—19) С-модулина 3 на колонке PDE-Biosphere (4,6.150 мм). Элюцию осуществляли в режиме линейного градиента NaCl от 0 до 1 М в 25 мМ трис-HCl буфере, pH 7,0, содержащем 2 мМ ЭГТА, 5 мМ $MgCl_2$, 0,1 мМ азид натрия, 1 мМ дитиотреитол, со скоростью потока 0,5 мл/мин при 30°. Обнаружение продукта при λ 220 нм. В правом верхнем углу представлен график зависимости начальной скорости гидролиза сАМР от концентрации синтетического фрагмента (11—19) С-модулина 3 в нмоль. Эксперимент проведен в присутствии 2 мМ ЭГТА при концентрации субстрата сАМР 5 мМ

фрагмента (11—19) С-модулина 3 к молекуле ФДЭ, что подтвердилось экспериментами кинетического анализа, результаты которого представлены на рис. 1 б. Из графика зависимости начальной скорости гидролиза сАМР от концентрации синтетического фрагмента следует, что последний оказывает двухфазное влияние на скорость гидролиза сАМР. Активация на диапазоне малых концентраций сменяется ингибированием в области его насыщающих концентраций. При увеличении концентрации субстрата кажущаяся константа активации (K_a) не возрастает (рис. 2, а). Величина K_a , определенная в координатах Хилла, равна 10 нМ (рис. 2, б) и практически совпадает с величиной K_d для нативной молекулы С-модулина 3.

Для уточнения механизма взаимодействия синтетического пептида с ферментом был проведен хроматографический и кинетический анализ с использованием негидролизруемых структурных аналогов сАМР и сGMP соответственно сАМР (Bt)₂ 135 и сGMP (Bt)₂.

На рис. 3, а представлены результаты аффинной ВЭЖХ на ко-

лонке PDE-Biosphere. Как видно из хроматограммы, элюция буфером, содержащим, сАМР (В1)₂, не приводит к появлению пика, фиксируемого при λ 210 нм. Иными словами, конкуренция пептида за каталитический центр на поверхности фермента мало вероятна, по-

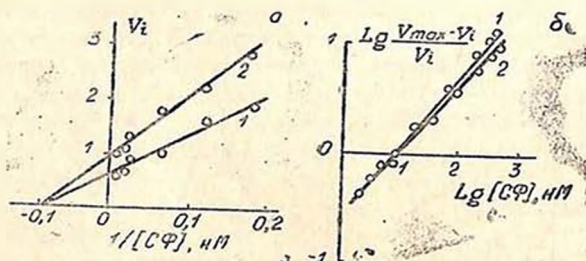


Рис. 2. График зависимости начальной скорости гидролиза сАМР от концентрации синтетического фрагмента в присутствии двух фиксированных концентраций сАМР. а: 1—5 мкМ, 2—50 мкМ. Эксперимент проведен в присутствии 2 мМ ЭГТА. Та же зависимость представлена в координатах Хилла (б)

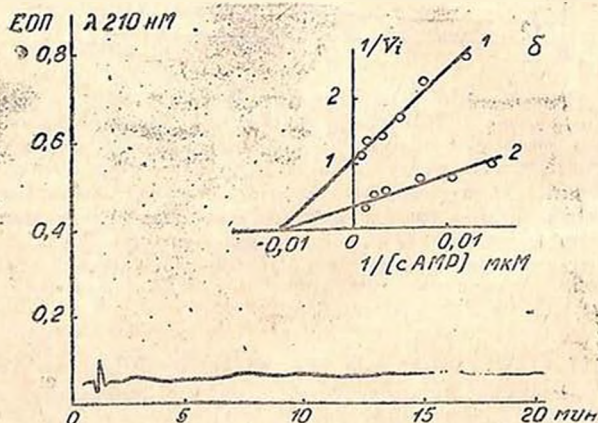


Рис. 3. Аффинная ВЭЖХ синтетического фрагмента (11—19) С-модулина 3 на колонке PDE-Biosphere (4,6×150 мм). Элюцию осуществляли в изократическом режиме 25 мМ трис-НСl буфером, рН 7,0, содержащим 2 мМ ЭГТА, 5 мМ MgCl₂, 0,1 мМ азид-натрия, 1 мМ дитиотрептола и 100 мкМ сАМР (В1)₂ со скоростью потока 0,5 мл/мин при 30°. Обнаружение продукта при λ 220 нм. В правом верхнем углу представлена зависимость начальной скорости гидролиза сАМР, индуцированной под действием синтетического фрагмента. Эксперимент проведен в присутствии 0,2 мМ ЭГТА и двух фиксированных концентраций активатора 100 нм (верхняя кривая) и 10 нм (нижняя кривая)

скольку одновременно выполняются два следующих условия: если бы в ходе зонального элюирования включенный в подвижную фазу аналог субстрата влиял на связывание пептида путем прямого взаимодействия с иммобилизованной ФДЭ, например, вследствие конку-

реции за центр посадки, то насыщающие концентрации $\text{sAMP}(\text{Vt})_2$ неизбежно привели бы к элюции пептида с колонки. Однако в наблюдаемом случае десорбция пептида (10 нМ) неосуществима даже при концентрации аналога sAMP 100 мкМ, и сродство субстрата к ферменту по активному центру ФДЭ остается неподверженным действию синтетического фрагмента при высоких его концентрациях. Последний вывод сделан с привлечением данных, представленных на рис. 3, а, из которого следует, что действие нонапептида приобретает неконкурентный характер по отношению к субстрату и направлено только на изменение скорости гидролиза sAMP .

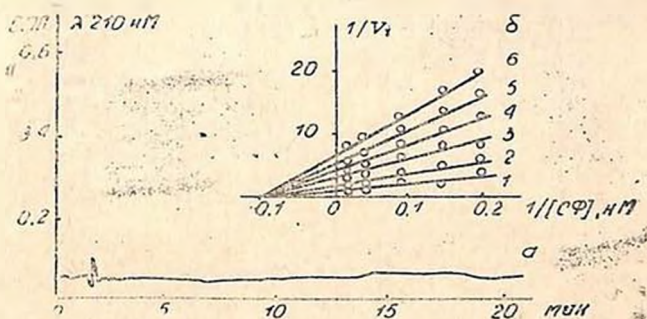


Рис. 4. Аффинная ВЭЖХ синтетического фрагмента (11—19) С-модуля 3 на колонке PDE-Biosphere (4,6×150 мм). Элюцию осуществляли в изократическом режиме 25 мМ трис-НСl буфером, рН 7,0, содержащим 2 мМ ЭГТА, 5 мМ MgCl_2 , 0,1 мМ азид-натрия, 1 мМ дитиотрептола, 200 мкМ $\text{sGMP}(\text{Vt})_2$ со скоростью потока 0,5 мл/мин при 30°. Обнаружение продукта при λ 220 нм. В правом верхнем углу представлен график зависимости начальной скорости гидролиза sAMP от концентрации активатора в присутствии фиксированных концентраций sGMP , равных (в мкМ): 1—0, 2—1, 3—10, 4—100, 5—500, 6—1000 в двойных обратных координатах. Эксперимент проведен в присутствии 2 мМ ЭГТА при концентрации субстрата sAMP 5 мкМ

Для проверки действия пептида на регуляторный sGMP -связывающий центр молекулы фермента проведен эксперимент, результаты которого представлены на рис. 4, а. Согласно хроматограмме, sGMP -зависимая элюция не приводит к появлению в профиле элюции пика. Как и в случае sAMP , сделан вывод о неконкурентном типе взаимодействия, что подтверждается результатами кинетического анализа, представленными на рис. 4, б. Согласно полученным данным, sGMP не влияет на сродство активатора к ферменту и величина K_i , равная 10 нМ, остается неизменной при существенном уменьшении скорости гидролиза sAMP . Таким образом, исключается также возможность связывания пептида через sGMP -регуляторный центр.

Для уточнения характера активации ФДЭ под действием синтетического фрагмента в присутствии кальмодулина рассмотрим результаты эксперимента, представленные на рис. 5.

График зависимости активности фермента под действием кальмодулина в присутствии фиксированных концентраций синтетического фрагмента, приведенный на рис. 5, б, показывает, что степень активации ФДЭ под действием кальмодулина в сочетании с синтетическим фрагментом выше, чем тот же параметр для активации ФДЭ комплексом Ca^{2+} -кальмодулин. При этом кажущаяся величина K_a фермента под действием кальмодулина, равная 2 нМ, остается неизменной, следовательно, влияние синтетического фрагмента и каль-

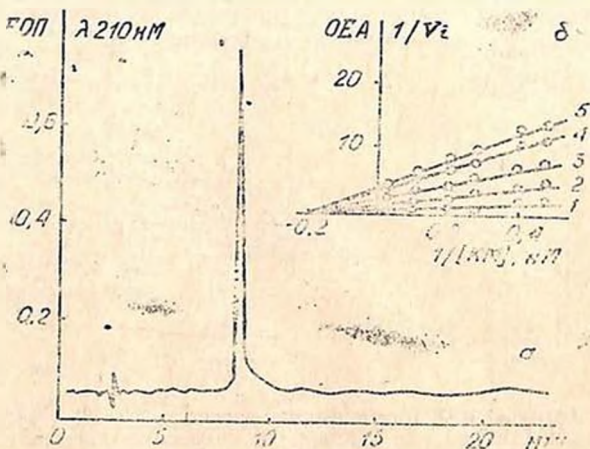


Рис. 5. Аффинная ВЭЖХ синтетического фрагмента (11—19) С-модулина 3 на колонке CaM-Biosphere (4,6×150 мм). Элюцию осуществляли в изократическом режиме 25 мМ трис-НСI буфером, рН 7,0, содержащим 2 мМ ЭГТА, 5 мМ MgCl_2 , 0,1 мМ аспид-натрия, 1 мМ дитиотрептола со скоростью потока 0,5 мл/мин при 30°. Обнаружение продукта при λ 210 нм. В правом верхнем углу представлен график зависимости начальной скорости гидролиза сАМР от концентрации кальмодулина в присутствии фиксированных концентраций синтетического фрагмента, равных (в нМ): 1—1000, 2—100, 3—10, 4—1, 5—0 в двойных обратных координатах. Эксперимент проведен в присутствии 2 мМ CaCl_2 при концентрации сАМР 5 мкМ

модулина на активность ФДЭ носит аддитивный характер. Можно предположить, что связывание синтетического фрагмента и кальмодулина с молекулой ФДЭ, по всей вероятности, носит некооперативный характер. Однако не исключается возможность образования активного комплекса пептид-кальмодулин, способного также индуцировать стимуляцию гидролиза сАМР. Поэтому было предпринято специальное исследование с привлечением аффинной ВЭЖХ колонки, где в качестве неподвижной фазы применялся иммобилизованный кальмодулин. Результаты хроматографии представлены на рис. 5, а. Как видно из хроматограммы, как в присутствии, так и в отсутствие ионов Ca^{2+} , элюция синтетического фрагмента с колонки CaM-Biosphere достигается уже при незначительном изменении элюирующей силы. Поэтому маловероятно, что синтетический фрагмент обладает

сколь-нибудь специфическим средством к молекуле кальмодулина, и связывание с иммобилизованным биорегулятором является следствием неспецифической сорбции на поверхности лиганда за счет ее гидрофобности.

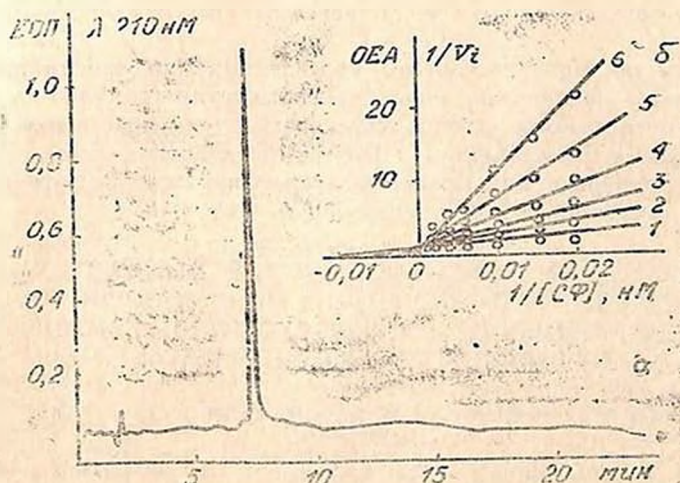


Рис. 6. Аффинная ВЭЖХ синтетического фрагмента (11—19) С-модулина на колонке PDE-Biosphere (4,6×150 мм). Элюцию осуществляли в изократическом режиме 25 мМ трис-HCl буфером, pH 7,0, содержащим 2 мМ ЭГТА, 5 мМ $MgCl_2$, 0,1 мМ азид-натрия, 1 мМ динитрофенола и 500 мкМ фосфатидилсерина, со скоростью потока 0,5 мл/мин при 30°. Обнаружение продукта при λ 210 нм. В правом верхнем углу представлен график зависимости начальной скорости гидролиза cAMP от концентрации активатора в присутствии фиксированных концентраций фосфатидилсерина, равных (в мкМ): 1—0, 2—1, 3—10, 4—100, 5—500, 6—1000 в двойных обратных координатах. Эксперимент проведен в присутствии 2 мМ ЭГТА при концентрации cAMP 5 мкМ.

С использованием аффинной ВЭЖХ с зональным элюированием была изучена взаимодействующая трехкомпонентная система синтетический фрагмент-ФДЭ-фосфатидилсерин. На рис. 6, а представлены результаты, полученные при элюировании зон синтетического фрагмента с колонки PDE-Biosphere при различных концентрациях фосфатидилсерина в элюирующем буфере. Линейность зависимости $1/V_0$ от концентрации фосфатидилсерина отражает природу конкурентного взаимодействия с молекулой ФДЭ. Эта зависимость была использована для расчета величины K_a комплекса ФДЭ-синтетический фрагмент, которая практически совпадает с величиной K_a для модулятора в кинетических экспериментах (рис. 6, б). Зависимость активности ФДЭ в присутствии различных концентраций фосфатидилсерина от концентрации синтетического фрагмента (рис. 6, б) линейна, что свидетельствует об отсутствии кооперативности. Эффективная константа сродства пептида с ФДЭ, равная 10 нм, увеличивается с ростом концентрации фосфатидилсерина, одновременно мак-

симальная скорость гидролиза претерпевает лишь незначительное изменение. Представленный на рис. 6, б эффект действия фосфатидилсерина следует отнести к случаю классического конкурентного ингибирования. Следовательно, можно говорить о существовании единого центра связывания Ca^{2+} -независимых регуляторов на молекуле ФДЭ.

Таким образом, результаты проведенных наблюдений позволяют заключить о наличии на молекуле кальмодулинстимулируемой ФДЭ гипоталамуса некоего центра, способного взаимодействовать с Ca^{2+} -независимыми регуляторами. Внутримолекулярная связь подобного центра направлена на стимуляцию гидролиза циклических нуклеотидов при лимитированной концентрации Ca^{2+} .

THE ANALYSIS OF PARAMETERS OF THE INTERACTION OF THE SYNTHETIC FRAGMENT (11—19) OF C-MODULIN 3 WITH CALMODULIN-DEPENDENT CYCLIC NUCLEOTIDES PHOSPHODIESTERASE OF HYPOTHALAMUS

ABRAHAMIAN G. E., ISADJANIAN M. A., CHAILIAN S. G., KIRAKOSOVA A. S., GALOYAN A. A.

H. Ch. Bunlatian Institute of Biochemistry, Acad. Sci. of Armenia Yerevan

In this paper it is shown that the active part of C-modulin 3 molecule is the fragment 11—19, possessing high affinity to CaM-dependent PDE molecule of the hypothalamus. The interaction of the fragment with the enzyme brings to the essential stimulation of cAMP hydrolysis: the level of PDE activity can be compared with the one for PDE activity induced by CaM.

It is supposed the existence of a center on PDE molecule different from CaM-regulating and able to interact with Ca^{2+} -independent modulators.

ЛИТЕРАТУРА

1. La Porte D. C., Wierman B. M., Storn D. R. Biochemistry, v. 19, p. 3311—3319, 1989.
2. Wasserman R. H.—In: Novel calcium-binding proteins (ed. C. W. Heizman), p. 7—13. Springer-Verlag, Berlin, 1991.
3. Галоян А. А., Бобрускин И. Д., Гуриц Б. Я., Абрамян Г. Э. Нейрохимия, т. 9, № 4, с. 450—459, 1990.
4. Галоян А. А. Нейрохимия, т. 9, № 2, с. 273—286, 1990.
5. Galoyan A. A., Gurits B. Ya., Shatalova N. A., Shale'y R., Lee M. Neurochem. Research, v. 17, № 8, p. 773—777, 1992.
6. Thompson W. J., Appleton A. M. Biochemistry, v. 10, p. 311—318, 1971.
7. Абрамян Г. Э., Исаджанян М. А., Чаилин С. Г., Киракосова А. С., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 10, № 3, 4, 1991.
8. Абрамян Г. Э., Чаилин С. Г., Исаджанян М. А., Киракосова А. С., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 11, № 2, 1991.

Поступила 22. V. 1992