

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 612.822.1:577.112.083

**ВЫДЕЛЕНИЕ ОПИАТСВЯЗЫВАЮЩИХ МЕМБРАННЫХ
БЕЛКОВ С ПОМОЩЬЮ β -ЭНДОРФИН- ω -
АМИНОГЕКСИЛСЕФАРОЗЫ**

Изыкенова Г.А., Таранова Н.П.

Институт физиологии им. И.П.Павлова АН СССР, Ленинград

Получен аффинный сорбент β -эндорфин- ω -аминогексилсефароза 4В, который применен для выделения опиатсвязывающих белков из синаптических мембран головного мозга крыс. Выделены две основные фракции белков, обладающие сродством к [3 H]налоксону. Выделенные белки исследованы с помощью электрофокусирования и ДДС-Na-электрофореза. Показано, что использование сорбента с иммобилизованным эндогенным пептидом дает возможность выделить опиатсвязывающие мембранные белки.

* * *

Для понимания механизмов функционирования ЦНС представляет интерес изучение структуры и функций опиатных рецепторов головного мозга. Решение этих задач требует выделения и очистки опиатных рецепторов в нативном состоянии из ткани мозга. К настоящему времени описаны результаты выделения опиатсвязывающих мембранных белков из головного мозга млекопитающих, которые относят к опиатным рецепторам μ -и/или δ -типа [1—6]. При очистке этих рецепторов были использованы аффинные сорбенты, содержащие в качестве специфических лигандов фармакологические препараты—производные кодеина и морфина или ковалентно иммобилизованный (D-Ala², Leu⁵)-энкефалин (DALA)—синтетический аналог Leu-энкефалина [7, 8]. Эндогенные опиоидные пептиды (эндорфины, Met- и Leu-энкефалины) для этой цели не применяли, возможность их использования для аффинной очистки опиатных рецепторов остается проблематичной. Однако эта задача представляет несомненный интерес в плане сравнительного изучения опиатных рецепторов, выделенных с использованием сорбентов, содержащих иммобилизованные природные и синтетические опиоидные лиганды.

Цель настоящей работы—выделить опиатсвязывающие белки из синаптических мембран головного мозга крыс с помощью нового аффинного сорбента, содержащего ковалентно иммобилизованный β -эндорфин.

Выбранный нами эндогенный пептид обладает высоким сродством к μ -и δ -типам опиатных рецепторов [9]. Следовало ожидать, что примененный

аффинный сорбент будет связывать преимущественно μ - и δ -рецепторы. Кроме того, в отличие от пентапептидов, аналогов Leu- и Met-энкефалинов β -эндорфин устойчив к действию аминопептидаз, которые могут быть солюбилизированы из синаптических мембран [10].

Материалы и методы

В опытах использовали крыс-самцов линии *Wistar* массой 150—200 г.

Выделение синаптических мембран из головного мозга крыс проводили методом дифференциального центрифугирования с некоторыми модификациями [11]. Ткань мозга (25 г) гомогенизировали в 10-кратном объеме 0,32 М раствора сахарозы в рабочем буфере (1 мМ фенилметилсульфонилфлуорид, 10 мкг/мл бацитрацин, 0,05 М трис-HCl, pH 7,5), центрифугировали в течение 20 мин при 2000 г. Надосадочную жидкость затем центрифугировали при 10000 г в течение 20 мин, полученный осадок ресуспендировали в 10-кратном объеме бидистиллированной воды и после осмотического шока (10 мин, 4°) центрифугировали при 100000 г в течение 40 мин. Осадок суспендировали в 5 мл холодной бидистиллированной воды, наносили на ступенчатый градиент сахарозы 0,4-0,6-0,8-1,0-1,2 М и центрифугировали при 100000 г в течение 2 ч. Отбирали фракции синаптических мембран на границе 0,6-0,8 М и 0,8-1,0 М сахарозы, затем осаждали их центрифугированием в течение 40 мин при 100000g.

Солюбилизацию синаптических мембран проводили в рабочем буфере, содержащем 0,5% дигитонина и 1 мМ Na ЭДТА, при температуре 0° в течение 20 мин. Несольюбилизованные мембраны осаждали центрифугированием в течение 30 мин при 100000 г и отбрасывали. Для удаления избытка детергента супернатант очищали и концентрировали 15—20 раз ультрафильтрацией на приборе ФМ 02-10 (Мукачево, СССР) через мембранные фильтры PM-10 («Amicon», Голландия). Количество белка определяли по методу Essen [12].

Выделение оптически связывающих мембранных белков из солюбилизата проводили с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-100 fine («Pharmacia», Швеция). На колонку (1,6×50 см) наносили 3—4 мл раствора белка (7—8 мг) в рабочем буфере. Элюцию проводили рабочим буфером со скоростью 15 мл/ч и регистрировали оптическую плотность растворов с помощью прибора Uvicord—S («LKB», Швеция). Отбирали фракции по 2,0 мл.

Для дальнейшей очистки объединяли лишь фракции, обладающие способностью специфически связывать [³H]налоксон, которую определяли в предварительных опытах: аликвоты солюбилизованных мембранных белков (3 мл, концентрация белка 1 мг/мл), очищенные от избытка детергента, инкубировали с 10 нМ [³H]налоксона (44,4 Ки/ммоль, «Amersham», Англия) в присутствии 1 мкМ немеченого налоксона («Serva», ФРГ) в течение 20 мин при 37°. Параллельно инкубировали пробы без

немеченого налоксона. Реакцию останавливали охлаждением раствора до 0° (5 мин) и проводили гель-фильтрацию по описанной выше методике. Радиоактивность проб измеряли в диоксановом сцинтиллаторе [13] на счетчике Isoscap-300 («Трасог-Еурога», Нидерланды). Для определения величины M_r выделяемых при гель-фильтрации опиятсвязывающих мембранных белков предварительно калибровали колонку с помощью стандартных белков: БСА (M_r 66 кД), пепсина (M_r 35 кД), цитохрома С (M_r 12,3 кД). Концентрация белков-маркеров—1 мг/мл, объем раствора, нанесенного на колонку—3 мл.

Приготовление аффинного сорбента. Получение аффинного сорбент β -эндорфин- ω -аминогексилсефарозы 4В основано на реакции иммобилизации пептида за счет его свободных карбоксигрупп, взаимодействующих с образованием ковалентной связи с активными аминогруппами ω -аминогексилсефарозы 4В. Учитывая, что в молекуле β -эндорфина имеются две свободные карбоксигруппы, можно предположить, что пептид взаимодействует одновременно с двумя аминогруппами «спейсера» сефарозы. Активный центр пептида (тираминовая группа) остается в этом случае свободным для взаимодействия с опиатными рецепторами [14]. В качестве основы для разработки метода получения сорбента использовали методику получения аффинных сорбентов, содержащих ковалентно иммобилизованные аминокислоты [15], внося некоторые модификации.

Коммерческий сорбент ω -аминогексилсефарозу 4В (3 г) обрабатывали стандартным способом для удаления стабилизатора [16] и переносили гель в 2 мл раствора, содержащего 3 мг β -эндорфина («Sigma», США) и 200 мкг бацитрацина в рабочем буфере. К раствору добавляли 10 мкг N-цикло-N-(2-морфолиноэтил)-карбодимидметил-пара-толуолсульфоната («Fluka AG», Швейцария) и с помощью 0,1 н. раствора HCl доводили pH среды до 4—5. Смесь оставляли при перемешивании на 1,5 ч при комнатной температуре и далее на 14—15 ч при 4°. По окончании реакции гель отмывали 200 мл дистиллированной воды на фильтре Шотта (N3). Свободные аминогруппы ω -аминогексилсефарозы после связывания с пептидом блокировали 1 М раствором этаноламина [16]. Перед применением аффинный сорбент отмывали в буферных растворах по схеме, представленной в работе Дамбиновой, Беседина [15]. Содержание β -эндорфина в полученном аффинном сорбенте (определяли по разности количества пептида в исходном растворе и промывных водах по методу Essen) составляло 60 нМ/мл геля.

Аффинную хроматографию опиятсвязывающих мембранных белков, выделенных с помощью гель-фильтрации, проводили на колонке (0,7×16 см), заполненной β -эндорфин- ω -аминогексилсефарозой 4В в рабочем буфере. На колонку наносили 1 мл сконцентрированного раствора белка, полученного после гель-фильтрации (1,6 мл) и отмывали 50-кратным объемом рабочего буфера неспецифически сорбированные белки. Специфически связавшиеся с β -эндорфином белки элюировали в линейном градиенте

те солевого раствора (0—1,0 М NaCl в рабочем буфере, общий объем 100 мл). Отбирали фракции по 1,0 мл, объединяя фракции каждого белкового пика, которые регистрировали с помощью Uvicord-S.

Специфическое связывание меченого налоксона с исследуемыми белками изучали по методу Bidlack и соавт. [2] с некоторыми модификациями. Пробы белков (по 100 мкг на первых стадиях выделения и по 10 мкг после аффинной очистки) инкубировали в 0,5 мл раствора, содержащего 10 нМ [³H]налоксона (44,4 Ки/ммоль, «Amersham», Англия) в течение 20 мин при 37°. Одновременно инкубировали параллельные пробы, содержащие избыток немеченого налоксона (1 мкМ, «Serva», ФРГ). Реакцию останавливали охлаждением раствора до 0°, добавляли 0,2 мл охлажденного раствора БСА (10 мг/мл) и 0,4 мл 30%-ного раствора ПЭГ-6000 («Serva», ФРГ). Растворы фильтровали через стекловолокнистые фильтры GF/C («Whatman», Англия), предварительно вымоченные в 0,3%-ном растворе полиэтиленimina и промывали 5 мл 7,5%-ного раствора ПЭГ-6000. После фильтрации фильтры подсушивали и помещали в вials с диоксановым сцинтиллятором, радиоактивность проб определяли на счетчике Isoscap-300.

Электрофокусирование выделенных с аффинного сорбента фракций белков, проявивших высокое сродство к [³H]налоксону, проводили с использованием коммерческих гелей Servalyte-Precotes, pH 3-10 («Serva», ФРГ) [13]. Размеры блока геля 125×125×0,3 мм, анодный электрод—раствор, содержащий L-аспарагиновую кислоту (25 мМ) и L-глутаминовую кислоту (25 мМ); катодный электрод—раствор, содержащий аргинин (23 мМ), L-лизин (4 мМ) и этилендиамин (2,0 М). Величина силы тока—50 мА, напряжение—500 В. Процесс вели в течение 2-3 ч при 4°. Гели фиксировали в 10%-ной ТХУ и окрашивали в красителе Serva Blue W («Serva», ФРГ). Изоэлектрические точки выделенных мембранных белков определяли, используя стандартный набор белков-маркеров («Serva», ФРГ).

Диск-электрофорез исследуемых мембранных белков на разных стадиях выделения выполняли в 10%-ном ПААГ в присутствии 0,1% ДДС-Na [17]. Электрофорез проводили 4 ч при 10° (сила тока 60 мА, напряжение 140 В). Столбики геля фиксировали в смеси уксусная кислота/этанол/вода (10:25:65 v/v) и окрашивали в 1%-ном растворе Кумасси R-250. Для определения величины M_r выделенных белков использовали стандартный набор белков-маркеров («Sigma», США).

Результаты и обсуждение

Во всех аналогичных работах по выделению опиатсвязывающих белков мембранных структур мозга с применением как фармакологических препаратов опиатов, так и аналога опиоидных пептидов, в качестве исходного материала использовали фракции тотальных мембран головного мозга. При обработке этого материала детергентами солибилизировались белки

не только нейрональных мембран, но и других мембранных структур: митохондрий, миелина, глии и др. Однако существуют данные о том, что опиатные рецепторы обнаружены и на мембранах глиальных клеток [18]. Возможно, что эти рецепторы могут иметь структурные и функциональные отличия от опиатных рецепторов нейронов. В связи с этим нам представлялось целесообразным выделять опиатсвязывающие белки не из тотальных мембран мозга, а из фракции синаптических мембран головного мозга крыс с тем, чтобы получить мембраны преимущественно нейронального происхождения.

Таблица

Опиатсвязывающие белки синаптических мембран головного мозга крыс на разных стадиях выделения и очистки

Фракция белков	Количество белка, мг	Выход белка, %	Специфическое связывание [³ H] налуксона*		
			имп/мин/мг белка	в расчете на общее количество белка во фракции	
				имп/мин	% от исходного
Фракция синаптических мембран	40	100	97 ± 12	3880	100
Осадок несольюбилизованных мембран (100000g)	33	83	22 ± 9	726	19
Супернатант сольюбилизованных белков (100000g)	8	18	256 ± 24	2048	53
Налуксонсвязывающие белки после гель-фильтрации	1,6	4	1210 ± 51	1936	50
Фракции белков после аффинной хроматографии:					
элюирование рабочим буфером	1,0	2,5			
элюированы 0,1 М NaCl	0,1	0,25	112 ± 14		
элюированы 0,5 М NaCl	0,2	0,80	3000 ± 21		
элюированы 1,0 М NaCl	0,09	0,24	1560 ± 43		

Примечание.* Все значения представлены для концентрации [³H] налуксона — 10 нМ; **обнаружены лишь следы радиоактивности.

Для сольюбилизации мембранных белков наиболее подходящими детергентами являются Тритон X-100, CHAPS, дигитонин [4,5,19,20]. В предварительных экспериментах мы использовали Тритон X-100. Однако оказалось, что работа с этим детергентом связана с рядом неудобств: сложностью удаления его избытка и, следовательно, трудностями при

дальнейшем исследовании выделенных белков. Наиболее существенным препятствием для использования Тритона X-100 в качестве солюбилизирующего детергента оказался низкий выход опиятсвязывающих мембранных белков. Поэтому нами был выбран более удобный в работе неионный детергент дигитонин, который солюбилизирует белки тотальной мембранной фракции мозга с высоким выходом опиятсвязывающих белков [21]. Кроме того, избыток этого детергента легко удаляется гель-фильтрацией солюбилизованных белковых растворов или их диализом.

В наших опытах при использовании 0,5%-ного раствора дигитонина солюбилизовалось 18—20% белков фракции синаптических мембран. Исследование взаимодействия солюбилизованных мембранных белков с [^3H]налоксоном показало, что они обладают способностью специфически связывать этот лиганд. Причем связывающая активность этих белков в 2,5 раза выше по сравнению с налоксонсвязывающей активностью исходной фракции синаптических мембран (таблица).

Мы считали целесообразным ввести предварительную стадию очистки солюбилизованных белков путем гель-фильтрации через колонку с сефадексом для того, чтобы удалить избыток детергента, который мешает связыванию выделенных белков с опиятными лигандами и может снижать эффективность связывания белков с лигандом аффинного сорбента. Кроме того, мы полагали, что эта процедура позволит отделить неактивные по отношению к опиятным лигандам белки тотального солюбилизата от интересующих нас белковых фракций с наибольшей опиятсвязывающей способностью. В качестве контроля активности выделенных опиятсвязывающих мембранных белков на каждой стадии очистки мы исследовали их связывание с антагонистом опиятных рецепторов — [^3H]налоксоном.

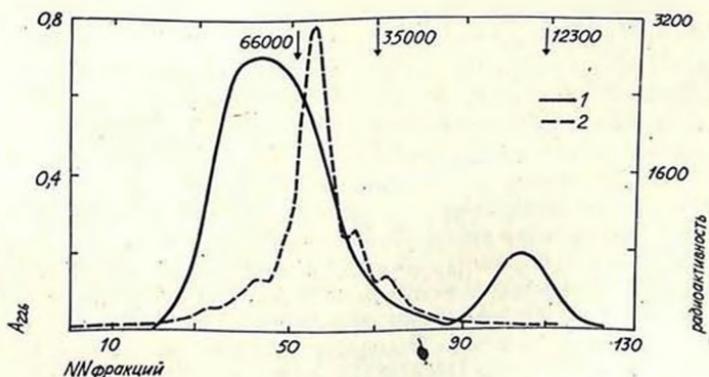


Рис. 1. Гель-хроматография солюбилизованной фракции синаптических мембран после инкубации с [^3H]налоксоном на сефадексе G-100. 1 — распределение белка, 2 — радиоактивность

Результаты гель-фильтрации белков солюбилизата, представленные на рис.1, свидетельствуют о том, что наибольшей способностью взаимодействовать с [^3H]налоксоном обладали белковые фракции 40—75, с величиной M_r 30—70 кД. На их долю приходилось не более 20% белков солюбилизата, нанесенного на колонку или 4% тотальных белков фракции синаптических мембран. Изучение равновесного связывания объединенной фракции с [^3H]налоксоном показало, что специфическое связывание радиолиганда с этими белками в 4—7 раза выше, чем с белками солюбилизата и в 12,4 раза выше, чем с фракцией синаптических мембран (таблица). Следовательно, полученные результаты подтверждают целесообразность введения предварительной очистки тотального солюбилизата. Действительно, после этой процедуры, как показывает сравнение суммарной активности солюбилизата и фракции 40—75, нами выделены практически без потерь все опиятсвязывающие белки солюбилизата (таблица).

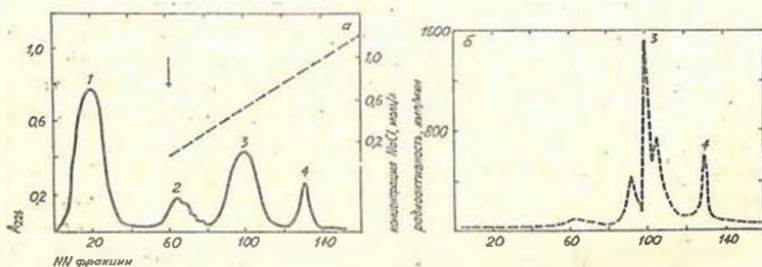


Рис.2. Аффинная хроматография на β -эндорфин- ω -аминогексилсефарозе 4В фракции 40—75. Сплошная линия—распределение белка; стрелкой указан момент повышения ионной силы элюирующего буфера (а); б—специфическое связывание выделенных фракций с [^3H]налоксоном

Дальнейшую очистку белков проводили на аффинном сорбенте β -эндорфин- ω -аминогексилсефарозе 4В. На рис.2 представлены результаты аффинной хроматографии объединенной фракции 40—75, выделенной при гель-фильтрации. Из профиля элюции белков с этого сорбента видно, что рабочим буфером вымываются фракции 7—35 (пик 1), содержащие «балластные» белки, не проявившие сродства к β -эндорфину. На долю этих белков приходится большая часть (до 63%) белков, нанесенных на аффинный сорбент (таблица). При замене элюента 0,1—0,2 М раствором NaCl с сорбента вымывались белки пика 2 (фракции 60—75), составлявшие 6—7% от нанесенных на колонку белков (рис.2, а). Эти фракции проявили слабое сродство к [^3H]налоксону (рис.2,б). При повышении ионной силы элюента (0,5 М NaCl) с колонки выходили белки пика 3 (фракции 100—115). Наиболее прочно связанные с сорбентом белки пика 4 (фракции 125—135) элюировались 1,0 М раствором NaCl (рис.2, а). Белки этих пиков проявили высокую активность при взаимодействии

с меченым налоксоном. Однако уровень специфического связывания радиолиганда с белками пика 3 был в 2 раза выше, чем с белками пика 4 (рис. 2, б, таблица). Таким образом, из синаптических мембран головного мозга крыс были выделены две наиболее активные фракции опиатсвязывающих белков, очищенных в 200 (пик 3) и в 400 раз (пик 4), но их связывающая активность при очистке возрастала в меньшей степени (таблица). Это, по-видимому, связано с тем, что в процессе выделения рецепторных белков происходит утрата микроокружения, необходимого белкам для проявления рецепторных свойств.

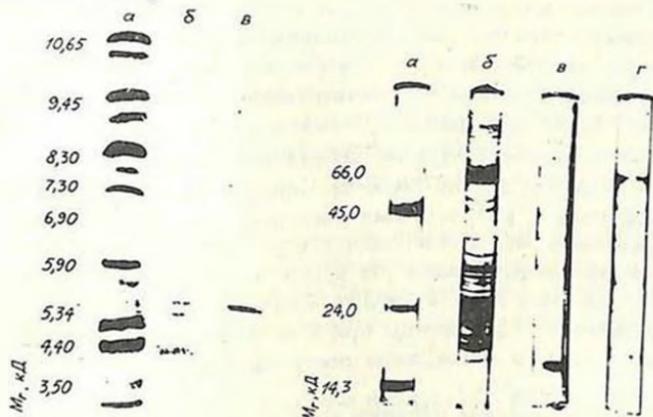


Рис. 3. Электрофореграммы выделенных с аффинного сорбента налоксоносвязывающих белков: а — белки-маркеры, б — белки пика 3, в — белки пика 4

Рис. 4. Электрофорез в ПААГ-ДДС-На синаптических мембранных белков: а — белки-маркеры, б — солиubilizированные мембранные белки, в — белки пика 3, г — белки пика 4

Для оценки степени гомогенности полученных опиатсвязывающих мембранных белков было проведено их исследование с помощью электрофокусирования (рис. 3). Результаты эксперимента показали, что для белков пика 3 существуют 3 полосы: одна соответствует белку с pI 4,4 и две другие полосы с pI 5,3. Для белков пика 4 была обнаружена одна полоса белков с pI 5,3 (рис. 3). Эти данные свидетельствуют о высокой степени гомогенности белков пика 4 и позволяют предположить, что, возможно, этот пик является индивидуальным белком, тогда как белки пика 3 состоят, по меньшей мере, из двух различных белков, отличающихся по своим электрическим свойствам. Появление двух близлежащих полос на электрофореграмме белков пика 3 может быть следствием расщепления лабильного белка на субъединицы под действием высокого электрического напряжения или следов детергента, примененного нами для растворения мембранных белков. Кроме того, величины pI свидетельствуют о том, что белки как пика

3, так и пика 4 являются кислыми белками; по-видимому, они содержат избыток кислых аминокислот—аспарагиновой и глутаминовой. Однако данных об аминокислотном составе белков опиатных рецепторов в известной нам литературе не имеется. Таким образом, данные электрофокусирования подтверждают, что использование β -эндорфина для получения аффинного сорбента позволяет выделить несколько типов опиатсвязывающих мембранных белков.

Для определения белкового спектра исследуемых белков пиков 3 и 4 нами был проведен их электрофорез в денатурирующих условиях. Из электрофореграмм, представленных на рис.4, видно, что из сложного спектра белковых полос солиобилизованных белков синаптических мембран с M_r от 12 до 100 кД в составе белков пика 3 присутствуют лишь 4 основные белковые полосы, соответствующие субъединицам с величинами M_r 15, 30, 38, 45 кД (рис.4, *а*). Белки пика 4 содержат 2 основные белковые полосы, соответствующие субъединицам с M_r 15 и 66 кД (рис.4, *г*). И в том и в другом случае имеются минорные примеси. Сопоставление полученных данных с результатами электрофокусирования дает возможность предположить, что белок пика 4 с pI 5,3 может состоять из двух субъединиц: низкомолекулярной (15 кД) и высокомолекулярной (66 кД), а два типа белков пика 3 (pI 4,4 и 5,3), выявленные электрофокусированием, дают 4 основные субъединицы при SDS-электрофорезе. Чтобы определить, из каких именно субъединиц построен каждый белок, необходимы дальнейшие исследования.

В литературе описаны попытки выделения опиатсвязывающих мембранных белков с помощью аффинного сорбента, содержащего иммобилизованный синтетический аналог Leu-энкефалина, — DALA [7,8]. Выделенные с помощью этого сорбента белки головного мозга имели M_r 62 кД, однако их способность связывать меченый дельта-лиганд оказалась на порядок ниже, чем у солиобилизата тотальной фракции мембран мозга [7]. При аффинной хроматографии на β -эндорфин- ω -аминогексилсефарозе мы также выделили опиатсвязывающие мембранные белки, которые имели близкое к проведенному в работе Fujoka и соавт. [7] значение M_r (66 кД), однако налоксонсвязывающая активность этих белков (пик 4) не только не снижалась, а, напротив, возрастала в 7 раз по сравнению с солиобилизатом. При попытках выделения опиатных рецепторов μ -типа с применением сорбентов, содержащих иммобилизованные производные морфина, были получены белки, которые с высоким сродством связывали лиганды μ -рецепторов: [3H]дипренорфин, [3H]налоксон, [3H]DAGO [2,3]. Для этих белков был характерен субъединичный состав с M_r 28, 35, 43 кД [2] или 36 кД [3]. Приведенные значения величин M_r близки к величинам, полученным нами для белков пика 3 (M_r 30, 38, 45 кД), которые активнее взаимодействовали с [3H]налоксонном, чем белки исходного солиобилизата и белки пика 4. Сходство величин M_r выделенных белков (пик 3) и их способность

связывать μ -антагонист позволяют предположить, что эти белки являются компонентами μ -рецепторов. Белки типа 4, проявившие наибольшее сродство к β -эндорфину сорбента, по-видимому, относятся к опиатсвязывающим белкам рецепторов другого типа. Поскольку у этих белков имеется некоторое сходство с белками, выделенными на сорбенте, содержащем иммобилизованный δ -лиганд—DALA [7], можно предварительно отнести белки пика 4 к компонентам δ -рецепторов.

Таким образом, применение предложенного нами сорбента, содержащего иммобилизованный β -эндорфин, позволяет выделить опиатсвязывающие белки синаптических мембран, которые, возможно, являются структурными компонентами разных типов опиатных рецепторов. Этот сорбент имеет существенное преимущество перед предложенными ранее [1—3,7], так как более универсален—связывает рецепторные белки нескольких типов опиатных рецепторов. Использование этого сорбента освобождает от необходимости применения специфических сорбентов для каждого субтипа рецепторов, требуется только разделить белки разных типов, подбирая специфические элюенты.

Дальнейшее углубленное изучение физико-химических характеристик и рецепторных свойств этих белков по отношению к различным опиатным лигандам позволит более полно охарактеризовать выделенные нами опиатсвязывающие белки синаптических мембран головного мозга крысы.

ISOLATION OF OPIATE-BINDING PROTEINS ON β -ENDORPHIN- ω -AMINOHEXYL SEPHAROSE

Isykenova G.A., Taranova N.P.

*Pavlov Institute of Physiology, USSR
Academy of Sciences, Leningrad*

Two types of opiate-binding proteins were isolated from rat brain synaptic membranes using a new affinity adsorbent: β -endorphin- ω -aminoethyl Sepharose 4B. The isolated proteins were homogeneous by the criteria of isoelectric focusing and SDS-electrophoresis, their pI values were 4.4 and 5.3, they differed in subunit composition and ability to bind [3 H]-naloxone. It is proposed that these proteins are components of brain opiate receptors)

ЛИТЕРАТУРА

1. Cho T.M., Ge B.L., Yamato C., Smith A.P., Lok H.H. Proc.Nat.Acad.Sci.USA, Biol.Sci., v.80, N17, p.5176—5180, 1983.
2. Bidlack J.M., Abood L.G., Munemitsu S.M., Archer S. Gala D., Kreilick R.W. Regulatory peptides: from molecular biology to function, v.33, p.301—309, New York, Raven Press, 1982.
3. Ueda H., Harada H., Misawa H., Nozaki M., Takagi H. Neurosci.Lett., v.75, N3, p.339—344, 1987.

4. *Chang K.-J., Cuatrecasas P. Federat.Proc., v.40, p.2729—2734, 1981.*
5. *Simon E.J. Trends.Pharmacol.Sci., v.2, p.155—158, 1981.*
6. *Simon E.J. J.Receptor Res., v.7, N1—4, p.105—132, 1987.*
7. *Fujoka T., Inoue F., Kuriyama H. Biochem.Biophys.Res.Comm., v.131, N2, p.640—646, 1985.*
8. *Simon J., Benyhe S., Hepp J., Khan A., Borsodi A., Szücs S., Medzihradzky K., Wollemann M. Neuropeptides, v.10, N1, p.19—28, 1987.*
9. *Howard A.D., Sarne Y., Gioannini T.L., Hiller J.M., Simon E.J. Biochemistry, v.25, p.357—360, 1986.*
10. *Marks N., Grynbaum A., Neidle A. Biochem.Biophys.Res.Comm., v.74, p.1552—1559, 1977.*
11. *Zukin S.R., Young A.B., Snyder S.H. Proc.Nat.Acad.Sci.USA,Biol.Sci., v.71, N2, p.4802—4807, 1974.*
12. *Essen A. Anal.Biochem., v.89, p.264—273, 1978.*
13. *Остерман Л.А. — В кн.: Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радионуклидными методами, с.203—219, М., Наука, 1983.*
14. *Сергеев П.В., Шимановский Н.Л. — В кн.: Рецепторы, с.258—283, М., Медицина, 1987.*
15. *Дамбинова С.А., Беседин В.И. Нейрохимия, т.1, N4, с.543—549, 1982.*
16. *Туркова Я. — В кн.: Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам, т.2, с.405—444, М., Мир, 1982.*
17. *Laemmli W.K. Nature, v.227, N5259, p.680—685, 1970.*
18. *Абугидзе К.Д., Соломония Р.О., Микеладзе Д.Г. Нейрохимия, т.6, N3, с.418—421, 1987.*
19. *Simon P.R., Swan J.H., Griffiths T., Meldrum B.S. Science, v.226, N4676, p.850—852, 1984.*
20. *Maruyama M., Sugino H., Akita K., Hatanaka H. Brain Res., v.401, p.14—22, 1987.*
21. *Simon J., Benyhe S., Abutidze K., Borsodi A., Szucs M., Toth G., Wollemann M. J.Neurochem., v.46, N3, p.695—701, 1986.*

Поступила 10.06.1988