УДК 547.964.4:591.481.1:57.083.3

РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ ПЕПТИД δ-СНА-ПОДОБНОГО МАТЕРИАЛА В РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНАХ И ОТДЕЛАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ

РОЖАНЕЦ В. В., ЮХАНАНОВ Р. Ю., ЧИЖЕВСКАЯ М. А., НАВОЛОЦКАЯ Е. В.

Разработан чувствительный метод радиоиммунологического анализа (РИА) содержания пептид δ-сна (ПДС)-подобного материала в экстрактах органов крысы, позволяющий обнаруживать 3—4 фмоль пептида в пробе. Метод обладает высокой специфичностью: процент перекрестных реакций с 11 испытанными нейропептидами не превышает 0,1%. С помощью гель-фильтрации и ионообменной хроматографии получены доказательства идентичности иммунореактивного материала экстракта мозга и синтетического ПДС. В отличие от этого иммунореактивность экстрактов печени и почек частично обусловлена наличием каких-то других соединений. Содержание ПДС-подобного материала в экстрактах органов крысы, а также мозга и 9 изученных его отделов, составляет 1—3 фмоль/мг ткани. Показано, что ПДС-подобная иммунореактивность локализуется в основном во фракциях внесинаптических митохондрий и миелина, а не в синаптосомах. На основании собственных и литературных данных обсуждается возможная роль ПДС как внутриклеточного регулятора.

В 1974 году группа швейцарских исследователей опубликовала данные о структуре нанопептида Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu, выделенного ими из гемодиализаторов кроликов, подвергнутых гипногенной стимуляции области таламуса. По данным этих авторов, как природный, так и синтетический пептиды при различных способах введения увеличивали амплитуду и продолжительность низкочастотных так называемых дельта-волн на энцефалограмме животных-реципиентов [1]. Соединение получило название Delta Sleep Inducing peptide—пептид δ-сна.

В настоящее время имеется лишь одно сообщение о радиоиммунологическом выявлении ПДС-подобной иммунореактивности (ИР) в экстрактах мозга и некоторых органах крысы [2]; субклеточная локализация этого материала не изучалась.

Целью настоящего исследования явилось радиоиммунологическое изучение содержания ПДС-подобного материала в отделах и субклеточных фракциях головного мозга, а также в различных органах крысы.

Материалы и методы

Получение антител к ПДС. Синтезированный ПДС [3] конъюгировали с овальбумином («Calbiochem», США) с помощью глютарового альдегида («Sigma», США). Реакционная смесь содержала в 1 мг ПДС, 1,0 мг овальбумина, 10^4 имп/мин [^{3}H]-ПДС* в 200 мкл 0,1 М фосфатного буфера, pH 7,4. Реакцию начинали добавлением 10 мкл 5%-ного глутарового альдегида. После 10 мин инкубации при 25° реакционную смесь наносили на колонку с сефадексом G-15 («Pharmacia», Швеция). Элюцию проводили тем же фосфатным буфером. Фракцию конъюгата определяли по пику радиоактивности, выходящему с V_0. Для определения количества молекул ПДС, связавшихся с одной молекулой овальбумина, аликвоту фракции конъюгата диализовали в течение суток против 200 объемов того же буфера. Количество белка в конъюгате определяли, используя в качестве стандарта тот же препарат овальбумина. При типичной конъюгации эта величина составляла 9—10 моль ПДС/моль белка.

Для иммунизации использовали кроликов-самцов шиншилла массой 2,5—3,0 кг; всего было использовано 5 животных. Неадсорбированный конъюгат (0,5 мг белка/0,5 мл буфера) смешивали до получения гомогенной эмульсии с 0,5 мл полного адъюванта Фрейнда («Calbiochem», США). В области обоих подколенных лимфоузлов задних ног вводили по 0,3 мл свежеприготовленной эмульсии. Повторные иммунизации проводили через 1, 4, 10 и 12 месяцев после первой, вводя 0,3 мл свежеприготовленной эмульсии конъюгата в область одного из подколенных лимфоузлов и противоположной лопатки. Отбор крови после иммунизации проводили из ушной вены еженедельно в течение месяца. Определение титра антител к овальбумину и ПДС осуществляли с помощью иммунодиффузии по Ouchterlony и связывания [^{3}H]—ПДС. Максимальный титр антител к ПДС был достигнут через 2 недели после пятой иммунизации, причем титр антител к овальбумину не превышал 1:100.

Йодирование тирозильных аналогов ПДС. Тирозильные аналоги с замещениями в 6, 7, 8 положениях (Туг-ПДС) йодировали с помощью лактопероксидазы [2]. Реакционная смесь содержала 1 мK_u ^{125}I («Amersham», Англия), 10 мкг пептида, 20 мкг лактопероксидазы («Boeringer», ФРГ), 37 нмоль H_2O_2 в 37 мкл фосфатного буфера, 0,5 М, pH 7,4. Реакцию проводили 10 мин при 25° и интенсивном перемешивании. После остановки реакции добавлением 50 мкг $Na_2S_2O_5$ смесь наносили на микроколонку с ДЕАЕ-целлюлозой ДЕ-52 («Whatman», Англия).

Очистка меченых пептидов. Для очистки [^{3}H]-ПДС и [^{125}I]-Туг^6-

---

* Неочищенный препарат [^{3}H]-ПДС, полученный в Институте молекулярной генетики АН СССР (Москва) с помощью изотопного обмена из пептида, синтезированного в Институте биоорганической химии АН СССР (У. А. 0,3 K_u/ммоль), был нам любезно предоставлен Н. Ф. Мясоедовым. Очистку [^{3}H]-ПДС проводили на ДЕАЕ-целлюлозе, как описано в разделе «Очистка меченых пептидов».

ПДС от продуктов радиолиза и примесей использовали хроматографию в градиенте концентрации аммоний-ацетатного буфера (0,1—0,4 М, pH 6.7). Этот метод позволяет очистить [^{125}I] Туг^{6}-ПДС от исходного пептида (рис. 1). Удельная активность йодированного пептида после очистки почти равна активности использованного изотопа и превышает 1000 К$_{и}$/ммоль.

Связывание ^{125}I-Tyr-ПДС с сывороткой. Все растворы для РИА готовили на так называемом РИА-буфере: 0,5% бычьего сывороточного альбумина (БСА) («Reanal», ВНР), 0,05 азида натрия («Sigma», США), в 50 мМ трис-HCl буфере, pH 7,8. Каждая проба содержала по 0,1 мл [^{125}I]-Туг^{6}-ПДС. (7×10^{3} имп/мин), 0,1 мл раствора ПДС или тестируемого экстракта, 0,2 мл РИА-буфера и 0,1 мл иммунной сыворотки в разведении 1:5000. Таким образом, конечное разведение сы-

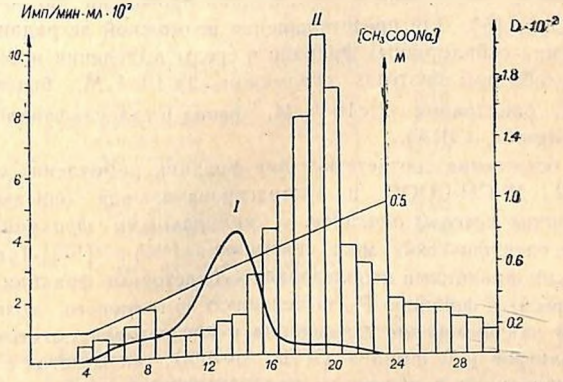

Рис. 1. Очистка ^{125}I-тирозильных производных ПДС на ДЕАЕ-целлюлозе ДЕ-52 в градиенте концентрации ацетат-аммониевого буфера, pH 6,7 при 25°. Микроколонка 0,5×20,0 см, скорость элюции 9 мл/ч. I—позиция пика исходного ПДС, II—позиция пика ^{125}I

воротки в 0,5 мл инкубационной смеси составляло 1:25000. После 40—42 ч инкубации при 4° антитела осаждали добавлением 0,1 мл 0,1%-ного раствора γ-глобулина (фракция 5, «Calbiochem», США) с последующим добавлением 0,6 мл насыщенного раствора сульфата аммония. Через 30 мин пробы центрифугировали при 3000 g и 4°. Надосадочную жидкость удаляли, радиоактивности осадков определяли с помощью γ-флаконов в сцинтилляционном счетчике «Beckman SL—9000» (США).

Выделение и экстракция ткани. В работе использовали самцов беспородных белых крыс массой 250—300 г. После декапитации животных мозг немедленно извлекали и разделяли на льду на 9 основных областей по Glovinski, Iversen [4]. Кусочки ткани сразу же замораживали в жидком азоте и хранили далее при —70° до суток. Замороженную ткань взвешивали и помещали во флаконы с 0,1 М CH_3COOH, нагретой до 100° (6 мл/1 г ткани), быстро измельчали скальпелем на кусочки массой

не более 50 мг. Через 10 мин инкубации при 100° флаконы охлаждали на льду, гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком и центрифугировали при 20 000 g на холоду. Осадок дважды промывали тем же объемом 0,1 М CH_3COOH, супернатанты объединяли и лиофилизовали. Лиофилизованный материал при необходимости хранили на холоду до 1 недели, далее растворяли в РИА-буфере (2 мл/1 г исходной ткани), центрифугировали 5 мин при 8000 g, супернатант собирали и хранили при —20° до 2 недель. После размораживания непосредственно перед измерением экстракт центрифугировали повторно. Ткани других органов и сыворотку крови экстрагировали аналогично.

Выделение субклеточных фракций мозга. Выделение, а также электронномикроскопический и энзиматический контроль фракций синаптических мембран, синаптосом и митохондрий проводили по описанной ранее методике [5]. Для предотвращения возможной деградации ПДС при выделении субклеточных фракций в среды выделения и осаждения вводили ингибиторы протеаз: пуромицин—2×10^{-5} М, бензамидин—4×10^{-5} М, бацитрацин—2×10^{-5} М, фенилметилсульфанилфторид—10^{-5} М («Sigma», США).

После осаждения соответствующие фракции немедленно суспендировали в 0,1 М CH_5COOH и экстрагировали, как описано выше.

Связывание меченых пептидов с мембранными фракциями. Для выявления специфических мест связывания [^{3}H]- и [^{125}I]-Тир^6-ПДС с мембранными фракциями использовали субклеточные фракции головного мозга крысы и фракцию P_2, выделенную из головного мозга быка. Применяли как измерение связывания с использованием стекловолокнистых фильтров («Whatman» GF/B, Англия), так и метод с быстрым центрифугированием и подсчетом радиоактивности проб в осадке, что позволяло использовать от 1—3 до 10—12 мг белка мембранных фракций в 1 мл пробы соответственно. Концентрацию [^{3}H]-ПДС в инкубационной смеси варьировали от 10^{-5} до 10^{-8} М, концентрации [^{125}I]-Тир^6-ПДС—от 10^{-7} до 10^{-10} М. Инкубацию проводили как при 4°, так и при 37° от 10 мин до 1. Для защиты меченых пептидов от протеолиза использовали либо набор ингибиторов протеаз, перечисленных выше, либо добавляли в среду инкубации 0,5% БСА («Reanal», ВНР) и 10^{-3} М ЭДТА («Sigma», США). Как показали предварительные опыты, в обоих случаях при инкубации на холоду за 1 ч гидролизуется не более 60—70% от добавленных к пробе 3 нмоль [^{3}H]-ПДС. В качестве буфера в среде инкубации употребляли трис-HCl, 0,05 М, pH 7,4 и натрий-фосфатный или бикарбонатный буферы той же молярности и с тем же pH. Использовали также добавки $CaCl_2$ и $MgCl_2$ (1—2×10^{-3} М), NaCl и KCl (50—100×10^{-3} М). Для подавления возможного специфического связывания к пробам добавляли немеченый ПДС в концентрациях 10^{-3}—10^{-6} М.

Содержание белка в пробах определяли по модифицированному методу Lowry [6].

Результаты исследований

Проверка чувствительности и специфичности РИА. Наиболее активным конкурентом ПДС за связь с антителами является тирозильное производное пептида с замещением в шестом положении (Тур^6-ПДС), которое мы и использовали в работе (табл. 1). Проверка специфичности метода с целым рядом других нейропептидов показала весьма низкий процент перекрестных реакций, как правило, не превышающий 0,01%.

Таблица 1

Специфичность использованной сыворотки по отношению к различным пептидам

Соединение	Перекрестная иммунореактивность, %
ПДС	100
Тур^6-ПДС	100
Тур^7-ПДС	5
Тур^8-ПДС	0,2
Ala^3-ПДС	1
*Ava(3—4)	0,5
Met-энкефалин	0,01
Leu-энкефалин	0,01
α-эндорфин	0,01
γ-эндорфин	0,01
β-эндорфин	0,01
Ангиотензин	0,02
Соматостатин	0,1
Брадикинин	0,01
Инсулин бычий	0,05
Люлиберин	0,02
Кортикотропин$_{1-24}$	0,01
Смесь аминокислот, имитирующая аминокислотный состав ПДС	0,01

* производное ПДС, в котором фрагмент-Gly^3-Gly^4 заменен на остаток аминовалериановой кислоты

Таблица 2

Содержание ПДС-подобного материала в экстрактах головного мозга некоторых грызунов и различных органах крысы

Вид животных и орган	Концентрация, фмоль/мг ткани	Концентрация, фмоль/мг белка*
Суслик крапчатый Головной мозг	0,22±0,04 (7)	
Мышь, линия В 10-R III Головной мозг	2,70±0,08 (12)	11,9±1,8 (10)
Крыса беспородная Головной мозг	1,28±0,20 (10)	
Печень	0,83±0,25 (3)	
Сердце	1,17±0,10 (2)	
Почки	0,65±0,05 (3)	
Легкие	0,88±0,26 (3)	
Мышцы	2,91±1,65 (2)	
Сыворотка крови	—	4,4±1,3 (2)

Примечание. В скобках—число опытов;
* пересчет на мг белка лиофилизованного экстракта.

Чувствительность метода в его обычном варианте позволяет достоверно измерить от 10 до 100 фмоль ПДС-подобной ИР. В специальных случаях, уменьшая количество [^{125}I]-Тур^6-ПДС и увеличивая время под-

счета радиоактивности, удается повысить чувствительность метода до 3—4 фмоль ПДС-подобной ИР в пробе.

Изучение содержания ПДС-подобной ИР в головном мозгу грызунов и различных органах крысы. Содержание ПДС-подобного материала в головном мозгу исследованных грызунов невелико и составляет 0,22—2,7 фмоль на 1 мг ткани (табл. 2). Содержание ПДС-подобной ИР в экстрактах головного мозга бодрствующих крапчатых сусликов невелико и составляет в среднем 8 и 17% от содержания у мышей и крыс*.

Мы не обнаружили достоверных различий в содержании ПДС-подобной ИР в экстрактах различных органов крысы. Можно утверждать, что столь равномерное распределение ИР не может объясняться примесью крови в органах, так как при пересчете на 1 мг белка содержание ПДС-подобной ИР в сыворотке крови существенно ниже, чем, например, в мозгу.

Хроматографическая идентификация ПДС-подобной ИР экстрактов органов крысы. Необходимым, хотя и недостаточным критерием специфичности выявляемой ИР является коллинеарность калибровочной кривой для исследуемого пептида с соответствующей кривой, полученной для разных концентраций изучаемого экстракта. Кривые, полученные с экстрактами печени и мозга, неколлинеарны (рис. 2). В то же время лишь кривая, полученная с экстрактом мозга, коллинеарна калибровочной кривой, полученной с синтетическим ПДС.

Таблица 3

Распределение ПДС-подобной иммунореактивности по областям головного мозга крысы

Область мозга	Содержание фмоль/мг ткани
Фронтальная кора	1,08±0,11 (3)
Затылочная кора	1,79±0,18 (5)
Гиппокамп	3,15±1,40 (4)
Таламус	1,02±0,11 (6)
Гипоталамус	1,65±0,09 (3)*
Стриатум	1,36±0,27 (6)
Мозжечок	1,38±0,53 (4)
Средний мозг	1,98±0,25 (4)*
Продолговатый мозг	1,45±0,22

Примечание. В скобках—число животных;
* $p<0,05$ по сравнению с таламусом

Фракционирование экстракта печени на сефадексе G-25 показало наличие двух пиков ПДС-подобной ИР (I и II на рис. 3), из которых лишь I совпадает с позицией пика, соответствующего синтетическому ПДС. Но при фракционировании экстракта мозга в тех же условиях наблюдался лишь один пик ПДС-подобного материала, совпадавший с позицией ПДС.

* Эти эксперименты выполнены совместно с Л. Н. Крамаровой и С. Г. Колаевой, Институт биофизики АН СССР, Пущино-на-Оке.

Последовательное фракционирование ИР материала экстракта мозга на сефадексах G-25, LH-20 и ДЕАЕ-целлюлозе (ДЕ-52) давало единственный пик ПДС-подобной ИР, всегда совпадавший с позицией пика ПДС (рис. 4).

В совокупности эти данные позволяют утверждать с высокой степенью вероятности, что ИР экстракта мозга крыс обусловлена наличием в нем ПДС, а печени—не только ПДС, но и какими-то другими соединениями.

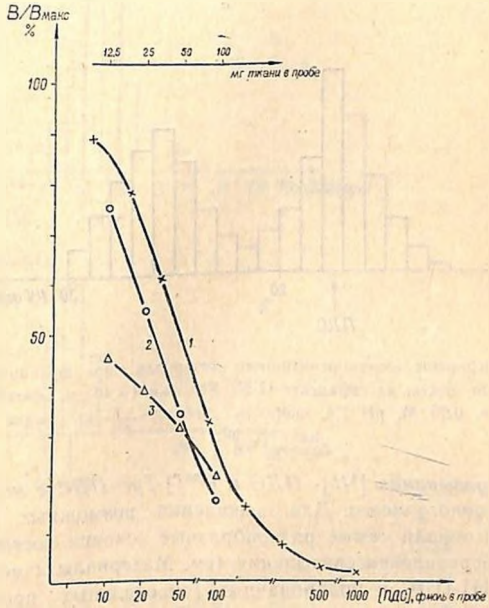

Рис. 2. Типичная калибровочная кривая γ-зависимости количества (^{125}I)-Tyr^0-ПДС, связанного с сывороткой от содержания синтетического пептида или аликвоты экстрактов тканей (1), 2—экстракт головного мозга; 3—экстракт печени (и почек) крысы. На вставочной шкале вверху приведены навески ткани, соответствующие использованным аликвотам экстрактов

Распределение ПДС-подобной ИР в различных отделах и субклеточных фракциях головного мозга крысы. ПДС-подобная ИР довольно равномерно распределена в различных областях мозга (табл. 3). Наименьшая концентрация ИР найдена в таламусе, где она достоверно ниже, чем в затылочной коре, гипоталамусе и среднем мозгу. Сравнение результатов, приведенных в табл. 2, 3, позволяет заключить, что ни в одном из данных отделов мозга содержание ПДС-подобной ИР не отличается от содержания в целом органе.

Анализ экстрактов субклеточных фракций показал, что ПДС-по-

добная ИР содержится главным образом во внесинаптических митохондриях и миелине, содержание же ее в синаптосомах примерно на порядок ниже, чем в митохондриях (табл. 4). Несмотря на небольшое количество опытов, эти данные позволяют утверждать, что ПДС, по-видимому, не концентрируется в нервных окончаниях и по этому признаку не может быть отнесен к предполагаемым нейропередатчикам или нейрогормонам.

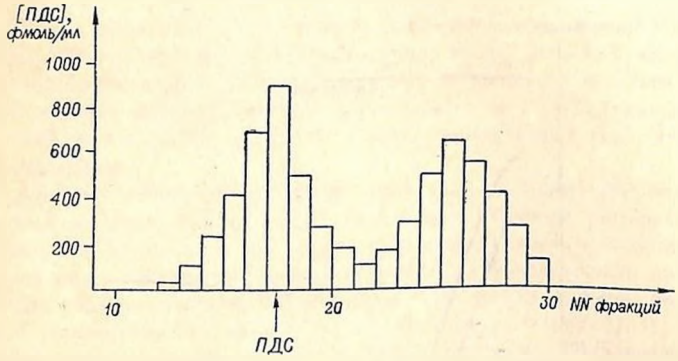

Рис. 3. Содержание иммунореактивного материала при фракционировании экстракта печени на сефадексе G-25. Колонки 1×40 см, элюция трис-HCl-буфером, 0,05 М, pH 7,4, скорость элюции—5,5 мл/ч, одна фракция—12 мин

Изучение связывания [^3H]- *ПДС и* [^{125}I]-*Tyr*^{6}-*ПДС с мембранными фракциями головного мозга.* Для выявления возможных рецепторов ПДС мы использовали самые разнообразные условия постановки опытов и методы определения связывания (см. Материалы и методы). При применении [^3H]-ПДС и йодировачных тирозильных производных с замещениями в 6, 7, 8 положениях нам не удалось обнаружить специфического связывания данных лигандов ни с одной из мембранных фракций головного мозга крупного рогатого скота и крысы.

Обсуждение результатов

Полученные результаты свидетельствуют прежде всего о весьма низком содержании ПДС-подобной ИР в отделах головного мозга и различных органах крыс. Эти величины сравнимы с содержанием бомбезинподобной ИР [7] и в несколько десятков раз ниже, чем содержание энкефалинов и эндорфинов в головном мозгу [8, 9]. Содержание ПДС-подобной ИР в экстрактах головного мозга, по нашим данным, в несколько раз ниже, по сравнению с данными Kastin и соавт. [2]. Это можно объяснить как различием пород и условиями содержания животных, так и более высокой специфичностью использованных нами антител и разной химической структурой меченых антигенов. Распределение ПДС-

подобного материала по регионам мозга довольно равномерно. Имеющиеся отличия, на наш взгляд, не являются существенными для функционирования пептида, так как ни в одной из областей мозга нет значимого превышения концентрации ИР над ее содержанием в целом мозгу. Следует отметить, что наши данные опровергают предположение Kastin

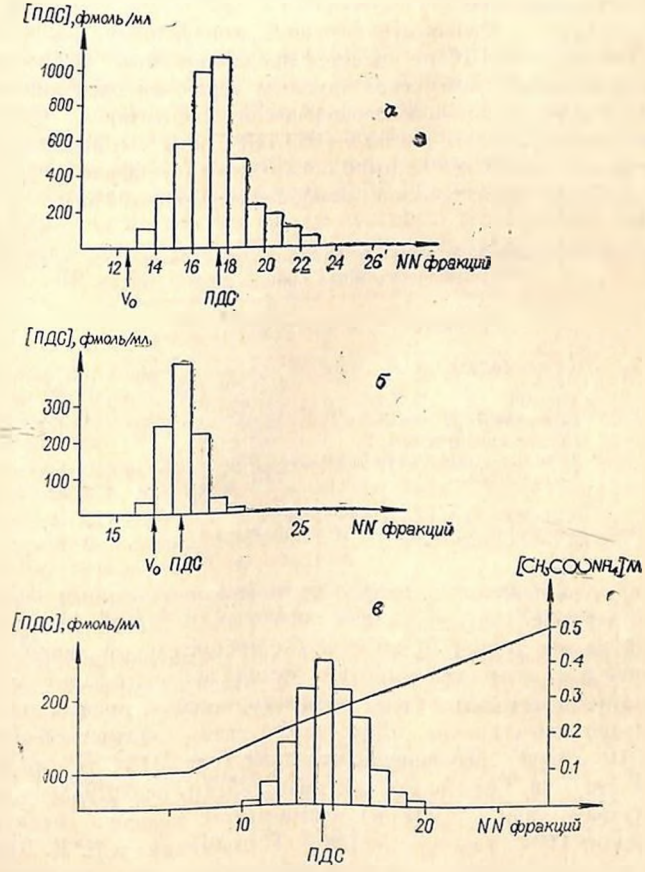

Рис. 4. Последовательное фракционирование экстракта мозга: *а*—иммунореактивность элюата при хроматографии на сефадексе G-25. Условия фракционирования те же, что и на рис. 3; *б*—иммунореактивность активных фракций предыдущего фракционирования при рехроматографии на сефадексе LH-20. Колонка 1×40 см, элюция 50%-ным водным метанолом, скорость элюции—4 мл/ч, 1 фракция—16 мин; *в*—иммунореактивность элюатов при рехроматографии активных фракций предыдущего фракционирования на ДЕАЕ-целлюлозе ДЕ-52 в градиенте концентрации ацетат-аммониевого буфера, pH 6,9. Колонка 1×40 см, скорость элюции—6,4 мл/ч, 1 фракция—16 мин

и соавт. [2] об особой роли таламуса, так как в этой области найдена наименьшая концентрация ПДС-подобной ИР.

Среднее содержание ПДС-подобного материала в головном мозгу крысы не выше, чем в других исследованных органах. Это, однако, не означает, что ПДС не может быть отнесен к нейропептидам, так как значительная часть ИР периферических органов обусловлена отличными от ПДС соединениями.

По результатам изучения субклеточной локализации данной ИР можно заключить, что ПДС не является предполагаемым нейрогормоном или нейропередатчиком, секретируемым нервными окончаниями и действующим далее с помощью специфических рецепторов. Об этом свидетельствует и тот факт, что ни с [^{3}H]-ПДС, ни с его йодированными тирозильными аналогами не было обнаружено специфических участков связывания на синаптических мембранах головного мозга крысы.

Таблица 4

Распределение ПДС-подобной иммунореактивности по субклеточным фракциям головного мозга крысы

Фракция	Содержание фмоль/мг белка
Ядра	1,20±0,28
Миелин	35,0±5,8
Синаптические мембраны	14,0±3,2
Легкие синаптосомы	6,1±1,6
Тяжелые синаптосомы*	≤ 75
Митохондрии	78,0±7,1

Примечание. Количество опытов—2; * одно измерение

В литературе накопилось немало противоречивых данных о физиологическом действии ПДС на разных животных. В одной из последних публикаций на эту тему [10] содержится обстоятельный анализ этих противоречий и их возможных причин. Авторы приходят к выводу, что этот пептид не может быть отнесен к «факторам сна», так как его действие неспецифично и вполне объясняется неким «антистрессорным» эффектом. Но следует подчеркнуть, что даже если ПДС не является «фактором сна», он, безусловно, способен оказать психотропное влияние [11]. Однако лишь в последнее время начато изучение механизма его действия на ЦНС. Так, по данным И. П. Ашмарина и Е. Л. Доведовой, ПДС в низких концентрациях способен увеличивать моноаминооксидазную (типа А) активность митохондрий головного мозга [12], что согласуется с выявленной нами преимущественной локализацией ПДС-подобной ИР во фракции митохондрий мозга крыс.

Авторы благодарят вице-президента АН СССР акад. Ю. А. Овчинникова, предоставившего возможность для выполнения части данной работы в Институте биоорганической химии АН СССР им. М. М. Шемякина, а также чл.-кор. АН СССР В. Т. Иванова за поддержку и плодотворное обсуждение статьи.

REGIONAL DISTRIBUTION OF DELTA-SLEEP INDUCING PEPTIDE (DSIP) LIKE IMMUNOREACTIVITY IN RAT BRAIN AND OTHER ORGANS

ROZHANETS V. V., JUKHANANOV R. Yu., CHIZHEVSKAYA M. A., NAVOLOTSKAYA E. V.

Institute of Pharmacology, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

A sensitive and highly specific RIA has been developed to detect DSIP-like immunoreactivity in rat brain different areas and other organs. The method makes it possible to detect 3—4 phemtomoles of the peptide/probe. The brain extracts immunoreactivity is indistinguishable from DISP, the one from liver differs from it (established by gel-filtration and ionexchange chromatography). DSIP-like immunoreactivity is localized mainly in the fraction of non-synaptical mitochondria and its amount doesn't differ essentially among 9 brain areas tested. A possible role of DSIP as an intracellular effector is considered.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Monnier M., Dudier L., Gacher R., Maier P. F., Schoenenberger G. A.* Experientia, 33, 548—552, 1974.
2. *Kastin A. J., Nissen Ch., Schally A. V., Coy D. N.* Brain Res. Bulletin, 3, 691—695, 1978.
3. *Саргсян А. С., Сумская Л. В., Александрова И. Ю., Безруков М. В., Михалева И. И., Иванов В. Т., Балабан П. Н.* Биоорганич. химия, 7, 1125—1132, 1981.
4. *Glovinski J., Iversen L. L.* J. Neurochemistry, 13, 655—669, 1966.
5. *Родина В. И., Салата Л. В., Рожанец В. В., Поздняков О. М., Глебов Р. Н.* Бюл. экспер. биол. и мед., 89, 143—145, 1980.
6. *Lies M. B., Rachman S.* Anal. Biochemistry, 47, 184—192, 1972.
7. *Brown M., Allen R., Villareal J., Rivier J., Vale W.* Life Sci. 23, 2721—2728, 1978.
8. *Ross M., Chararossian V., Cox B. M., Goldfin A.* Life Sci., 22, 1123—1130, 1978.
9. *Gros C., Pradelles P., Rougert C., Bepoldin O., Dray F., Fournie-Zaluski M. C., Roques B. P., Pollard H., Llorens-Cortes C., Schwartz J. C.* J. Neurochemistry, 31, 29—41, 1978.
10. *Tolber J., Borbely A. A.* Waking and Sleeping, 4, 139—153, 1980.
11. *Kafi S., Monnier M., Gallard J. M.* Neuroscie. Lett., 169, 13, 169—175, 1979.
12. *Ашмарин И. П., Доведова Е. Л.* ДАН СССР, 252, 1501—1503, 1980.

Институт фармакологии АМН СССР, Москва Поступила 30. VII 1982