

БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ НОВОГО ОПИОИДНОГО АГОНИСТА ФЕНАРИДИНА И ЕГО АНТАГОНИСТА

М.И.Агаджанов, Г.С.Вартанян, Ю.В.Тадевосян

*/Ереванский государственный медицинский университет им. М.Гераци,
Институт молекулярной биологии НАН РА/
375025 Ереван, ул. Корюна, 2*

Ключевые слова: опиоидный агонист, опиоидный антагонист, фосфоинозитидный цикл, арахидоновая кислота, фосфолипид, деацилирование, реацилирование

Проблема научно обоснованного целенаправленного поиска болеутоляющих средств центрального и периферического действия продолжает оставаться весьма актуальной для современной медицины. При этом, наряду с интенсивными поисками наиболее приемлемых для клиники лекарственных средств, все более очевидной становится необходимость изучения молекулярно-биохимических механизмов их действия, рассматриваемых в настоящее время как проявление глубоких видоизменений координации метаболических процессов.

Особенно многообещающими представляются перспективы подобного подхода в отношении наркотических анальгетиков и их антагонистов — высокоэффективных химических соединений, мишенью действия которых являются опиатные рецепторы.

Многочисленными исследованиями последних двух десятилетий продемонстрирована важная роль фосфолипидов и продуктов их метаболизма в структурной организации и функциональной активности мембран и клеток в целом. В частности, показано участие широкого спектра ферментных систем обмена фосфолипидов в быстрых преобразованиях плазматических мембран в процессе трансмембранной передачи внешних сигналов самой разнообразной природы. Ведущая роль в этих процессах отводится функционированию фосфоинозитидного цикла — мембраносвязанного каскадного механизма, преобразующего внешние сигналы во внутриклеточные путем образования вторичных посредников и являющегося одним из универсальных механизмов, участвующих в формировании клеточного ответа под влиянием различных физиологически активных соединений. Ключевым этапом в каскаде молекулярных событий, формирующих клеточный ответ, является передача сигнала фосфоинозитидспецифичной фосфолипазе C, расщепляющей полифосфо-

нозитиды с образованием двух вторичных посредников: инозитол-3-фосфата и 1,2-диацилглицерола (1,2-ДГ), вызывающих соответственно высвобождение внутриклеточного запасного Ca^{2+} и активацию протеинкиназы С [5-7].

Как известно, реакция высвобождения арахидоновой кислоты под влиянием соответствующих фосфолипаз выступает в роли лимитирующего фактора в процессах дальнейшей трансформации этой кислоты по липоксигеназному и циклооксигеназному пути с формированием соответствующих модуляторов, регулирующих многочисленные клеточные процессы [23]. Установлено существование функциональной связи между арахидоновой кислотой и фосфоинозитидспецифичной фосфолипазой С [13]. Различные эйкозаноиды регулируют высвобождение разнообразных гормонов, нейротрансмиттеров и, в частности, опиоидных пептидов (β -эндорфин) [19,20].

Учитывая вышеизложенное, перед нами была поставлена задача изучить влияние опиоидного агониста фенаридина и его антагониста на процессы деацилирования-реацилирования фосфолипидов, возможность инициации фосфоинозитидного цикла, а также на процессы трансформации арахидоновой кислоты.

Препарат фенаридин, синтезированный в ИТОХ НАН РА, относится к наркотическим анальгетикам мощного типа действия. Результаты фармакологических исследований продемонстрировали превосходство фенаридина по активности над морфином, промедолом, а над фентанилом и по продолжительности действия. Принадлежащий к тому же ряду химических соединений фенэтам относится к числу "чистых" антагонистов наркотических соединений типа налоксона [2,3].

Материал и методы

Эксперименты были проведены на беспородных крысах-самцах массой 150-170 г. Синапсосомы были выделены по методу Hajost [12]. Инкубацию синапсосом с ^{14}C -арахидоновой кислотой проводили в среде, обеспечивающей преимущественное включение метки во фракцию фосфоинозитидов (70-80% от включенной радиоактивности) [17]. С этой целью инкубировали пробу синапсосом (6-8 мг белка) в смеси, содержащей 80 мМ холодной арахидоновой кислоты, 1 мкКи ^{14}C -арахидоновой кислоты (спец. активность 56 мкКи/мМ), 30 нМ лизофосфатидилхолина, 50 мкМ MgCl_2 , 12,5 мкМ АТР, 10 мкМ KoASH , 1,0 мкМ дитиотриетол. Смесь инкубировали 45 мин при 37°C. Остатки невключенной арахидоновой кислоты удаляли добавлением 15 мл 0,2% раствора альбумина, свободного от жирных кислот с последующим центрифугированием при 650g в течение 15 мин. После премечения арахидоновой кислотой суспензию клеток инкубировали в водяной бане 15-20 мин при 37°C с целью установления метаболического равновесия процессов, протекающих в них.

Инициацию катаболизма фосфоинозитидов проводили в смеси, содержащей меченые синапсомы (150–200 мкг белка), 2,5 мМ CaCl_2 , 0,32 М сахарозу в 50 мМ трис-НСl буфера, 0,1 мл исследуемых соединений (в конечной концентрации 10^{-5} М). Инкубацию проводили при 37° С. Через 5 и 10 сек экстрагировали [8] продукты гидролиза и анализировали нижеописанным способом.

Мечение клеток [^{14}C] -олеил-КоА проводили в аналогичных условиях, однако без добавления в среду АТР, КоА и дитиотреитола. К 0,2 мл клеточной суспензии (80–100 мкг белка) добавляли испытуемые соединения (в конечной концентрации 10^{-5} М). На 5- и 10-й сек инкубации реакцию останавливали добавлением 2 мл холодной смеси хлороформ-метанола (1:2).

Активность фосфолипаз определяли по методу Van den Bosch [24]. Экстракцию фосфолипидов и полученных в результате ферментативных реакций продуктов проводили по методике Bligh, Dyer [8]. Хлороформный слой упаривался досуха в токе азота и вновь растворялся в 80 мкл хлороформа, после чего наносился на пластинку ТСХ. Хроматографию липидов проводили по ранее описанной методике [4]. Обнаруженные в парах йода и идентифицированные с помощью стандартных свидетелей (Sigma, США) пятна липидных фракций соскребали во флаконы со сцинтилляционной жидкостью Брея. Радиоактивность образцов определяли на сцинтилляционном спектрофотометре Roche Bioelectronique, модель SL-4221 (Франция). Активность ферментов и количественные характеристики липидов пересчитывали на 1 мг белка.

Процессы трансформации арахидоновой кислоты изучали в полиморфно-ядерных лейкоцитах (ПМЯЛ), которые получали из периферической крови здоровых доноров [9]. ПМЯЛ дважды промывали в присутствии человеческого альбумина (0,5%), после чего ресуспендировали в фосфатном буфере Дульбекко.

К образцу суспензии ПМЯЛ (40×10^6 клеток/мл фосфатного буфера) последовательно прибавляли при встряхивании на водяном термостате растворы CaCl_2 , АТР, ионофора А-23187, арахидоновой кислоты и исследуемого агониста (или антагониста) в конечных концентрациях 1,6 мМ, 1 мМ, 10 мкМ, 33 мкМ и 10^{-3} М или 10^{-5} М соответственно. Через 5 мин после добавления арахидоновой кислоты реакцию останавливали добавлением к инкубационной среде 1,5 объема метанола, содержащего внутренний стандарт, из расчета 50 нмоль на 10^6 клеток. После центрифугирования (10 мин 600 g) супернатант разводили дистиллированной водой до объема с содержанием метанола до 15%. Полученный раствор пропускали через насадки с алкилированным силикагелем (Sep-Pak, Waters). Смесь эйкозаноидов элюировали 20 мл воды, 50 мл системы растворителей метанол-вода-уксусная кислота (85:15:0,01) и 10 мл метанола. Водно-метанольный раствор упаривали до объема 3 мл, подкисляли 1 М НСl до рН 3 и экстрагировали 10 мл хлороформа. Хлороформный слой промывали водой, упаривали досуха, остаток растворяли в 100 мкл

этанола и анализировали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). ВЭЖХ проводили на колонках 4x250 с гидрофобным силикагелем Spherisorb DDS-2 5 мкм и Lichrosorb RP 18,5 мкм, используя в качестве подвижной фазы систему растворителей метанол-вода-уксусная кислота (75:25:0,1). Скорость потока — 1 мл/мин, детекция при 280 нм — 20 мин и 235 нм — 20–50 мин, УФ-детекторы с переменной длиной волны (LKB) и фотодиодный детектор. Идентификацию эйкозаноидов проводили на основании данных ВЭЖХ и УФ спектров (Specord M-40, Varian 9060) путем сравнения с истинными стандартами (Sigma Chemical Co.). Статистическую обработку полученных данных проводили по системе Стьюдента-Рихтера.

Результаты и обсуждение

Как показали результаты проведенных исследований, уже на 5-й сек инкубации с испытуемыми соединениями наблюдаются заметные сдвиги в отношении выхода 1,2-ДГ, причем на 10-й сек инкубации наблюдается их противоположная направленность (рис.1). Столь быстротечные выраженные изменения в отношении выхода 1,2-ДГ, очевидно, следует рассматривать как результат специфического рецептор-опосредованного действия изученных соединений в отношении фосфоинозитид-специфичной фосфолипазы С, что согласуется с некоторыми литературными данными о возможном участии фосфоинозитидного пути в молекулярных механизмах действия морфина и функционировании эндогенной опиоидной системы [22,25]. Следует отметить, что увеличение выхода 1,2-ДГ под действием антагониста перекликается со сведениями об антагонистическом влиянии протеинкиназы С в отношении анальгезии, опосредованной через опиоидную систему [16].

На 10-й сек инкубации с испытуемыми веществами, помимо вышеотмеченных, имеют место значительные противоположно направленные изменения в отношении высвобождения арахидоновой кислоты, что можно, с одной стороны, объяснить разнонаправленным влиянием этих веществ на активность ферментов деацилирования определенного пула фосфоинозитидов, с другой — их противоположным действием на процессы биосинтеза эйкозаноидов. Возможность высвобождения арахидоновой кислоты под действием ДГ-липазы, по-видимому, в данном случае исключается, поскольку изменения в процессах высвобождения 1,2-ДГ и арахидоновой кислоты обнаруживают сходную направленность под действием отмеченных факторов. На 5-й же сек инкубации некоторое повышение уровня арахидоновой кислоты при одновременном повышении триглицеридов (рис.1) свидетельствует в пользу функционирования как фосфоинозитидного цикла, так и 1,2-ДГ-липазного пути высвобождения арахидоновой кислоты, причем возможно, что за счет деятельности последнего в определенной степени замаскировано предпо-

лагаемое более значительное повышение уровня 1,2-ДГ на 5-й сек инкубации.

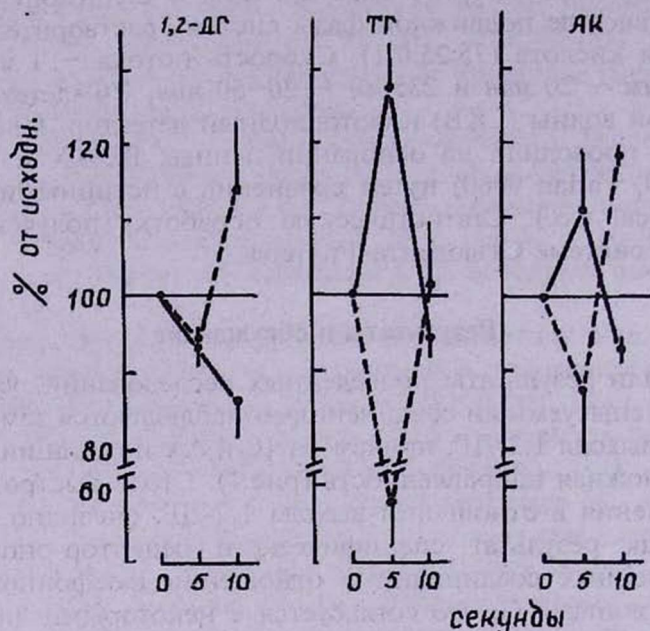


Рис.1. Действие фенаридина (сплошная линия) и фенэтама (пунктир) на образование 1,2-диацилглицерола (ДГ), арахидоновой кислоты (АК) и триглицеридов (ТГ) в синапсосамах, меченных ^{14}C -арахидоновой кислотой. За 100% принят исходный уровень включения ^{14}C -АК

На сегодняшний день имеются сведения [4,5] относительно тесной взаимосвязи фосфоинозитидного пути передачи клеточного сигнала с процессами быстрой модификации липидного бислоя мембран, сопровождающимися соответствующими изменениями липидного микроокружения мембранных белков и осуществляемыми путем обратимых и взаимосвязанных изменений активности различных ферментных систем, принимающих участие главным образом в процессах реацилирования и деацилирования мембранных фосфолипидов. В связи с этим были предприняты соответствующие серии исследований по изучению отмеченных процессов в синапсосамах, предварительно меченных ^{14}C -олеиновой кислотой.

Как показали результаты проведенных исследований (рис. 2), в синапсосамах, предварительно меченных ^{14}C -олеиновой кислотой, уже на 5-й сек инкубации как с фенаридином, так и с антагонистом обнаруживается заметное повышение концентрации 2- ^{14}C -олеоил-лизофосфатидилхолина — прямого продукта действия фосфолипазы A_1 . Следует отметить, что несмотря на однонаправленность отмеченных сдвигов, дейст-

вие антагониста преобладает над таковым для агониста более чем в 2 раза и сменяется резким спадом на 10-й сек инкубации. Описанные сдвиги в определенной степени коррелируют с динамикой изменений содержания фосфатидилхолина (ФХ).

Реакция высвобождения неэстерифицированной олеиновой кислоты со второго положения фосфолипида может быть результатом как непосредственного действия фосфолипазы A_2 , так и каскадной системы фосфолипаза А — лизофосфолипаза. Согласно полученным данным (рис.2), влияние испытуемых соединений на реакции высвобождения олеиновой кислоты оказалось также однонаправленным, но не столь выраженным.

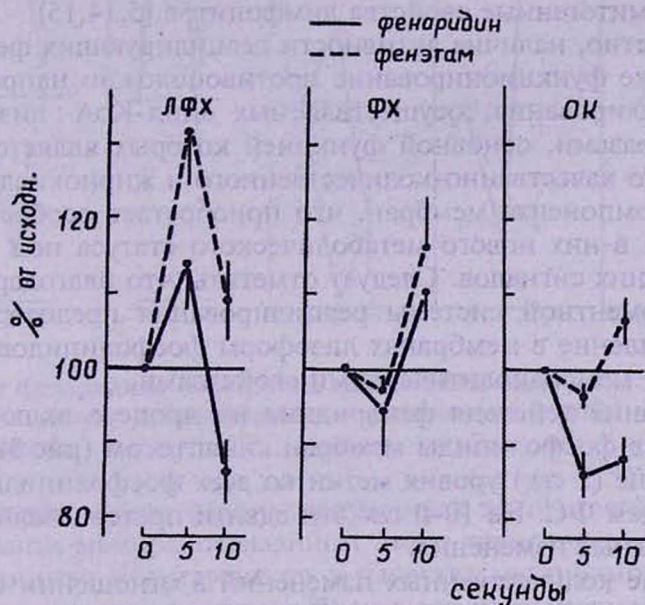


Рис.2. Действие фенаридина (сплошная линия) и фенэтама (пунктир) на процессы деацилирования фракции фосфатидилхолинов, меченной ^{14}C -олеиновой кислотой. ФХ — фосфатидилхолины, ЛФХ — лизофосфатидилхолины, ОК — олеиновая кислота. За 100% принят исходный уровень включения ^{14}C -ОК

Таким образом, в то время как на 5-й сек инкубации имеет место преимущественно активация фосфолипазы A_1 , сдвиги, имеющие место на 10-й сек инкубации, свидетельствуют об активации либо лизофосфолипазы, либо фосфолипазы A_2 при одновременной интенсификации процессов реацилирования лизофосфатидилхолина.

Примечательно, что изменения в содержании ФХ, особенно на 5-й сек инкубации, под действием фенаридина и фенэтама достоверно не различались и не были столь выражены, как для лизофосфатидилхолина. По-видимому, активация процессов деацилирования ФХ в результате лиганд-рецепторного взаимодействия служит сигналом для межфракционных взаимопревращений фосфатидилсерина (ФС) и фосфатидилэтаноламина (ФЭ) в результате последовательных реакций их декар-

боксилирования и метилирования, соответственно обеспечивающих в определенной степени компенсацию убыли фракции ФХ [14,15].

Вызываемые различными лигандами изменения в метилировании фосфолипидов с соответствующими изменениями физико-химических свойств мембраны с вытекающими отсюда изменениями лиганд-рецепторных взаимоотношений, по-видимому, отражают общий феномен модификации структуры и функции мембран под влиянием клеточных сигналов самой разнообразной природы. Так, известно о влиянии процесса метилирования на число рецепторов некоторых гормонов, на активность Са-зависимой АТР-азы, хемотаксис лейкоцитов, секрецию гистамина и митогенные свойства лимфоцитов [5,14,15].

Как известно, наличие активности деацилирующих ферментов предполагает также функционирование противоположно направленных процессов реацилирования, осуществляемых ацил-КоА : лизофосфолипид-ацилтрансферазами, основной функцией которых является обеспечение определенного качественно-количественного и жирнокислотного состава липидного компонента мембран, что приобретает особое значение при установлении в них нового метаболического статуса под влиянием различных внешних сигналов. Следует отметить, что благодаря функционированию ферментной системы реацилирования предотвращается чрезмерное накопление в мембранах лизоформ фосфолипидов, обладающих, как известно, мембранолитическими свойствами.

Исследование действия фенаридина на процесс включения олеиновой кислоты в фосфолипиды мембран синапсом (рис.3) показало резкое повышение (5 сек) уровня метки во всех фосфолипидных фракциях, за исключением ФС. На 10-й сек эти сдвиги претерпевали диаметрально противоположные изменения.

Сравнение количественных изменений в отношении процессов реацилирования фосфолипидов (рис.3) продемонстрировало их идентичность на 5-й сек инкубации в отношении ФХ, ФС и ФЭ, что, возможно, свидетельствует о схожести механизмов модификации мембранного бислоя, задействованных отмеченными внешними сигналами.

Следует отметить, что уже на 10-й сек инкубации обнаруживается диаметрально противоположное влияние этих веществ в отношении ФЭ и несравненно большая выраженность действия фенаридина в отношении ФС по сравнению с антагонистом. Последнее, по-видимому, отражает некоторую специфичность действия указанных соединений на процессы, вовлеченные в межфракционные превращения этих соединений.

Особого внимания, на наш взгляд, заслуживает факт диаметрально противоположного влияния отмеченных соединений на количественные изменения фракции фосфоинозитидов, что в определенной степени согласуется с приведенными данными (рис.1) относительно функционирования фосфоинозитидного цикла в идентичных условиях эксперимента.

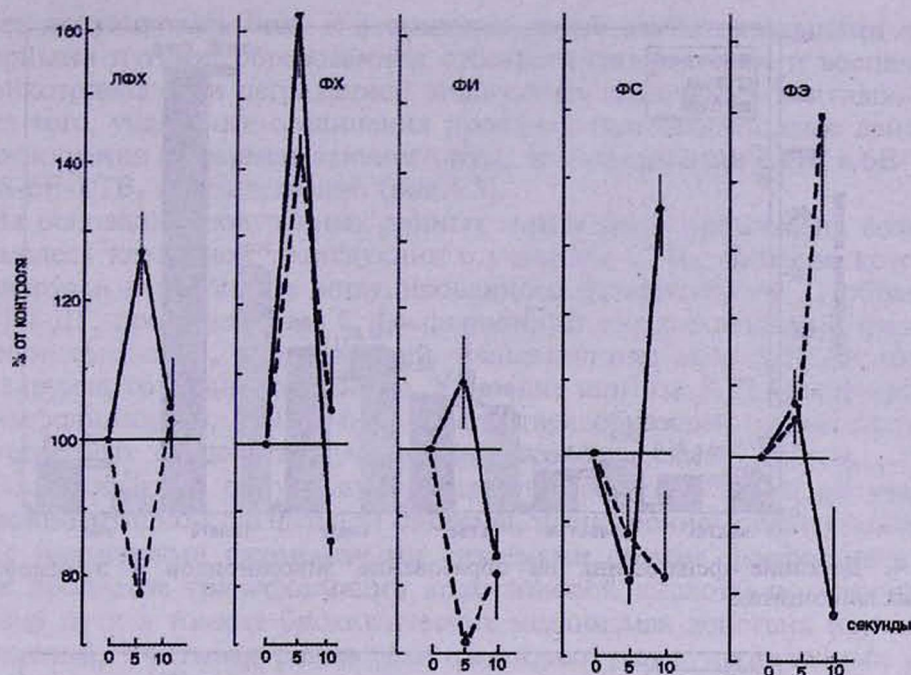


Рис.3. Действие фенаридина и фенэтама на процессы включения и распределения ^{14}C -олеиновой кислоты в фосфолипиды синапсом. 100% — контроль без испытуемых веществ

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что на начальном мембраносвязанном этапе транслокации информации изученных агониста и антагониста в качестве механизмов быстрой модификации синапсомембранных мембран выступают ферментативная система деацилирования — реацилирования, а также процессы взаимопревращений близких по структуре фосфолипидов.

Учитывая, что процессы высвобождения арахидоновой кислоты — предшественника различных эйкозаноидов, осуществляются именно вышеотмеченными ферментными системами, а также сведения о том, что некоторые эйкозаноиды провоцируют боль [10], несомненный интерес представляло изучение влияния исследуемых соединений на процессы трансформации арахидоновой кислоты. Сравнительно недавно показано, что опиоиды модифицируют некоторые функции гранулоцитов [21]. Учитывая вышеизложенное, нами была предпринята попытка изучить влияние испытуемых соединений на процессы трансформации арахидоновой кислоты в ПМЯЛ человека (рис. 4,5).

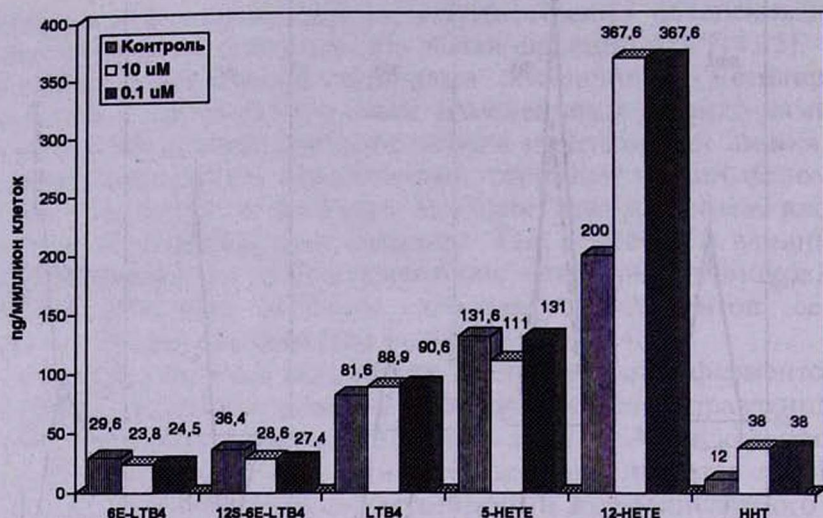


Рис. 4. Действие фенаридина на образование эйкозаноидов в полиморфно-ядерных лейкоцитах

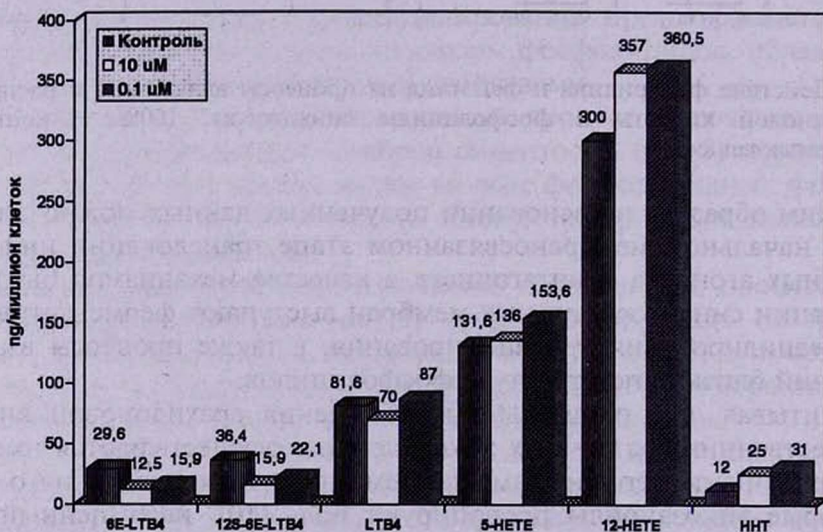


Рис.5. Действие фенэтам на образование эйкозаноидов в полиморфно-ядерных лейкоцитах

Как следует из приведенных рисунков, инкубация с изученными соединениями сопровождается определенными сдвигами в содержании ННТ, 5-НЕТЕ и 12-НЕТЕ. Особого интереса, на наш взгляд, заслуживает факт противоположного влияния этих веществ в отношении лейкотриена В₄ – фактора гипералгезии и воспаления. В этой связи действие агониста и антагониста, очевидно, опосредуется на уровне активности лейкотриен А₄-гидролазы – фермента, лимитирующего скорость образования лейкотриена В₄. Показано, что этот фермент бифункционален и

может модулировать боль и воспаление двумя самостоятельными молекулярными путями: образованием субстрата гипералгезии и воспаления — лейкотриена B_4 и деградацией эндогенных опиоидных пептидов [11]. Более того, указанные соединения проявили противоположное действие и в отношении неферментативного пути трансформации LTB_4 в $6E-LTB_4$ и $12S-6E-LTB_4$ соответственно (рис.4,5).

На основании полученных данных может быть предложена возможная модель клеточной трансдукции с участием LTB_4 , согласно которой, активируясь в результате индуцированного фосфолипазой С образования 1,2-ДГ, протеинкиназа С фосфорилирует внутриклеточный фермент — топоизомеразу-1, усиливающий транскрипцию гена 5-FLAP (белка, активирующего 5-липоксигеназу). Усиление синтеза 5-FLAP стимулирует фосфолипазу A_2 , тем самым способствуя образованию метаболитов, ответственных за соответствующие фармакологические эффекты.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об участии фосфоинозитидной сигнальной системы, функционирующей в кооперации с различными ферментными системами обмена фосфолипидов, а также процессов трансформации арахидоновой кислоты по липоксигеназному пути в тонких биохимических механизмах действия изученных соединений. Учитывая результаты некоторых ранее проведенных нами исследований, свидетельствующих о влиянии этих веществ на процессы энергетического метаболизма [18], а также уровень циклических нуклеотидов [1], выступающих, как известно, в роли биохимических корреляторов синдрома опиатной абстиненции, можно сделать заключение о возможной роли сложных функциональных взаимосвязей между вышеописанными процессами в реализации фармакологических эффектов изученных соединений.

Поступила 15.03.97

Авторы выражают благодарность проф. А.Г.Паносяну за предоставленную помощь в проведении серии исследований по изучению процессов трансформации арахидоновой кислоты.

**ՆՈՐ ՆԱՐԿՈՏԻԿ ԱԳՈՆԻՍՏ ՖԵՆԱՐԻԳԻՆԻ ԵՎ ՆՐԱ ԱՆՏԱԳՈՆԻՍՏԻ
ԱԶԳԵՑՈՒԹՎՆ ՀՆԱՐԱՎՈՐ ԿԵՆՍԱԲԻՍԻԱԿԱՆ ՍԵԽԱՆԻԶՄՆԵՐԸ**

Ս.Ի.Աղաջանով, Գ.Ս.Վարդանյան, Յու.Վ.Թադևոսյան

Ֆենարիդինը իրենից ներկայացնում է նարկոտիկ անալգետիկ, որն իր ակտիվությամբ գերազանցում է մորփինին, պրոմեդոլին եւ ֆենտանիլին, իսկ ազդեցության ժամկետով՝ ֆենտանիլին: Ֆենտանիլը պատկանում է «մաքուր» օպիոիդ անտագոնիստների թվին եւ բնութագրվում է բարձր խնամակցությամբ կապման կետերի նկատմամբ:

Ուսումնասիրվել է ներկայացված նյութերի ազդեցությունը ֆոսֆոլիպիդների դեագիլացման-ռեագիլացման համակարգի, ֆոսֆոլիպոզիտիլային ցիկլի գործունեության, ինչպես նաեւ արաքիդոնաթթվի մետաբոլիտների մակարդակի վրա:

Ստացված տվյալներից հետևում է, որ նկարագրված պրոցեսները ունեն որոշակի մասնակցություն ներկայացված միացությունների ֆարմակոլոգիական ազդեցության մեխանիզմներում:

THE POSSIBLE MECHANISMS INVOLVED IN NEW OPIOID AGONIST OF FENARIDIN AND ITS ANTAGONIST ACTION

M.I.Aghadjanov, G.S.Vartanian, Yu.V.Tadevossian

New opioid agonist fenaridin possesses high potency of analgesic strength as compared with morphine, promedol and fentanyl. Fenetam appeared to be a "pure" opioid antagonist with high affinity to binding sites. Phospholipids deacylation-reacylation system and phosphoinositide cycle functioning was estimated during in vitro action of compounds mentioned, as well, as their influence on some processes of arachidonic acid transformation. The data obtained suggest a possible regulatory role of these processes in studied agonist's and antagonist's pharmacologic effect realization.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вартанян Г.С., Агаджанов М.И., Бурназян Р.А. *Вопр. мед. химии*, 1996, 36, с.49.
2. Вартанян Р.С., Мартиросян В.О., Вартанян С.А. и др. *Хим. фарм.журн.*, 1989, 5, с.573.
3. Власенко Э.В. *Создание новых фармакологических средств для анестезиологии на основе производных молекулы морфина. Автореф. докт. дис. М.*, 1985.
4. Тадевосян Ю.В., Карагезян К.Г., Батикян Т.Б. *ДАН СССР*, 1987, 295, с.1254.
5. Akamatsu Y. *Yakugaku Zasshi*, 1994, 114, p.863.
6. Berridge M.J. *Biochem. J.*, 1984, 220, p.345.
7. Berridge M.J. *J. Cell. Sci.*, 1986, Suppl.4, p.137.
8. Blish E.G., Dyer W.I. *Canad. J. Biochem. Physiol.*, 1959, 37, p.911.
9. Boyum A. *Scand. J. Immunol.*, 1976, 5, p.9.
10. Ferreira H., Nakamura M. *Prostaglandins*, 1979, 18, p.201.
11. Griffin K.J., Gienze J., Krivi G., Fitzpatrick F.A. *Prostaglandins*, 1992, 44, p.251.
12. Hajost F. *Brain Res.*, 1975, 93, p.485.
13. Hansson A., Serhan C.N., Haeggstrom J., Ingelman-Sundberg M., Samuelsson B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, 134, p.215.
14. Hirata F., Axelrod J., Crews F.T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, 76, p.4813.
15. Hirata F., Toyushima S., Axelrod J., Waxdal M. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, 77, p.862.
16. Kavaliers M., Ossenkopp K.P., Tysdale D.M. *Brain Res.*, 1991, 554, p.65.
17. Manning R., Sun G.Y. *J. Neurochem.*, 1983, 41, p.1735.
18. Nazarian K.B., Vartanian G.S., Kostanyan A.A., Aghadjanov M.I. *J. Neurochem.*, 1994, 63, 84.
19. Nishizaki T., Ikegami H., Tasaka K. et al. *Neuroendocrinology*, 1989, 40, p. 483.
20. Ojeda S.R., Urbanski H.F., Junier M.P., Capdevila J. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1989, 559, p.192.
21. Passotti D., Mazzonne A., Ricevuti G. *Minerva Med.*, 1992, 83, p.433.
22. Raffa R.B., Connelly C.D., Martinez R.P. *Eur. J. Pharmacol.*, 1992, 217, p.221.
23. Schaaf N.C., Magistretti P.J., Shorderet M. *Neurochem. Internat.*, 1991, 18, p.303.
24. Van den Bosch H. *Biochem. Biophys. Acta*, 1990, 604, p.191.
25. Xu H., Gintzler A.R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89, p.1978.