



УДК 612.822.1+612.815.1

ВЛИЯНИЕ  $\text{Na}^+$  И  $\text{Ca}^{2+}$  НА РЕЦЕПТОРНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ  
 $^3\text{H}$ -L-ГЛУТАМАТА С МЕМБРАНАМИ НЕРВНЫХ КЛЕТОК

ГОРОДИНСКИЙ А. И., ДАМБИНОВА С. А.

Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины  
АМН СССР, Ленинград

Исследовали специфическое связывание  $^3\text{H}$ -L-глутамата с разными типами мембран (свежевыделенными и предварительно замороженными синаптическими мембранами, митохондриальными и плазматическими мембранами гибридных клеток нейробластомы N 18) и его зависимость от  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  в физиологических концентрациях. Показано, что  $\text{Na}^+$  подавляет связывание  $^3\text{H}$ -L-глутамата с предварительно замороженными синаптическими мембранами, увеличивая почти на порядок величину  $K_d$  комплекса рецептор-глутамат, но не влияет на связывание с митохондриальными мембранами. Предполагается, что повышение уровня специфического связывания после замораживания-оттаивания синаптических мембран эквивалентно активации связывания  $^3\text{H}$ -L-глутамата со свежевыделенными мембранами в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  и обуславливается отделением регуляторной субъединицы пептидной природы, блокирующей узнающие участки рецептора. Обсуждается роль  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  в эндогенной регуляции функции глутаматных рецепторов ЦНС.

В регуляции функционирования глутаматергических синапсов ЦНС немаловажную роль играют факторы, непосредственно влияющие на связывание глутамата с синаптическими рецепторами. К таким факторам в первую очередь следует отнести компоненты непосредственного ионного окружения рецептора— $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Cl}^-$ .

Рецепторное связывание L-глутамата *in vitro* изучается, как правило, с помощью радиолигандного метода на выделяемых из нервной ткани препаратах синаптических мембран. Несмотря на то, что эти исследования ведутся уже около 10 лет [1], влияние основного катиона ионного окружения рецептора— $\text{Na}^+$  (присутствующего во внеклеточной среде в концентрации 100—150 мМ) на связывание L-глутамата с рецептором до сих пор детально не изучено. Это объясняется тем, что при создании в среде инкубации физиологических концентраций  $\text{Na}^+$  происходит активация системы активного транспорта глутамата на синаптических мембранах и, соответственно, ассоциированных с ними так называемых  $\text{Na}^+$ -зависимых участков связывания [2]. На фоне подобных  $\text{Na}^+$ -активируемых транспорт-

ных участков практически не проявляются рецепторные (по принятой терминологии « $\text{Na}^+$ -независимые») участки связывания нейромедиатора, что создает серьезные методологические трудности для исследования влияния на них ионов  $\text{Na}^+$  в физиологических концентрациях.

Не менее важная роль в эндогенной регуляции функции глутаматных рецепторов ЦНС принадлежит ионам кальция, которые содержатся во внеклеточной среде в концентрации 2,5—5,0 мМ, но практически не встречаются в свободном состоянии внутри нервных клеток [3]. Ранее было показано, что  $\text{Ca}^{2+}$  в указанных концентрациях повышает специфическое связывание  $^3\text{H-L}$ -глутамата с синаптическими мембранами, выделенными из головного мозга крыс [4—6]. Однако вопрос о природе стимулирующего действия  $\text{Ca}^{2+}$  на рецепторное связывание  $^3\text{H-L}$ -глутамата в настоящее время остается невыясненным.

Согласно гипотезе Baudry, Lynch [7], активация рецепторного связывания происходит за счет действия  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых протеаз. Протеолитической активацией глутаматных рецепторов авторы объясняют явление длительной потенциации синаптического ответа, возникающей при повторяющейся электрической стимуляции срезов мозга [8].

Иной точки зрения придерживаются Fagg и соавт. [9, 10], которые предполагают существование различных популяций  $\text{Cl}^-/\text{Ca}^{2+}$ -зависимых и  $\text{Cl}^-/\text{Ca}^{2+}$ -независимых участков связывания, различающихся по локализации и фармакологическим характеристикам. Отметим, что сам по себе факт существования  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых и  $\text{Ca}^{2+}$ -независимых участков связывания еще не устанавливает природу стимулирующего действия  $\text{Ca}^{2+}$ , оставляя этот вопрос открытым.

Следует подчеркнуть, что понимание ионных механизмов активации функции глутаматных рецепторов ЦНС представляет существенный интерес не только для изучения регуляции эффективности синаптической передачи, но и имеет важное практическое значение в плане разработки адекватной модели для скрининга фармакологических препаратов, предназначенных для высокоизбирательного взаимодействия с глутаматергическими синапсами головного мозга.

Целью настоящей работы явилось сравнительное исследование характера влияния  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  на специфическое связывание  $^3\text{H-L}$ -глутамата с синаптическими и митохондриальными мембранами, выделенными из коры головного мозга крыс, а также с плазматическими мембранами гибридных клеток нейробластомы N18.

### Материалы и методы

В опытах использовали синаптические и митохондриальные мембраны, выделенные из коры головного мозга крыс, как это было описано ранее [6]. Непосредственно после выделения мембранные фракции замораживали и хранили в жидком азоте в течение 1—3 недель.

Содержание белка в мембранных фракциях определяли методом Bradford [11], предварительно растворяя образцы в 2н. NaOH.

Связывание  $^3\text{H}$ -L-глутамата с мембранными фракциями определяли, инкубируя 0,1 мг препарата мембран в 0,25 мл среды, содержавшей 0,08 мкМ  $^3\text{H}$ -L-глутамата (21 Ки/ммоль, «Изотоп», СССР) и 30 мМ трис-HCl, pH 7,2. После 10 мин пренинкубации мембран при 37° (в присутствии неорганических катионов или без них) реакцию запускали добавлением  $^3\text{H}$ -L-глутамата. Через 15 мин инкубационную смесь фильтровали под вакуумом через целлюлозные микропористые фильтры Супрог (ЧССР) с диаметром пор 0,45 мкм. Фильтры промывали 10-кратным объемом ледяного буфера, сушили и растворяли в стандартной сцинтилляционной смеси, содержавшей метилцеллозоль. Значения специфического связывания получали путем вычитания из величин общей радиоактивности значений, полученных при наличии в инкубационной смеси избытка немеченого глутамата (0,1 мМ). Радиоактивность измеряли на счетчике «Rack-Beta» LKB (Швеция).

Клеточные культуры нейробластомы N 18 представляют собой линию нейробластомы С 1300 [12]. Клональные гибридные клетки, отмеченные как 78—45×8, являются соматическими гибридами, полученными при слиянии исходных клеток нейробластомы N 18 и фибробластов китайского хомячка. Клеточные линии были получены и любезно предоставлены нам Т. Н. Игнатовой (ЦИН АН СССР, Ленинград).

Клетки культивировали в стеклянных флаконах Карреля в среде Игла, содержащей 3% глутамина и 10% сыворотки крупного рогатого скота. Среду меняли через 1—3 дня. Время удвоения клеток составляло 18—24 ч. Исследования проводили на мембранах клеток, находившихся в логарифмической фазе роста. Выделение грубой фракции плазматических мембран проводили по методу Prasad и соавт. [13].

Кинетику диссоциации комплекса рецептор-глутамат исследовали, добавляя избыток немеченого глутамата после 20 мин инкубации мембран с радиоактивной меткой. Для увеличения времени диссоциации рецепторного комплекса эту серию экспериментов проводили при пониженной температуре (10—12°). Анализ данных проводили по методу Scatchard [14], статистическую обработку результатов—методом непараметрического анализа [15].

### Результаты исследования

*Влияние  $\text{Na}^+$  на связывание  $^3\text{H}$ -L-глутамата с синаптическими и митохондриальными мембранами.* Как было показано в предыдущей работе [6], создание в инкубационной среде физиологических концентраций  $\text{Na}^+$  приводит к повышению специфического связывания  $^3\text{H}$ -L-глутамата за счет активации транспортных участков связывания с  $K_d$  около 2 мкМ и  $V_{\text{max}}$  40—45 пмоль/мг белка. Как уже отмечалось выше, эти участки связывания ассоциированы с системой активного транспорта медиатора. Исходя из этого, мы исследовали влияние  $\text{Na}^+$  на специфическое связывание  $^3\text{H}$ -L-глутамата с синаптическими мембранами, подвергнутыми процедуре замораживания-оттаивания, инактивирующей систему активного транспорта [16].

Как видно из рис. 1, ионы натрия полностью блокировали связывание  $^3\text{H}$ -L-глутамата с предварительно замороженными мембранами. Ингибирующее действие  $\text{Na}^+$  на специфическое связывание  $^3\text{H}$ -L-глутамата было характерным для синаптических мембран и не проявлялось на мембранах митохондриальной фракции.

Для выяснения природы ингибирующего действия  $\text{Na}^+$  было определено его влияние на процесс диссоциации связанного с мембрана-

ми глутамата. Диссоциацию связанного  $^3\text{H}$ -L-глутамата изучали, добавляя в инкубационную смесь избыток немеченого глутамата после достижения равновесия между прямой и обратной реакциями образования комплекса рецептор-нейромедиатор. Одновременное добавление  $\text{Na}^+$  (в конечной концентрации 150 мМ) приводило к значительному увеличению скорости диссоциации (рис. 2). Величины  $K_d$ , определенные в присутствии или отсутствии  $\text{Na}^+$ , составляли соответственно 0,51 и 0,064 мин $^{-1}$ .

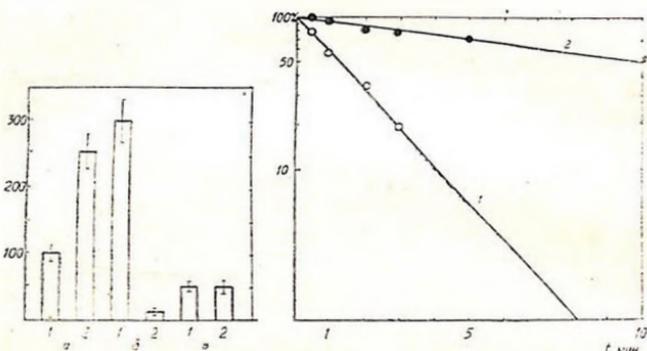
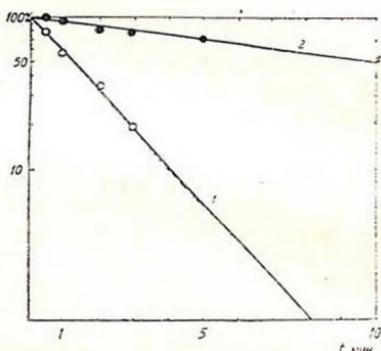


Рис. 1. Влияние  $\text{Na}^+$  на специфическое связывание  $^3\text{H}$ -L-глутамата (по оси ординат, в % от контроля) в отсутствие (1) и в присутствии (2) 150 мМ  $\text{Na}^+$ : а—свежевыделенные синаптические мембраны, б—предварительно замороженные синаптические мембраны, в—мембраны митохондриальной фракции

Рис. 2. Диссоциация комплекса  $^3\text{H}$ -L-глутамат-рецептор в присутствии (1) и в отсутствие (2) 150 мМ  $\text{Na}^+$ . По оси абсцисс—время (мин); по оси ординат—специфическое связывание  $^3\text{H}$ -L-глутамата (%)



Результаты экспериментов по исследованию диссоциации комплекса рецептор-нейромедиатор позволяют предположить, что подавление наблюдаемого специфического связывания  $^3\text{H}$ -L-глутамата ионами натрия происходит за счет ускорения процесса отделения медиатора от рецептора, что выражается в увеличении почти на порядок наблюдаемого значения  $K_d$ . Следует отметить, что эффект ингибирования связывания  $\text{Na}^+$  не специфичен для предварительно замороженных мембран, но проявлялся и на свежевыделенных препаратах, что следует из линейности графика Скэтчарда для  $\text{Na}^+$ -зависимого связывания [2, 6].

*Влияние  $\text{Ca}^{2+}$  на связывание  $^3\text{H}$ -L-глутамата с синаптическими и митохондриальными мембранами.* В соответствии с результатами нашей предыдущей работы [6],  $\text{Ca}^{2+}$  в концентрации 5 мМ повышал связывание  $^3\text{H}$ -L-глутамата со свежевыделенными синаптическими мембранами в 2,5—3 раза. Этот эффект был обусловлен увеличением значения  $V_{\text{max}}$  при неизменном значении  $K_d$  около 180 пМ (рис. 3).

После замораживания-оттаивания синаптических мембран стимулирующее действие  $\text{Ca}^{2+}$  пропадало (рис. 4), однако общий уровень специфического связывания при этом повышался приблизительно до значений, регистрируемых в экспериментах со свежесыведенными мембранами в присутствии 5 мМ  $\text{Ca}^{2+}$ .

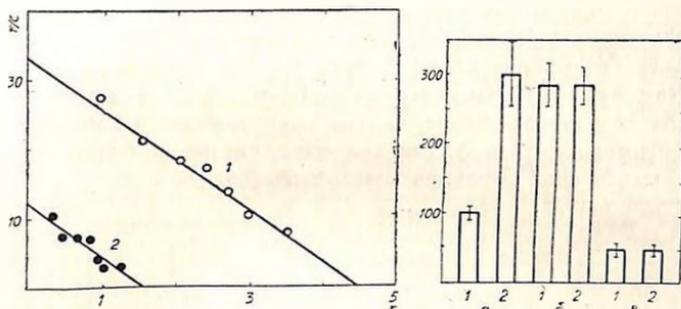


Рис. 3. График Скэтчарда для насыщения  $^3\text{H}$ -L-глутаматом участков связывания на свежесыведенных синаптических мембранах в присутствии (1) и в отсутствие (2) 5 мМ  $\text{Ca}^{2+}$ . По оси абсцисс—концентрация связанного  $^3\text{H}$ -L-глутамата (r, нмоль/мг белка), по оси ординат—отношение связанного  $^3\text{H}$ -L-глутамата к свободному (r/c, фмоль/нМ мг белка)

Рис. 4. Влияние  $\text{Ca}^{2+}$  на специфическое связывание  $^3\text{H}$ -L-глутамата. Обозначения те же, что и на рис. 1

Связывание  $^3\text{H}$ -L-глутамата с мембранами митохондриальной фракции характеризовалось значениями  $K_d$  около 180 нМ и  $V_{\text{max}}$  1.2 нмоль/мг белка (рис. 4). В этом случае  $\text{Ca}^{2+}$  так же как и  $\text{Na}^+$  не оказывал влияния на специфическое связывание.

Стимулирующее действие  $\text{Ca}^{2+}$  на связывание  $^3\text{H}$ -L-глутамата со свежесыведенными синаптическими мембранами согласуется с имеющимися литературными данными [4, 5]. Fagg и соавт. [17] при замораживании синаптических мембран наблюдали снижение уровня связывания  $^3\text{H}$ -L-глутамата и исчезновение зависимости связывания от  $\text{Ca}^{2+}$ , что позволило им сделать вывод об удалении  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой популяции участков связывания. В отличие от упомянутой работы, по нашим данным, процедура замораживания-оттаивания стимулирует специфическое связывание. Этот факт может свидетельствовать об эквивалентности активирующего действия замораживания-оттаивания и  $\text{Ca}^{2+}$  на свежесыведенные синаптические мембраны.

Связывание  $^3\text{H}$ -L-глутамата с плазматическими мембранами гибридных клеток нейробластомы N 18. В последние годы клетки нейробластомы широко используются в нейробиологии в качестве модельных систем для изучения функции нервных клеток [18]. Метод соматической гибридизации клеток позволяет усилить нейрональные признаки по сравнению с родительскими клонами и повысить степень дифференцировки клеток в культуре [19].

С помощью радиолигандного метода в работе Prasad и соавт. [13] было показано, что плазматические мембраны холинэргических и норадренергических клонов нейробластомы обогащены  $\text{Na}^+$ -независимыми участками связывания  $^3\text{H}$ -L-глутамата. В настоящей работе на плазматических мембранах гибридных клеток нейтрального клона нейробластомы мы обнаружили участки связывания  $^3\text{H}$ -L-глутамата, обладающие такими же свойствами, как и на синаптических мембранах, выделенных из мозга,—средством к лиганду ( $K_d$  около 180 нМ), активацией связывания в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$  и подавлением в присутствии  $\text{Na}^+$  (рис. 5). Концентрация обнаруженных участков связывания была существенно выше, чем на синаптических мембранах ( $V_{\max}$  около 40 пмоль/мг белка), что, очевидно, связано с большей гомогенностью выделенной фракции плазматических мембран.

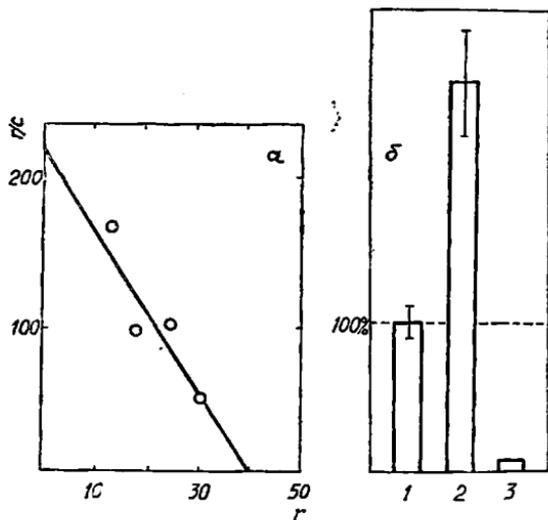


Рис. 5. Специфическое связывание  $^3\text{H}$ -L-глутамата с мембранами гибридных клеток нейробластомы 78—45×8. а—график Скэтчарда для насыщения участков связывания (обозначения по осям абсцисс и ординат те же, что и на рис. 3); б—влияние на специфическое связывание (по оси ординат, в % от контроля)  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$ . 1—в отсутствие неорганических катионов, 2—5 мМ  $\text{Ca}^{2+}$ , 3—150 мМ  $\text{Na}^+$

Наблюдаемое на свежевыделенных плазматических мембранах клеток нейробластомы подавление связывания  $^3\text{H}$ -L-глутамата  $\text{Na}^+$  свидетельствует об отсутствии  $\text{Na}^+$ -зависимых участков связывания на мембранах гибридных клеток.

В таблице суммированы данные по связыванию  $^3\text{H}$ -L-глутамата с мембранами различных типов. Сходство характеристик связывания с плазматическими мембранами нейробластомы и  $\text{Na}^+$ -независимого

связывания с синаптическими мембранами свидетельствует о возможном наличии глутаматных рецепторов на клетках нейробластомы. Вместе с тем, с одной стороны, видны значительные различия между характеристиками рецепторного связывания, с другой—связывания с мембранами митохондриальной фракции. Подчеркнем, что совпадение значений  $K_d$  для этих двух типов участков связывания обуславливает невозможность их селективного изучения при одновременном наличии в инкубационной смеси и свидетельствует о необходимости тщательной очистки синаптических мембран от возможных примесей митохондрий [6].

Таблица

Характеристики специфического связывания  $^3\text{H-L}$ -глутамата с различными мембранными фракциями

Вид мембран	$K_d$ , нМ	$V_{\text{max}}$ , пмоль/мг	Влияние $\text{Ca}^{2+}$	Влияние $\text{Na}^+$
Синаптические мембраны из коры головного мозга крыс, $\text{Na}^+$ -независимое связывание	180	4,5	активирует	подавляет
Плазматические мембраны клеток нейробластомы 78—45×8	180	40,0	активирует	подавляет
Синаптические мембраны из коры головного мозга крыс, $\text{Na}^+$ -зависимое связывание	2000	50,0	не влияет	активирует
Мембраны митохондриальной фракции	170	1,4	не влияет	не влияет

Наличие примесей митохондриальных мембран в исследуемых фракциях может привести к ошибочным заключениям. В частности, на синаптических мембранах обнаруживают  $\text{Cl}^-/\text{Ca}^{2+}$ -независимые участки связывания [9, 10]. По нашим данным, эти участки связывания локализованы предположительно на мембранах митохондрий.

### Обсуждение результатов

Полученные нами данные об активирующем действии  $\text{Ca}^{2+}$  на наблюдаемое связывание  $^3\text{H-L}$ -глутамата и его подавлении в присутствии  $\text{Na}^+$  свидетельствуют о том, что эти свойства характерны, по-видимому, для функционирования глутаматных рецепторов ЦНС. Обнаруженный эффект ускорения диссоциации рецепторного комплекса в условиях физиологических концентраций  $\text{Na}^+$  может иметь важное значение для эндогенной регуляции функции глутаматных рецепторов, расширяя роль  $\text{Na}^+$  в обеспечении эффективного удаления медиатора из синаптической щели. Можно полагать, что  $\text{Na}^+$  одновременно активирует отделение медиатора от рецептора и его последующее поглощение глнальными клетками.

Предположение о преимущественной локализации систем активного транспорта глутамата на мембране глнальных клеток высказыва-

валось в связи со сформировавшимися в последние годы представлениями о главенствующей роли глиальных элементов в метаболическом обеспечении функции глутаматергических синапсов. В качестве косвенного подтверждения этого предположения можно рассматривать результаты экспериментов по определению характеристик связывания  $^3\text{H-L}$ -глутамата с плазматическими мембранами гибридных клеток нейробластомы, представляющих собой однородную культуру нейрональных клеток. Неудачные попытки обнаружить на этих клетках  $\text{Na}^+$ -зависимые участки связывания могут свидетельствовать о возможном отсутствии систем активного транспорта или поглощения на мембранах нейронов. Это подтверждается предварительными результатами проведенных нами экспериментов по определению связывания  $^3\text{H-L}$ -глутамата с выделенными из мозга крысы очищенными мембранами изолированных нейронов и глиальных клеток.  $\text{Na}^+$ -зависимые участки связывания были обнаружены нами лишь на препаратах глиальных элементов.

Рассматривая возможные механизмы стимулирующего действия  $\text{Ca}^{2+}$  на связывание  $^3\text{H-L}$ -глутамата с синаптическими мембранами, нельзя не обратить внимания на идентичность влияния  $\text{Ca}^{2+}$  и процедуры замораживания-оттаивания мембран. Речь, по-видимому, может идти о  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимом отделении гипотетической регуляторной субъединицы, блокирующей узнающие участки для нейромедиатора. Вполне вероятно, что на роль подобной регуляторной субъединицы могут претендовать малые пептиды, обладающие высоким сродством к узнающим участкам [20]. Очевидно, что процедура замораживания-оттаивания приводит к необратимому отделению эндогенных факторов пептидной природы, как это описывалось для других типов клеточных рецепторов [21]. Наличие эндогенного ингибитора пептидной природы, связанного с  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимыми активирующими процессами, конкретизирует механизм регуляторного влияния  $\text{Ca}^{2+}$  на функционирование глутаматных рецепторов и не противоречит гипотезе Fagg и соавт. [10] о существовании  $\text{Cl}^-/\text{Ca}^{2+}$ -зависимых участков связывания. Следует подчеркнуть, что активация специфического связывания при замораживании-оттаивании мембран не может быть обусловлена протеолизом белковой молекулы рецептора, как это предполагают Baudry, Lynch [7], с помощью  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых протеаз.

Таким образом, можно заключить, что обнаруженные нами эффекты действия  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  на специфическое связывание  $^3\text{H-L}$ -глутамата с синаптическими мембранами коры головного мозга крысы и плазматическими мембранами клеток нейробластомы характерны для истинного рецепторного связывания и могут быть использованы в дальнейшем как маркерные признаки для его идентификации в разнообразных модельных системах. В частности, эти результаты предполагаются использовать для разработки тестирующих *in vitro* систем для скрининга фармакологических препаратов, предназначенных для избирательного воздействия на глутаматергические пути ЦНС.

# EFFECT OF $\text{Na}^+$ AND $\text{Ca}^{2+}$ IONS ON $^3\text{H}$ -L-GLUTAMATE BINDING TO NEURONAL MEMBRANES

CORODINSKY A. I., DAMBINOVA S. A.

Institute of Experimental Medicine, USSR Academy of Medical Sciences,  
Leningrad

Binding of  $^3\text{H}$ -L-glutamate to various membrane samples (fresh-prepared and freeze-thawed synaptic membranes, mitochondrial membranes, and hybride neuroblastoma № 18 cells plasma membranes) and its dependence from the physiological concentrations of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  was investigated. It was shown that  $\text{Na}^+$  inhibited apparent binding of  $^3\text{H}$ -L-glutamate to freeze-thawed synaptic membranes increasing about 10-fold dissociation constant of glutamate-receptor complex but does not influence the binding to mitochondrial membranes. The increase of specific binding after freeze-thawing of synaptic membranes is suggested to be due to  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent activation of binding of  $^3\text{H}$ -L-glutamate to freshprepared membranes and is caused by dissociation of the regulatory subunit that blocks the recognizing sites of receptor. Regulatory role of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  in glutamate receptor function is discussed.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Foster A. G., Fagg G. E. Brain Res. Rev., v. 7, p. 103—164, 1984.
2. Baudry M., Lynch G. J. Neurochem., v. 36, p. 811—820, 1981.
3. Rosenberger L., Triggle D. J.—In: Calcium in drug action (ed. G. B. Weiss), p. 3—32, N. Y.—London, 1978.
4. Baudry M., Siman R., Smith E. K., Lynch G. Eur. J. Pharmacol., v. 90, p. 161—168, 1983.
5. Menna E. E., Fagg G. E., Monaghan D. T., Cotman C. W. Soc. Neurosci. Abstr., v. 8, p. 878, 1982.
6. Дамбинова С. А., Городинский А. И. Биохимия, т. 49, с. 67—74, 1984.
7. Baudry M., Lynch G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 77, p. 2298—2302, 1980.
8. Baudry M., Lynch G. Exp. Neurol., v. 68, p. 202—204, 1980.
9. Fagg G. E., Foster A. G., Menna E. E., Cotman C. W. J. Neurosci., v. 2, p. 958—965, 1982.
10. Fagg G. E., Menna E. E., Cotman C. W.—In: CNS Receptors. From Molecular Pharmacol. to Behav., Adv. Biochem. Psychopharmacol., (eds. P. Mandel, F. V. De Feudis), v. 37, p. 199—209, 1983.
11. Bradford M. M. Analyt. Biochem., v. 72, p. 248—256, 1976.
12. Nelson P. G.—In: Tissue Culture of the Nervous System (ed. S. Gordon), 1973.
13. Prasad K. N., Nayak M., Edwards-Prasad J. E., Cummings S., Pattisapu K. Life Sci., v. 27, p. 2251—2259, 1980.
14. Scatchard G. Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 51, p. 660—672, 1949.
15. Ашмарин Н. П., Васильев Н. Н., Амбросов В. А. Быстрые методы статистической обработки и планирование эксперимента, Л., ЛГУ, 1975.
16. Evans W. H. Preparation and characterization of mammalian plasma membranes. Amsterdam, 1978.

17. Fagg G. E., Mena E. E., Monaghan D. T., Cotman C. W. *Neurosci. Lett.*, v. 33 p. 157—162. 1983.
18. De Laat S. W., Van der Saag P. T. *Intern. Rev. of Cytol.*, v. 74, p. 1—53, 1982.
19. Ринцерц Н., Сэвидж Р. Р. Гибридные клетки, М., Мир, 1979.
20. Дамбинова С. А., Беседин В. И., Городинский А. Н., Маргулис М. Н., Павлова О. Н. *Физиол. журн. СССР*, т. 70, с. 952—960. 1984.
21. Massotti M., Mazzari S., Schmid R., Guidotti A., Costa E. *Neurochem. Res.* v. 6, p. 551—565. 1981.

Поступила 21. XII 1985