

УДК 541.1

ПРИМЕНЕНИЕ МАТЕМАТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПАРАМЕТРОВ РЕЦЕПТОРНОГО СВЯЗЫВАНИЯ

К. Г. Гуревич

(кафедра химической энзимологии)

Математическое моделирование использовано для определения параметров рецепторного связывания в системах, анализ которых традиционными методами (анализ Скэтчарда, Хилла, Бьеррума и т.д. или их модификации) затруднен или невозможен: кооперативное связывание, наличие нескольких типов связывающих мест, связывание в неравновесных условиях. На основании литературных данных проанализировано 23 рецепторные системы, характеризующихся эндогенными и экзогенными лигандами различной химической природы. Показано, что метод сопряженных градиентов позволяет определять параметры связывания во всех случаях, затрудняющих определение параметров традиционными методами. Кроме того, получаемые с помощью математического моделирования параметры позволяют точнее описывать экспериментальные данные, чем если параметры получены традиционными методами. Предполагается, что математическое моделирование может быть также использовано для анализа таких систем как «фермент–субстрат», «белок–переносчик – гормон», «антиген–антитело».

Для определения параметров лиганд–рецепторного взаимодействия (ЛРВ) традиционно используют графические методы (Скэтчарда [1, 2], Хилла [2, 3], Бьеррума [2, 9] и т.д.) или их автоматические модификации [28, 29]. Однако анализ рецепторного связывания данными методами затруднен или невозможен при кооперативном ЛРВ [7, 26], при гетерогенности мест связывания [7, 23, 26], при определении параметров связывания в неравновесных условиях [5]. Последнее может быть вызвано не только малой скоростью ассоциации лиганда с рецептором, но и наличи-

ем процессов деградации [16, 27], транспорта [16] или диффузии лиганда [34]. Для дискриминации этих процессов ранее нами было предложено ставить дополнительные эксперименты [2]. Тем самым процессы рецепторного связывания могут быть отличены от других причин изменения концентрации лиганда.

Однако даже дополнительные эксперименты зачастую не позволяют определить параметры рецепторного связывания. В частности, как было показано ранее [5], при определении параметров ЛРВ в условиях неравновесного

связывания методом Скэтчарда в первую очередь искажается получаемая величина аффинности рецепторов. При гетерогенности мест связывания затруднено определение концентрации каждого из мест связывания [3]. При кооперативном связывании обычно удается только оценить аффинность рецепторов [1].

Для того чтобы избежать подобных трудностей, нами было предложено использовать математическое моделирование [6]. Автоматическая процедура, в основу которой положен метод сопряженных градиентов [4], позволяет минимизировать следующий функционал:

$$\Phi = \sum_j \left([B]_{u_j} - [B]_{m_j} \right)^2, \quad (1)$$

где $[B]_u$ – истинные (экспериментальные) и $[B]_m$ – теоретические (расчетные) значения количества связанного лиганда, полученные при различных концентрациях добавленного лиганда (индекс j). Теоретическое количество связанного лиганда рассчитывается путем численного решения дифференциальных уравнений методом Рунге–Кутты [14] для различных моделей лиганд-рецепторного взаимодействия, известных из литературы [1, 2], отражающих неравновесное, гетерогенное или кооперативное связывание (табл. 1).

Ранее нами была показана возможность применения математического моделирования для анализа взаимодействия в неравновесных условиях фактора роста нервов с тромбоцитами [9] и для анализа кооперативного связывания мет-энкефалина с лимфоцитами человека [8]. Было предположено, что данный алгоритм является универсаль-

ным, т.е. позволяет определять параметры связывания любой рецепторной системы. Поэтому цель настоящей работы состояла в проверке предположения о возможности определения параметров связывания для различных рецепторных систем при помощи математического моделирования.

Результаты и их обсуждение

На первом этапе исследования путем вычисления значений $[B]_u$ по известной модели ЛРВ и подбора параметров и модели для вычисления $[B]_m$ было показано, что если теоретическая модель ЛРВ соответствует экспериментальной, то линии уровня функционала (1) выглядят так, как это представлено на рис. 1 (для простоты на рисунке приведен случай определения двух параметров). Данный результат аналогичен известному из литературы [3].

Как следует из уравнения (1), модель ЛРВ и ее параметры тем более соответствуют экспериментальным данным, чем меньше значение функционала Φ . Действительно, чем больше отклонение числа мест связывания и константы диссоциации от истинных значений, тем больше значение функционала (1) (рис. 1). Для определения степени отклонения теоретических параметров от истинных были использованы следующие отношения:

$$\delta[B_0] = \frac{[B_0]_m}{[B_0]_u}, \quad \delta K_d = \frac{K_{dm}}{K_{du}}, \quad \delta k_{+1} = \frac{k_{+1m}}{k_{+1u}}, \quad (2)$$

где $[B]_0$ – концентрация мест связывания, K_d – константа диссоциации, K_{+1} – константа скорости ассоциации лиганда с рецептором, u и m – соответственно истинные и теоретические значения параметров.

Т а б л и ц а 1

Основные модели ЛРВ [1, 2]

Название	Схема	Уравнение закона действующих масс
Некооперативное связывание 1 лиганда с 1 рецептором	$R + L \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_{+1}} B$ $K_d = k_{-1} / k_{+1}$	$d[B] / dt = k_{+1} ([B_0] - [B]) - k_{-1} [B]$
Кооперативное связывание 1 лиганда с 1 рецептором	$R + L \xrightleftharpoons[k_{-1}]{2k_{+1}} B$ $B + L \xrightleftharpoons[2k_{-2}]{k_{+2}} B_2$ $K_{d1} = k_{-1} / k_{+1}, K_{d2} = k_{-2} / k_{+2}$	$d[B] / dt = 2k_{+1} ([B_0] - [B] - [B_2]) - k_{-1} [B] - k_{+2} [B] \times$ $\times ([L_0] - [B] - [B_2]) + 2k_{-2} [B_2] \times$ $\times d[B_2] / dt = k_{+2} ([B] ([L_0] - [B] - [B_2]) + 2k_{-2} [B_2])$
Гетерогенное связывание 1 лиганда	$R_i + L \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_{+1}} B_i$ $K_{di} = k_{-1} / k_{+1}$	$d[B_i] / dt = k_{+1} ([B_{0i}] - [B_i]) ([L_0] - \sum_i [B_i]) - k_{-1} [B_i]$

Примечания. R – свободные рецепторы, $[B_0]$, $[L_0]$ – начальные концентрации рецепторов и лиганда.

Таблица 2

Определение параметров модели некооперативного связывания (НИ – номер итерации)

НИ	$\lg \delta [B_0]$	$\lg \delta K_d$
0	5	5
1	1,95	1,95
2	0,76	0,76
3	0,12	0,11
4	0,039	0,040
5	0,0017	0,0018
6	0,0015	0,0016
7	0,0016	0,0015

Для поиска минимума функционала (1) был использован метод сопряженных градиентов [4]. Данный метод сходил за 6–7 итераций для модели некооперативного связывания (табл. 2). Метод сохранял сходимость даже, если в модельном эксперименте не было достигнуто равновесие по связыванию (табл. 3) или определялись параметры модели кооперативного связывания (табл. 4) или связывания лиганда с гетерогенной популяцией рецепторов (табл. 5).

Таким образом, на данном этапе исследования было показано, что в модельных экспериментах метод сопряженных градиентов позволяет определять параметры ЛРВ даже если не достигнуто равновесие по связыванию, наблюдается кооперативное связывание или же популяция рецепторов гетерогенна. Нами было предположено, что метод сопряженных градиентов применим и для анализа реальных рецепторных систем.

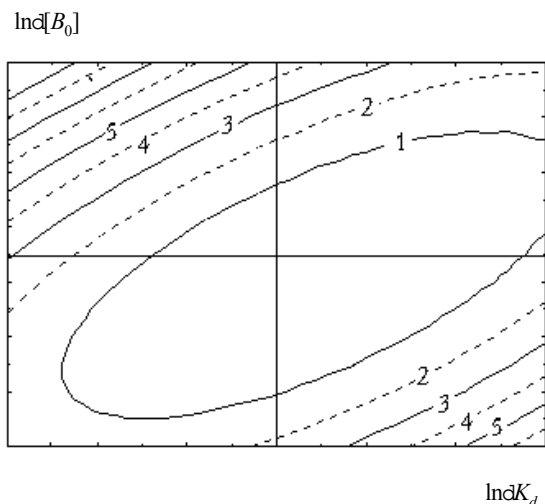


Рис. 1. Линии уровня функционала (1). $[B_0]$ – концентрация мест связывания, K_d – их константа диссоциации

Для решения данной задачи на следующем этапе исследования были проанализированы 102 литературных источника. Основной подбор литературы производили с помощью базы данных MEDLINE (<http://www.healthgate.com/HealthGate/MEDLINE/search-adv.shtml>).

По ключевым словам были найдены оригинальные исследования, в которых отмечено отсутствие равновесия по связыванию, наблюдалось связывание лиганда несколькими типами рецепторов или кооперативное связывание. Были отобраны работы, в которых материалы, методы и результаты представлены наиболее полно. Если в нескольких работах использовали сходные методики (незначительно отличающиеся по условиям проведения радиорецепторных исследований) или сходные рецепторные системы (рецепторы спленцитов мыши, крысы или морской свинки и т.п.), то для детального анализа отбирали более ранние работы, только те, в которых значения температуры и pH были приближены к физиологическим (~36°, ~7,4). Не были включены исследования, в которых проводили стимуляцию клеток, варьирование условий проведения эксперимента (время инкубации, количество отмывочного буфера и т.д.). Во всех анализируемых исследованиях использовали клетки интактных здоровых людей и животных.

В соответствии с перечисленными ограничениями были детально проанализированы 23 рецепторные системы (табл. 6). Как видно из таблицы, отсутствие равновесия в системе «лиганд – рецептор», кооперативное

Таблица 3

Определение параметров модели неравновесного связывания

НИ	$\lg \delta [B_0]$	$\lg \delta K_d$	$\lg \delta k_{+1}$
0	5	5	5
1	4,42	0,24	3,83
2	2,38	0,76	0,31
3	0,89	0,036	0,059
4	0,43	0,13	0,0013
5	0,18	0,0054	$1,99 \cdot 10^{-3}$
6	0,16	$6,64 \cdot 10^{-3}$	$1,50 \cdot 10^{-4}$
7	$7,92 \cdot 10^{-2}$	0,024	$2,58 \cdot 10^{-3}$
8	$2,89 \cdot 10^{-2}$	$9,58 \cdot 10^{-2}$	$9,64 \cdot 10^{-4}$
9	$1,15 \cdot 10^{-2}$	$4,21 \cdot 10^{-3}$	$1,93 \cdot 10^{-4}$
10	$1,02 \cdot 10^{-2}$	$1,58 \cdot 10^{-3}$	$1,48 \cdot 10^{-4}$
11	$1,54 \cdot 10^{-2}$	$1,05 \cdot 10^{-3}$	$1,03 \cdot 10^{-4}$
12	$1,34 \cdot 10^{-2}$	$1,57 \cdot 10^{-3}$	$7,73 \cdot 10^{-4}$
13	$1,10 \cdot 10^{-2}$	$1,57 \cdot 10^{-3}$	$7,72 \cdot 10^{-5}$

Таблица 4

Определение параметров модели кооперативного связывания

НИ	$\lg\delta[B_{01}]$	$\lg\delta K_{d1}$
0	5	5
1	1,97	1,96
2	0,76	0,76
3	0,12	0,11
4	0,041	0,040
5	0,0016	0,0018
6	0,0015	0,0013
7	0,0012	0,0014

Таблица 5

Определение параметров связывания при гетерогенности мест связывания

НИ	$\lg\delta[B_{01}]$	$\lg\delta K_{d1}$	$\lg\delta[B_{02}]$	$\lg\delta K_{d2}$
0	5	5	5	5
1	4,37	0,58	3,75	3,14
2	3,18	0,86	1,69	0,48
3	2,77	0,12	1,27	0,39
4	1,41	$3,16 \cdot 10^{-2}$	0,97	0,10
5	0,40	$2,58 \cdot 10^{-2}$	0,93	0,090
6	0,041	$2,51 \cdot 10^{-2}$	0,21	0,011
7	0,0041	$2,50 \cdot 10^{-2}$	0,011	$2,49 \cdot 10^{-3}$
8	0,0040	$2,50 \cdot 10^{-2}$	0,0010	$2,50 \cdot 10^{-3}$
9	$3,90 \cdot 10^{-2}$	$2,43 \cdot 10^{-2}$	$1,10 \cdot 10^{-2}$	$2,49 \cdot 10^{-3}$

связывание или взаимодействие лиганда с несколькими местами связывания затрудняют определение параметров рецепторного связывания или не позволяют определить эти параметры.

Как показал анализ литературных данных, при неравновесном, кооперативном или многоцентровом рецепторном связывании исследователи чаще всего оценивают константу диссоциации как отношение константы скорости диссоциации лиганда с рецептором к константе скорости диссоциации, реже – по точке пересечения с осью *X* изотермы связывания, представленной в координатах Хилла. При этом концентрация мест связывания определяется по насыщающим концентрациям лиганда. Однако, как было показано нами ранее [2], такое определение имеет целый ряд недостатков. Основными из них являются следующие: высокая стоимость (так

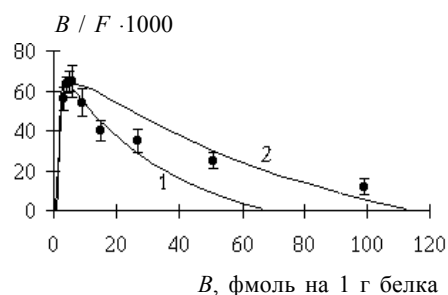


Рис. 2. Анализ взаимодействия налоксона с мембранами мозга крыс. Аппроксимация экспериментальных данных моделью кооперативного связывания с параметрами: полученными в работе [19] (1), полученными с помощью метода сопряженных градиентов (2). *B* – количество связанного лиганда, *F* – количество свободного лиганда

как требуется большое количество меченого лиганда), высокая трудоемкость, низкая точность, невозможность определения концентрации мест связывания каждого типа (если их несколько), так как по насыщающим концентрациям оценивается только суммарная концентрация мест связывания.

В отличие от оригинальных работ, метод сопряженных градиентов позволил во всех случаях определить параметры рецепторного связывания (табл. 6). Как видно из таблицы, чаще всего параметры рецепторного связывания, определенные различными методами, отличаются незначительно; при этом точность аппроксимации экспериментальных данных моделями рецепторного связывания, параметры которых оценены с помощью метода сопряженных градиентов, несколько выше, чем для случая, когда параметры рецепторного связывания определялись традиционными методами.

Рассмотрим случай явного несовпадения результатов по определению параметров связывания, полученных с помощью традиционных методов и метода сопряженных градиентов.

В работе [19] исследовалось связывание налоксона и морфина с мембранами головного мозга крыс. Было показано, что первый лиганд полностью вытесняет второй из комплекса с рецептором, и наоборот. Таким образом, и морфин, и налоксон связывались с одними и теми же местами связывания.

Между тем определение концентрации мест связывания по насыщающей концентрации привело к парадоксальному результату: концентрация мест связывания налоксона оказалась вдвое меньше концентрации мест связывания морфина (табл. 6). Данный результат плохо согласуется с экспериментом: среднеквадратическое отклонение (СКО) составляет порядка 45% при аппроксимации экспериментальных данных по связыванию налоксона с мембранами мозга с использованием параметров, полученных авторами (рис. 2).

Данного противоречия удалось избежать при использовании метода сопряженных градиентов: как следует из

Применение метода сопряженных градиентов для определения параметров связывания для различных рецепторных систем

Авторы	Система	Авторские данные			Метод сопряженных градиентов		
		K_d , М	B_0	СКО,%	K_d , М	B_0	СКО,%
Kahn, 1976 [25]	инсулиновые рецепторы гепатоцитов, связывание с отрицательной кооперативностью	$0,8 \cdot 10^{-8}$	100 250 тыс. на 1 клетку ¹	9,2	$1 \cdot 10^{-8}$	180 тыс. на 1 клетку	5,5
	инсулиновые рецепторы адипоцитов, связывание с отрицательной кооперативностью	$3 \cdot 10^{-9}$	50 тыс. на 1 клетку ¹	7,1	$2,5 \cdot 10^{-10}$	45 тыс. на 1 клетку	6,8
Ginsberg et. al., 1976 [21]	инсулиновые рецепторы моноцитов, связывание с отрицательной кооперативностью	$7,7 \cdot 10^{-9}$			$8 \cdot 10^{-9}$	16 тыс. на 1 клетку	4,7
	инсулиновые рецепторы эритроцитов, связывание с отрицательной кооперативностью	$3 \cdot 10^{-9}$			$4 \cdot 10^{-9}$	4 тыс. на 1 клетку	3,9
Davis et. al., 1977 [19]	связывание налоксона с мембранами мозга крыс с положительной кооперативностью	$3,8 \cdot 10^{-9}$	64 фмоль на 1 мг белка ¹	43	$3,2 \cdot 10^{-9}$	118 фмоль на 1 мг белка	3,2
	связывание морфина с мембранами мозга крыс с положительной кооперативностью	$3,8 \cdot 10^{-9}$	132 фмоль на 1 мг белка ¹	3,5	$4,5 \cdot 10^{-9}$	115 фмоль на 1 мг белка	3,3
Hazum et. al., 1979 [24]	неравновесное связывание [D Ala2] β-эндорфина лимфоцитами человека				$6 \cdot 10^{-9}$	170 нМ	2,1
Powel Jones et. al., 1981 [30]	рецепторы тиреотропного гормона щитовидной железы, связывание с отрицательной кооперативностью	$5,7 \cdot 10^{-10}$			$6 \cdot 10^{-10}$	500 на 1 клетку	5,8
Crane et. al., 1982 [18]	ангиотензиновые рецепторы мембран печени, два типа некооперативных мест связывания лиганда	$0,15 \cdot 4,6 \cdot 10^{-10}$	1,74 пмоль на 1 мг белка ¹		$1,6 \cdot 10^{-9} \cdot 5 \cdot 10^{-10}$	1,2-0,8 пмоль на 1 мг белка	4,9
Guillon et. al., 1982 [22]	вазопрессиновые рецепторы почек, связывание с положительной кооперативностью	$5 \cdot 10^{-9}$			$5 \cdot 10^{-9}$	1,5 пмоль на 1 мг белка	1,9
Серегев, 1984 [13]	связывание кортикостерона двумя типами некооперативных рецепторов на плазматических мембранах гепатоцитов	$1,14 \cdot 10^{-9 \cdot 2}$	1,04 пмоль на 1 мг белка ²		$1,1 \cdot 10^{-9}$ $4 \cdot 10^{-9}$	0,42 4 пмоль на 1 мг белка	2,3
	связывание эстрадиола двумя типами некооперативных рецепторов на плазматических мембранах гепатоцитов	$1,64 \cdot 10^{-9 \cdot 2}$	0,15 пмоль на 1 мг белка ²		$1,5 \cdot 10^{-9}$ $8 \cdot 10^{-9}$	0,17 10 пмоль на 1 мг белка	2,5
Ярыгин и соавт., 1987 [15]	связывание SKF 10047 спленоцитами мыши с положительной кооперативностью				$2 \cdot 10^{-9}$	130 фмоль на 1 мг белка	4,4
DeSouza et. al., 1987 [20]	связывание галоперидола с положительной кооперативностью лимфоцитами человека		1 нмоль на 1 мг белка ¹		$3,5 \cdot 10^{-9}$	0,8 нмоль на 1 мг белка	4,5
	связывание галоперидола с положительной кооперативностью спленоцитами мыши		1,2 нмоль на 1 мг белка ¹		$2,1 \cdot 10^{-9}$	1,9 нмоль на 1 мг белка	1,2
Wolfa et. al., 1988 [36]	связывание галоперидола с положительной кооперативностью лейкоцитами человека	$4,4 \cdot 10^{-10}$			$5,6 \cdot 10^{-10}$	3 нмоль на 1 мг белка	6,8
Shahabi et. al., 1990 [33]	связывание β-эндорфина с отрицательной кооперативностью с линией мононуклеарных клеток человека (U937)	$1,2 \cdot 10^{-8}$	40 фмоль на 10^6 клеток ¹	3,9	$8 \cdot 10^{-9}$	51 фмоль на 10^6 клеток	3,6
Radulescu et. al., 1991 [32]	связывание ВІТ с отрицательной кооперативностью спленоцитами мыши		5 50 фмоль на 10^6 клеток		$3,2 \cdot 10^{-9}$	39 фмоль на 10^6 клеток	7,1
Дубинин и соавт., 1994 [10]	связывание налоксона со спленоцитами мышей с положительной кооперативностью		4 фмоль на 10^6 клеток		$5 \cdot 10^{-9}$	3 фмоль на 10^6 клеток	2,2
Bian et. al., 1995 [17]	связывание морфина с положительной кооперативностью с Т-клетками мыши				$2 \cdot 10^{-9}$	2 фмоль на 10^6 клеток	3,8
	связывание морфина с положительной кооперативностью с В-клетками мыши				$3,2 \cdot 10^{-9}$	5 фмоль на 10^6 клеток	4,5
Дубинин, 1997 [11]	связывание налоксона с положительной кооперативностью лимфоцитами мыши		30 фмоль на 10^6 клеток		$6 \cdot 10^{-9}$	28 фмоль на 10^6 клеток	2,2
Slotkin et. al., 1998 [35]	неравновесное связывание имипрамина тромбоцитами человека	$1,4 \cdot 10^{-9}$	780 фмоль на 1 мг белка	5,1	$1,2 \cdot 10^{-9}$	800 фмоль на 1 мг белка	3,8

Примечания. K_d – константа диссоциации, B_0 – число мест связывания, СКО – среднеквадратичное отклонение, ¹ – концентрация мест связывания оценивалась по насыщающим концентрациям лиганда, ² – только высокоаффинные места связывания.

табл. 6, рассчитанные нами концентрации мест связывания налоксона и морфина примерно равны. При этом СКО не превышает 3,3%.

Таким образом, была показана правомерность применения математического моделирования для различных рецепторных систем, в которых анализ параметров связывания традиционными методами затруднен или невозможен. Рассчитанные параметры рецепторного связывания близки к оригинальным в тех случаях, когда авторам удалось их определить, при этом применение метода сопряженных градиентов позволяет уменьшить СКО.

В заключение отметим, что ранее нами было показано [2], что, с формальной точки зрения, уравнение ассоциации лиганда с рецептором (уравнение Кларка) аналогич-

но уравнению ассоциации фермента с субстратом (уравнение Михаэлиса–Ментен), уравнению лимитирования клеточного роста по субстрату (уравнение Моно). Можно показать, что уравнение Кларка также аналогично уравнению ассоциации белка-переносчика с гормоном [31], антигена с антителом [12] и другим уравнениям, описывающим поведение обратимых двухкомпонентных систем. Поэтому можно предположить, что математическое моделирование также применимо для анализа таких систем, как «фермент–субстрат», «антиген–антитело», «белок-переносчик–гормон» и др.

Автор выражает признательность проф. С.Д. Варфоломееву за помощь, оказанную при подготовке и обсуждении текста статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Варфоломеев С.Д., Зайцев С.В. Кинетические методы в биохимических исследованиях. М., 1982.
2. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика. Практический курс. М., 1999.
3. Галактионов С.Г., Голубович В.П., Шендерович М.Д., Архем А.А. Введение в теорию рецепторов. М., 1986.
4. Гилл Ф., Мюррей У., Райт М. Практическая оптимизация. М., 1985.
5. Гуревич К.Г. // Биохимия. 1997. **62**. С. 1121.
6. Гуревич К.Г. М., 1998. С. 108.
7. Гуревич К.Г. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 1999. № 3. С. 31.
8. Гуревич К.Г. Тезисы международной конференции студентов и аспирантов «Ломоносов-99». Москва, 20–23 апреля 1999. С. 195.
9. Гуревич К.Г., Захаренко О.М., Чекалина Н.Д. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 1999. № 1. С. 32.
10. Дубинин К.В., Захарова Л.А., Алексеев Т.А., Кхегаи Л.А., Зайцев С.В. // Биохимия. 1994. **59**. № 8. С. 1230.
11. Дубинин К.В. Дис. ... канд. хим. наук. М., 1997.
12. Кантор Ч., Шиммель П. Биофизическая химия. М., 1984.
13. Сергеев П.В. Стероидные гормоны. М., 1984.
14. Хемминг Р. Численные методы. М., 1972.
15. Ярыгин К.Н., Сухих Г.Т., Виноградов В.А., Крыжановский Г.Н. // Бюлл. эксп. биол. мед. 1987. **104**. № 12. С. 700.
16. Beck J.S., Goren H.J. // J. Recept. Res. 1983. **3**. P. 561.
17. Bian T.H., Wang X.F., Li X.Y. // Chung. Kuo. Yao Li Hsuch Pao.(China), 1995. Supl. **16**. P. 315.
18. Crane J.K., Campanile C.P, Garrison J.C. // J. Biol. Chem. 1982. **257**. P. 4959.
19. Davis M.E., Akera T., Brody T.M., Watson L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. **74**. P. 5764.
20. DeSouza E.B., Kulsakdinum C., Wolfe S.A., Battaglia Jz. G. // Fed. Proc. 1987. **46**. P. 1138.
21. Ginsberg B.H., Kahn C.R., Roth J. // Biochim. Biophys. Acta. 1976. **443**. P. 227.
22. Guillon G., Butlen D., Cantau B., Barth T., Jard S. // Eur. J. Pharmacol. 1982. **85**. P. 291.
23. Jose M.V., Larralde C. // Math. Biosci. 1982. **58**. P. 159.
24. Hazum E., Chang K.J., Cuatrecasas P. // Sci. 1979. **205**. P. 1033.
25. Kahn C.R. // J. Cell Biol. 1976. **70**. P. 261.
26. Klotz I.M. // Sci. 1982. **217**. P. 1247.
27. Knight M., Klee W.A. // J. Biol. Chem. 1978. **253**. P. 3843.
28. Mannervik B. // Meth. Enzymol. 1982. **87**. P. 370.
29. Munson P.J. // Meth. Enzymol. 1983. **92**. P. 543.
30. Powel-Jones C.H., Saltiel A.R., Thomas C.G. Jr., Nayfeh S.N. // Cancer Res. 1981. **41**. P. 2360.
31. Ross B., Wolff R.C. // J.Theor. Biol. 1998. **190**. P. 333.
32. Radulescu R.T., DeCosta B.R., Jacobson A.E., Rice K.C., Blalock J.E., Carr D.J.J. // Progress in Neuroendocrinimmunol. 1991. **4**. P. 166.
33. Shahabi N.A., Peterson Ph. K., Sharp B. // Endocrinol. 1990. **126**. P. 3006.
34. Shoup D., Szabo A. // Biophys. J. 1982. **40**. P. 33.
35. Slotkin T.A., Hays J.C., Nemeroff C.B., Carroll B.J. // Depression and Anxiety. 1997. **6**. P. 19.
36. Wolfa S.A., Kulsakdinum C., Battaglia G., Jaffe J.H., DeSouza E.B. // J. Pharmacol. Exper. Ther. 1988. **247**. P. 1114.