

Министерство образования и науки Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Казанский институт биохимии и биофизики

Казанского научного центра Российской академии наук

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение

высшего профессионального образования

«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

Проскурина Светлана Евгеньевна

**Влияние оксида азота (NO) на активность фермента ацетилхолинэстеразы в
нервно-мышечном синапсе крысы**

03.01.02 – биофизика

03.03.01 – физиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук,

Петров Константин Александрович

Казань – 2016

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1. Строение и функционирование нервно-мышечного синапса.....	11
1.2. Пресинаптическая клетка: структура и функционирование.....	13
1.3. Синаптическая щель.....	15
1.3.1. Ацетилхолинэстераза. Многообразие форм фермента. Ацетилхолинэстераза нервно-мышечного соединения.....	16
1.3.2. Эндогенная регуляция активности ацетилхолинэстеразы.....	19
1.4. Постсинаптическая клетка.....	24
1.4.1. Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы: строение, функционирование, регуляция.....	24
1.4.2. Аминокислотные медиаторы в нервно-мышечном синапсе.....	29
1.4.2.1. Рецепторы глутамата.....	31
1.4.2.2. Фармакология и механизм активации NMDA-рецепторов.....	32
1.4.2.3. Функции NMDA-рецепторов.....	33
1.4.2.4. Кальциевый ток через NMDA-рецепторы.....	35
1.4.3. Оксид азота: физиологическая роль оксида азота, функция, синтез, мишени, распространение в различных органах и тканях.....	38
1.4.3.1. Синтаза оксида азота и ее регуляция.....	39
1.4.3.2. Сигналинг оксида азота: NO/цГМФ-сигнальный путь.....	41
1.4.3.3. S-нитрозилирование как реакция, опосредующая действие оксида азота.....	43
1.4.4. Организация комплекса NMDA-рецептор/NO-синтаза и его функциональная роль в синапсах.....	46

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	51
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	55
3.1. Влияние донора NO на активность АХЭ <i>in vitro</i>	55
3.2. Влияние донора NO на амплитудно-временные параметры МТКП в нервно-мышечном синапсе.....	57
3.3. Влияние активации NMDA-рецепторов на мембранный потенциал покоя клетки.....	63
3.4. Эффект глутамат-опосредованной активации эндогенного синтеза NO на параметры МТКП.....	67
3.5. Исследования непосредственного влияния аминокислот на активность АХЭ <i>in vitro</i>	70
3.6. Исследование влияния глутамата и глицина на амплитудно-временные параметры МТКП в присутствии блокатора NMDAR и ингибитора NO-синтазы.....	71
3.7. Увеличение амплитуды МТКП через активацию NMDAR связано с фосфатазной активностью, а не с синтезом белка <i>de novo</i>	74
3.8. Активация NMDAR эндогенным глутаматом приводит к увеличению амплитуды МТКП, регистрируемых в межстимульные интервалы, при высокочастотной стимуляции.....	76
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	80
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	86
ВЫВОДЫ.....	89
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	91

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АХ	Ацетилхолин
АХР	Ацетилхолиновый рецептор
nАХР	Никотиновый ацетилхолиновый рецептор
АХЭ	Ацетилхолинэстераза
БуХЭ	Бутирилхолинэстераза
МТКП	Миниатюрный ток концевой пластинки
цАМФ	Циклический аденозинмонофосфат
ФОС	Фосфорорганическое соединение
NMDA	N-метил d-аспартат
цГМФ	Циклический гуанозинмонофосфат
ЦНС	Центральная нервная система
NO	Оксид азота (II)
NOS	Синтаза оксида азота
МПКП	Миниатюрный потенциал концевой пластинки
ПКП	Потенциал концевой пластинки
ПД	Потенциал действия
AMPA	α -амино-3-гидроксил-5-метил-4-изоксазол-пропионат
L-NAME	NG-нитро-L-аргинин-метил-эстер
AP5	DL-2-амино-2-фосфопентаноиковой кислотой
5,7-КА	5, 7-дихлорокинуреновая кислота
Glu	Глутамат
Gly	Глицин
ОА	Окадаиковая кислота
СНХ	Циклогексимид
NMDAR	NMDA-рецептор

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Одним из ключевых ферментов, обеспечивающих синаптическую передачу возбуждения в холинэргических синапсах, является ацетилхолинэстераза (АХЭ), который ограничивает время воздействия медиатора ацетилхолина (АХ) на рецепторы постсинаптической мембраны, гидролизуя его до холина и ацетата. Поскольку АХЭ определяет продолжительность действия АХ на ацетилхолиновые рецепторы (АХР), и соответственно, амплитуду и длительность постсинаптических ответов, поиск способов модуляции активности этого фермента является предметом многих исследований. Частичное ингибирование АХЭ экзогенными ингибиторами широко применяется в медицине для компенсации уменьшения количества секретируемого ацетилхолина и снижения чувствительности постсинаптической мембраны к этому медиатору (при болезни Альцгеймера, миастении гравис, синдроме Ламберта-Итона, врожденных миастенических синдромах и т.д.). Причем применение ингибиторов АХЭ часто единственный способ восстановления синаптической передачи при данных заболеваниях. Учитывая, что частичное ингибирование АХЭ действительно крайне эффективный способ увеличения фактора надежности синаптической передачи, легко представить, что модуляция активности АХЭ веществами эндогенной природы также может иметь место, например, как один из механизмов кратковременной синаптической пластичности. Однако, поскольку о существовании эндогенных ингибиторов АХЭ не было известно, то данный способ модуляции амплитудно-временных параметров синаптических ответов ранее не обсуждался. Количество АХЭ в синаптической щели не является постоянной величиной и регулируется в ответ на изменение условий функционирования синапса. Известно, что уровень синтеза АХЭ и, соответственно, её количество контролируется паттерном активности

синапса (Lomo et al., 1985). Усиление частоты стимуляции усиливает синтез АХЭ и, наоборот, уменьшение синаптической активности уменьшает синтез АХЭ (Rotundo et al., 2003; 2008). Однако, описанные механизмы регуляции активности этого фермента – относительно длительные процессы, занимающие несколько часов и включающие регуляцию синтеза АХЭ, её секреции и закоривания в синаптической щели. Поскольку изменения физиологической активности происходят значительно быстрее, то логично предположить существование и других, более быстрых путей регуляции активности АХЭ. И действительно, показано, что *in vitro* фосфорилирование АХЭ способно ускорять скорость гидролиза субстрата в десять раз (Grifman et al., 1997), но неизвестно существуют ли *in vivo* популяции фермента, фосфорилированные в разной степени. Поэтому вопрос о существовании этого типа регуляции *in vivo* остается открытым.

И, напротив, существуют данные, свидетельствующие, что молекулы оксида азота способны оказывать ингибирующий эффект на активность АХЭ. Не так давно были получены данные о том, что Spermine NONOate – донор оксида азота (NO) *in vitro* способен ингибировать активность кортикальной АХЭ (Udayabanu et al., 2008).

Оксид азота – газообразный мессенджер, играющий роль модулятора разнообразных функций организма, включая синаптические процессы, связанные с реализацией синаптической пластичности и секреции нейротрансмиттеров. Мишенью для NO могут быть самые различные синаптические белки. В настоящее время наиболее хорошо изученной мишенью для NO является растворимая гуанилатциклаза (sGC), которая может не только активироваться молекулами NO, но и обратимо десенситизироваться в присутствии оксида азота (Sayed et al., 2007). Показано, что десенситизация sGC реализуется путем S-нитрозилирования остатков цистеина. Кроме того, показано, что NO способен ингибировать проводимость Na⁺-каналов в нейронах спинного мозга (Renganathan et al.,

2002), активировать рианодин-чувствительные кальциевые каналы (Schuman, Madison, 1994; Stamler, Meissner 2001), увеличивать скорость образования комплекса VAMP/SNAP-25/синтаксин (Pan et al., 1996; Wildemann, Bicker, 1999).

В связи с этим возник вопрос – действительно ли молекулы оксида азота способны регулировать активность АХЭ в синаптической щели?

Если это так, то данный механизм регуляции активности гидролизующего АХ фермента может играть значительную роль в нервно-мышечной передаче, поскольку широко известно, что, во-первых, мышечные волокна достаточно хорошо экспрессируют NO-синтазу, и, во-вторых, значительная часть этого фермента локализуется именно в области синаптического контакта (Stamler, Meissner, 2001). Эти факты позволили нам выдвинуть гипотезу о возможности регуляции активности синаптической АХЭ этим газообразным мессенджером.

Цель данной работы – исследовать возможность модуляции активности ацетилхолинэстеразы в нервно-мышечном синапсе теплокровных оксидом азота (NO) экзогенного и эндогенного происхождения.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи.

1. Изучить влияние донора оксида азота SNAP на активность ацетилхолинэстеразы гомогенатов мышцы длинный разгибатель пальцев (*m. extensor digitorum longus*) крысы.
2. Исследовать эффекты SNAP на амплитудно-временные характеристики миниатюрных токов концевой пластинки в синапсах с интактной и ингибированной ацетилхолинэстеразой в условиях *ex vivo*.
3. Выяснить роль глутаматных NMDA рецепторов в обеспечении усиления синтеза эндогенного NO и изменения амплитуды и длительности миниатюрных токов концевой пластинки в синапсах с интактной и ингибированной ацетилхолинэстеразой.

4. Исследовать влияние эндогенного глутамата, выделяемого в синаптическую щель при ритмической стимуляции двигательного нерва, на амплитудно-временные параметры миниатюрных токов концевой пластинки.

Научная новизна

В данной работе впервые было показано, что оксид азота как экзогенного, так и эндогенного происхождения способен ингибировать активность ацетилхолинэстеразы в нервно-мышечном синапсе крысы. Эффект эндогенного оксида азота опосредуется активацией NMDA-рецепторов и последующим увеличением активности NO-синтазы — фермента, продуцирующего NO. Таким образом, впервые были получены данные о возможности быстрой модуляции активности синаптической ацетилхолинэстеразы эндогенными ингибиторами.

Научно-практическая значимость работы

Так как оксид азота действительно способен угнетать активность ацетилхолинэстеразы в нервно-мышечном синапсе, необходимо учитывать этот антихолинэстеразный эффект доноров NO при их использовании в медицинской практике. Результаты данной работы проливают свет на механизм эндогенной модуляции активности одного из ключевых в холинэргической нейротрансмиссии ферментов, таким образом, внося вклад в развитие синаптологии и открывая перспективы для дальнейших исследований эндогенной регуляции активности синаптических белков. Экспериментальные данные, изложенные в работе, могут быть использованы в клинической практике, в научных учреждениях, занимающихся изучением эндогенных модуляторов синаптических процессов и исследованием влияния

оксида азота, а также в учебном процессе при чтении курсов лекций по физиологии человека и животных, нейробиологии и биофизики в ВУЗах.

Положения, выносимые на защиту:

1. Увеличение содержания оксида азота в нервно-мышечном соединении вызывает угнетение активности синаптической ацетилхолинэстеразы.
2. Активация комплекса «NMDA-рецептор – NO-синтаза», приводящая к усилению продукции эндогенного оксида азота, способна снижать активность ацетилхолинэстеразы нервно-мышечных синапсов.

Апробация работы

Результаты исследования докладывались на 4-ой международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2014), на 11-м Международном Конгрессе, посвященном холинэстеразам (11th International Meeting on Cholinesterases, Казань, 2012), на Международном симпозиуме «Molecular Mechanisms of Synaptic Transmission Regulation» (Киев, 2012), на IV Всероссийском с международным участием Конгрессе молодых ученых-биологов Симбиоз-Россия 2013., (Иркутск, 2013), на Международном симпозиуме «Газомедиаторы: физиология и патофизиология», (Казань, 2014), на Международной научно-технической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов «Прикладная электродинамика, фотоника и живые системы», (Казань, 2015), на Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2015г).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, среди которых 3 публикации в рецензируемых журналах, включенных в список ВАК и реферативную базу SCOPUS.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 134 страницах машинописного текста, включает 12 рисунков. Список цитируемой литературы содержит 353 источников, из них 351 иностранных авторов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Строение и функционирование нервно-мышечного синапса

Нервно-мышечный синапс является одним из наиболее изученных объектов физиологии, интерес к которому не угасает последние семьдесят лет, несмотря на это каждый год наши знания о его структуре и функционировании дополняются новыми сведениями, которые показывают невероятную сложность строения и множество взаимосвязей между составными частями синаптического аппарата. Анализ периферических нервно-мышечных синапсов помог раскрыть основные принципы синаптогенеза (Sanes, Lichtman, 1999; Kummer et al., 2006; Witzemann, 2006; Wu et al., 2010) и внести значительный вклад в понимание природы различных патологий, таких как миастенические синдромы, интоксикация различными ядами природного и антропогенного происхождения, каналопатии, формируя основу для улучшения и развития стратегий лечения (Engel, 2011). Научившись грубо регулировать работу синапса извне, при помощи фармакологических агентов, таких как каналоблокаторы, агонисты рецепторов, ингибиторы ферментов, мы все еще не много знаем об эндогенной регуляции синаптической передачи, в то время как понимание этих процессов и раскрытие обеспечивающих их механизмов, позволило бы нам не только внести вклад в развитие синаптологии, но, что важнее, разработать более естественные модулирующие способы воздействия на синапс и тонко регулировать его функционирование в случае нарушения синаптической передачи. Поиску таких путей модуляции и посвящена эта работа. В данном обзоре литературы нам бы хотелось сконцентрировать внимание на роли ацетилхолинэстеразы, оксида азота и глутаматэргической

регуляции синтеза оксида азота в осуществлении процесса нервно-мышечной передачи.

В классическом представлении, нервно-мышечный синапс состоит из пресинаптической мембраны, синаптической щели и постсинаптической области, представляющей собой особую структуру на поверхности мембраны мышечной клетки (Robertson, 1956). Основная функция нервно-мышечного соединения состоит в передаче сигнала от пресинаптической клетки к постсинаптической при помощи сигнальной молекулы – медиатора. На сегодняшний день известно большое количество медиаторов различных по свойствам, строению и способу воздействия на постсинаптическую клетку. Однако, в периферической нервной системе, и, в частности, в нервно-мышечных контактах наиболее распространенным является ацетилхолин. В ответ на потенциал действия, распространяющийся по нервному волокну, из пресинаптического окончания выделяется ацетилхолин, который передает электрическое возбуждение через синаптическую щель химическим образом. При этом трансмиттер может выделяться как квантово – то есть, загружаться в пресинаптические пузырьки — везикулы (De Robertis, Bennett, 1955; Robertson, 1956), которые, сливаясь с мембраной клетки, выбрасывают медиатор в процессе экзоцитоза в просвет синаптической щели (Fatt, Katz, 1952; del Castillo, Katz, 1956), так и неквантово – невезикулярным образом (Vyskocil, Illés, 1977), точный механизм которого на сегодняшний день неопределен. Выделившийся медиатор воздействует на рецепторы постсинаптической мембраны, обуславливая возникновение возбуждения в мышечной клетке. По сути, вся структурная и функциональная организация нервно-мышечного соединения — пресинаптического окончания, синаптической щели и постсинаптической мембраны — служит одной цели — обеспечить надежную передачу возбуждения между нервом и мышцей. Для более четкого понимания особенностей работы синапса, рассмотрим

подробнее структурные компоненты и механизм функционирования нервно-мышечного соединения.

1.2. Пресинаптическая клетка: структура и функционирование

Пресинаптическое окончание представляет собой нервную терминаль, лишенную миелиновой оболочки, оно имеет особую активную зону мембраны, в которой осуществляются процессы, связанные с экзоцитозом нейромедиатора. Ацетилхолин здесь упакован в пресинаптические везикулы, выстроенные на мембране активной зоны и ассоциированные с кальциевыми каналами и крупным макромолекулярным комплексом, осуществляющим высвобождение медиатора (Seagar et al., 1999; Sudhof, 2004). Когда потенциал действия достигает нервной терминали, кальциевые каналы активируются, кальций поступает в пресинаптическую клетку и локальная его концентрация быстро нарастает, обеспечивая слияние мембран синаптических везикул и плазматической мембраны нервного окончания (Cohen-Cory, 2002).

Электронная микроскопия выявила колоколизацию транспортеров ацетилхолина и глутамата в одних и тех же везикулах пресинаптических окончаний в центральной нервной системе, что позволяет предположить возможность загрузки глутамата и ацетилхолина в одни и те же везикулы. При этом, если уменьшить количество АХ в пресинаптической клетке, например, повредив ген холинацетилтрансферазы, то и выброс глутамата снизится. Более того, АХ усиливает обратный захват глутамата в везикулы (Frahm et al., 2015). Многие холинэргические нейроны содержат глутаматные везикулярные транспортеры или выделяют глутамат как ко-медиатор, включая нейроны коры головного мозга (Allen et al., 2006; Gritti et al., 2006; Henny, Jones, 2008), спинальные мотонейроны (Nishimaru et al., 2005), нейроны *Torpedo californica* (Li, Harlow, 2014). Котрансмиссия АХ и

глутамата, таким образом, это скорее правило, чем исключение, поднимающее фундаментальный вопрос о роли котрансмиттерного высвобождения и синергии медиаторов в холинэргических синапсах (Frahm et al., 2015).

К пресинаптическим структурам также можно отнести и Шванновские клетки. В нервно-мышечном соединении от трех до пяти Шванновских клеток прикрывают нервную терминаль (Auld, Robitaille, 2003). Такая структура несет защитную функцию и предотвращает механические и химические повреждения нервного окончания. Шванновские клетки принимают участие во многих процессах функционирования и формирования синапса, включая модуляцию синаптической передачи, рост нервного окончания, аксональный спраутинг и регенерацию нерва (Koirala et al., 2003, Reddy et al., 2003). Шванновские клетки могут влиять на нервно-мышечную передачу, модулируя выброс ацетилхолина (Auld, Robitaille, 2003). Однако, удаление этих клеток с терминали при помощи комплемент-индуцированного лизиса, не влияет на частоту и амплитуду синаптических ответов. В условиях стимуляции нерва в Шванновской клетке наблюдается повышение уровня кальция, что говорит о способности этих клеток реагировать на активность нервного волокна (Reist, Smith, 1992). Влияние нейронной активности на Шванновскую клетку не связано с изменением концентрации внеклеточного кальция, высвобождающегося из стимулируемого нерва (Reist, Smith, 1992), но вызвано активацией рецепторов к нейромедиатору, расположенных на мембране Шванновской клетки. Шванновская клетка реагирует на агонистов мускариновых пуриновых рецепторов (Robitaille, 1995; Rochon et al 2001). Кроме того, на ней локализуется фермент бутирилхолинэстераза (Davis, Koelle, 1967), который расщепляет ацетилхолин, препятствуя его утечке из синаптической области. Было показано, что при блокировании АХЭ и БуХЭ, находящиеся на Шванновской клетке $\alpha 7$ -нАХР, возбуждаясь, угнетают выброс

ацетилхолина нервной клеткой (Petrov et al., 2014). Также, помимо этого, в Шванновской клетке синтезируется оксид азота (Descarries et al., 1998). Ранее было показано, что nNOS обнаруживается в этих клетках только в условиях денервации, в то время как в нормальных условиях, наличие ее не было выявлено (Ribera et al., 1998). Эти результаты указывают на то, что nNOS Шванновских клеток может участвовать в физиологической модуляции высвобождения АХ и в регуляции мышечной реакции на повреждение нерва. Кроме того, Шванновская клетка синтезирует и выделяет факторы роста, такие как нейрегулин и фактор роста нервов, которые обеспечивают выживание нейрона, его рост, развитие т.д. (Bunge, 1994; Gomes et al., 2001; Rochon et al., 2001; Sanes, Lichtman, 1999). В синапсах ЦНС была показана взаимосвязь между ингибированием АХЭ и нейропротекторным действием фактора роста нервов, выделяемого глиальными клетками. Так, совместное применение ингибиторов АХЭ и блокаторов NMDAR снижает нейродегенеративное влияние последних, усиливая экспрессию BDNF (фактора роста нервов) (Bendix et al., 2014), что, предположительно, снижает синтез оксида азота (Maiese et al., 1993). В свою очередь, нейрегулин может активировать экспрессию якорных субъединиц АХЭ, таких как ColQ-субъединица (Lee et al., 2004).

1.3. Синаптическая щель

Пространство в 50 нм, названное синаптической щелью, отделяет нерв от плазматической мембраны мышцы и состоит из базальной пластинки, которая заполняет синаптическую щель и может связывать рецепторы прилегающих мембран, обеспечивая клеточную адгезию и сигнализацию между различными компонентами нервно-мышечного соединения. Молекулы медиатора диффундируют через синаптическую щель к рецепторным белкам, закрепленным на постсинаптической мембране.

Диффузия АХ через синаптическую щель происходит довольно быстро, благодаря небольшому расстоянию и относительно высокой константе диффузии для АХ (Land et al., 1984). Базальная мембрана содержит коллаген IV, ламинин, фибронектин, энтактин и перлекан (Patton, 2003) и, хотя сходный состав белковых компонентов обнаруживается и вне синаптической области (Yurchenco, O'Rear, 1994), их изоформы различаются между разными участками. Помимо прочих белков, на базальной мембране также располагается одна из форм ацетилхолинэстеразы (Anglister et al., 1991), действие которой проявляется в расщеплении АХ, диффундирующего от постсинаптической мембраны после его связывания с рецептором и, таким образом, ограничении времени действия медиатора в синаптической щели. Ингибирование АХЭ, соответственно, повышает активацию АХР и замедляет падение АХ-вызванного тока концевой пластинки (Katz, Miledi, 1973; Karlin, 2002). Это отражается на амплитудно-временных параметрах синаптических ответов.

1.3.1. Ацетилхолинэстераза. Многообразие форм фермента.

Ацетилхолинэстераза нервно-мышечного соединения

Ацетилхолинэстераза — один из наиболее изученных ферментов и первый выделенный и очищенный синаптический белок (Marnay, 1937). Семейство холинэстераз включает в себя ацетилхолинэстеразу и бутирилхолинэстеразу, которые сходны по структуре, скорости гидролиза ацетилхолина, функции (Nicolet et al., 2003), но отличаются по локализации в организме. Бутирилхолинэстераза (БуХЭ), как уже упоминалось, присутствует на поверхности Шванновских клеток, а также в плазме крови. Физиологических субстратов для нее не показано, но эта холинэстераза принимает участие в расщеплении кокаина и является антидотом при отравлениях антихолинэстеразными препаратами (Lockridge et al., 2005).

Нокаутные по гену бутирилхолинэстеразы животные более склонны к ожирению, так как БУХЭ способна подавлять активность гормона голода грелина и, возможно, участвовать в метаболизме жиров (Li et al., 2008).

АХЭ локализуется в синаптической щели, где она закреплена на базальной мембране, а также обнаруживается на пре- и постсинаптической плазматической мембранах. В зависимости от расположения и способа заякоривания фермента, различают несколько его изоформ. На плазматической мембране АХЭ закреплена посредством небольшой PRiMA-субъединицы (Proline-Rich Membrane Anchor - пролин-содержащий мембранный якорь) (Perrier et al., 2002), а на базальной мембране — при помощи нитей белка коллагена Q (ColQ) (Hall, 1973; Krejci et al., 1991; McMahan et al., 1978, Toutant, Massoulie, 1988; Massoulié et al., 2005; Massoulié, Von, 2006). При этом PriMA АХЭ обычно не так многочисленна в нервно-мышечном синапсе и, в основном, распространена в центральной нервной системе, но синтез этой изоформы может индуцироваться физическими нагрузками (Fernandez, Donoso, 1988).

АХЭ, сконцентрированная на базальной мембране, представляет собой асимметричный фермент, состоящий из гомотетрамеров глобулярных каталитических субъединиц, прикрепленных к коллагеновому хвосту (Krejci et al., 1991, 1997). Коллагеновый хвост сформирован тремя спирально переплетенными коллагеноподобными нитями, которые кодируются одним геном ColQ (Krejci et al., 1997), в котором может наблюдаться мутация, приводящая к возникновению миастенических синдромов, связанных с недостаточностью АХЭ в синапсе. Каталитическая субъединица тоже кодируется одним геном, но имеет два варианта карбоксильных терминалей, которые получаются вследствие альтернативного сплайсинга: АХЭ Т, Н и «readthrough» транскрипт четвертого экзона (Daniels, 2007; Taylor, 1993), они экспрессируются в мышце, эритроцитах, нервной ткани и др., соответственно, в случае патологии может наблюдаться недостаточность

АХЭ. Каталитические формы могут существовать в виде мономеров, димеров и тетрамеров, образуя глобулярные формы (G-формы: G1, G2, G4). Если к одному, двум или трем тетрамерам каталитической субъединицы присоединяется коллагеноподобный хвост – ColQ, образуется ассиметричная форма АХЭ – соответственно, А4, А8 или А12.

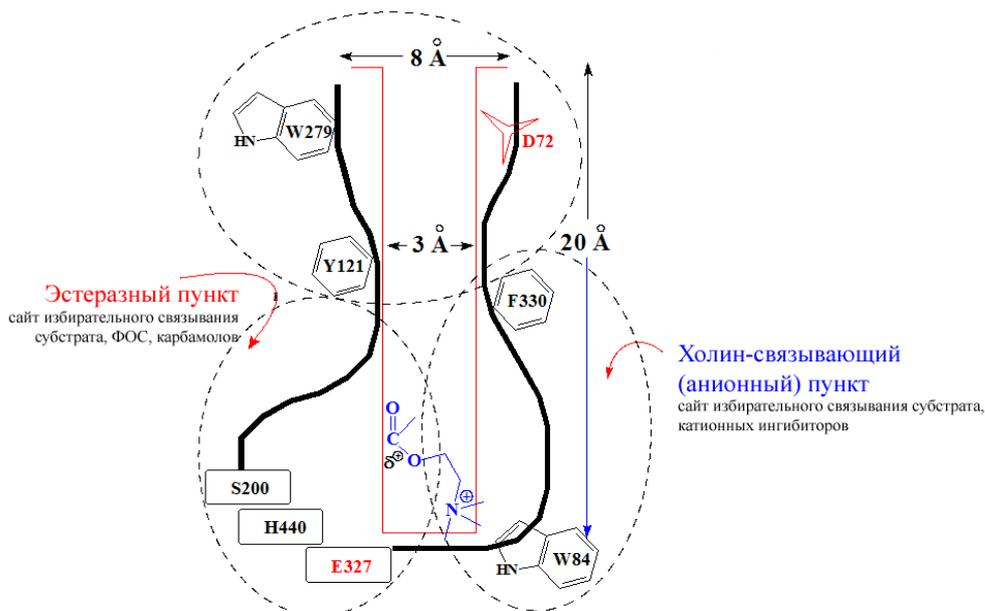


Рисунок – 1. Схематическое изображение ущелья активного центра АХЭ (по: Votti et al., 1999). Видна локализация аминокислотных остатков глутаминовой кислоты E327, гистидина H440, серина S200, (триада «каталитической машины»), триптофана W84 («холин-связывающий пункт»; «анионный»), тирозина Y121, фенилаланина F330 (гидрофобный участок, расположенный вокруг «холин-связывающего пункта»), аспарагиновой кислоты D72

АХЭ — высокоактивный фермент; за счет высокой скорости гидролиза (4000 молекул АХ в секунду) и особого расположения каталитических центров фермента относительно АХР, индивидуального для каждого синапса, АХЭ крайне эффективно расщепляет медиатор. Активный центр

фермента представлен каталитической триадой остатков аминокислот — серина, гистидина и глутаминовой кислоты. Принято считать, что активный центр АХЭ представляет собой эстеразный и анионный пункты (рис.1), при этом первый осуществляет непосредственно расщепление эфирной связи, в то время как второй присоединяет головку холина.

Также в структуре АХЭ можно выделить периферический анионный пункт, отвечающий за ингибирование субстратом, а также за неконкурентное ингибирование АХЭ. В мозгу АХЭ может колокализироваться с бета-амилоидными бляшками (Morgan et al., 1993) и, более того, выполнять роль шаперонов бета-амилоида, агрегируя этот белок на периферическом анионном пункте (Reyes et al., 2004).

Роль АХЭ в обеспечении нормального функционирования синапса значительна, соответственно, как патологические процессы, нарушающие функцию этого белка, так и антиАХЭ препараты, изменяющие его активность, способны оказывать большое влияние на нервно-мышечную передачу. Однако при нормальных, не патологических условиях, также может осуществляться регуляция активности АХЭ при помощи эндогенных механизмов.

1.3.2. Эндогенная регуляция активности ацетилхолинэстеразы

Экзогенные способы влияния на этот фермент давно используются в медицинской практике для устранения симптомов болезни Альцгеймера, Паркинсона, миастенических синдромов (Engel, 2007). В основном, это такие препараты как физостигмин, прозерин, и неостигмин, которые необратимо связываются с АХЭ, блокируя ее активность. Восстановление активности фермента в этом случае — процесс довольно длительный, поскольку включает в себя синтез, транспорт и заякоривание АХЭ. Другая сторона экзогенного влияния на АХЭ — это применение антихолинэстеразных

препаратов в качестве отравляющих веществ. Полное ингибирование АХЭ приводит к накоплению ацетилхолина в синаптической щели и последующему нарушению синаптической передачи, что приводит к летальным исходам (Shih, McDonough, 1997). Отравление антиАХЭ препаратами возможно, в частности, при использовании инсектицидов (инсектициды на основе антиАХЭ агентов: малатион, диазинон, фозалон и т.п.), или при участии в военных операциях (фосforoорганические боевые отравляющие вещества, такие как зарин, зоман, табун и т.п.).

Учитывая значительное влияние на синаптическую передачу регуляции АХЭ извне, логично предположить, что существуют и эндогенные способы менять активность этого белка. Однако каким образом самому организму удастся модулировать работу этого жизненно важного фермента?

Экспрессия АХЭ обуславливается как факторами со стороны нейрона, так и влиянием со стороны скелетной мышцы (Anglister, 1991; Anglister, Naessaert, 1992; Weinberg, Hall, 1979; Cresnar et al., 1994). В процессе развития мышечные волокна экспрессируют ассиметричную изоформу АХЭ по всей своей поверхности, однако, быстро начинают накапливать ее во вновь сформированных синапсах (Bevan, Steinbach, 1977, Chiu, Sanes, 1984; Ziskind-Conhaim et al., 1984). Небольшие количества АХЭ могут синтезироваться в нервной клетке (Anglister, 1991), однако большая часть этого фермента в нервно-мышечном соединении продуцируется мышечной тканью (De la Porte, 1986). У грызунов экспрессия и распределение различных форм АХЭ зависит от возраста, от типа мышечных волокон, сократительной активности и контроля со стороны мотонейрона (Massoulie et al., 1993). У крыс появление ColQ форм АХЭ совпадает с образованием нервно-мышечных контактов (Sketelj, Brzin, 1985; Legay et al., 1995). Кроме того, состав и распределение этих молекул различаются между быстрыми и медленными мышцами, что определяется типом их активности (Sketelj, Brzin, 1985; Gisiger, Stephens, 1988; Sketelj et al., 1998; Boudreau-Lariviere et al.,

2000). В быстрой мускулатуре, преобладает A12 изоформа (12 каталитических субъединиц АХЭ, ассоциированных с ColQ), которая локализуется при этом только в области нервно-мышечного контакта. В медленных волокнах широко распространены A8 и A4 изоформы (8 или 4 каталитические субъединицы ассоциированные с ColQ), причем они также обнаруживаются во внесинаптической области (Sketelj, Brzin, 1985; Lai et al., 1986).

Не только функциональные характеристики мышцы могут детерминировать присутствие тех или иных специфических изоформ АХЭ, но также и тип мотонейрона может быть определяющим фактором. Возможно, что последнее имеет большее влияние на общую активность и состав молекулярных изоформ АХЭ. К примеру, было показано, что вследствие денервации активность АХЭ в синапсе снижается и уменьшается количество специфических ColQ изоформ АХЭ во всех функциональных типах мышц и у разных видов животных (Hall, 1973; Vigny et al., 1976; Collins, Younkin, 1982; Sketelj, 1994; Silman et al., 1978; Fernandez, Stiles, 1984). Блокатор Na^+ -каналов тетродотоксин, может понижать число изоформ ассиметричного типа и уровень транскриптов АХЭ. Несмотря на то, что эффект тетродотоксина проявляется не столь заметно, как при денервации, его наличие говорит о том, что секретируемые нервом факторы тоже оказывают влияние на активность АХЭ (Rieger et al., 1980; Michel et al., 1994). Такое влияние подтверждается и тем, что данный блокатор и денервация могут менять состав изоформ АХЭ в мышцах млекопитающих по-разному (Boudreau-Lariviere et al., 1997). Фактически, именно режим нервной стимуляции влияет на соотношение молекулярных изоформ АХЭ (Lomo et al., 1985), более того, при изменении режима стимуляции, к примеру, при низкочастотной стимуляции быстрой мышцы, наблюдаются изменения изоморфного состава АХЭ в сторону такового медленной мышцы (Sketelj et al., 1997). Взаимодействие местных факторов и активности синапса

было показано в экспериментах *in vivo*, где вследствие денервации АХЭ исчезала из области синаптического контакта, в случае же стимуляции и реиннервации, АХЭ снова обнаруживалась в этом синапсе (Weinberg, Hall, 1979; Lømo, Slater, 1980). Таким образом, нерв регулирует экспрессию АХЭ, используя локальные механизмы и пути, зависящие от активности синаптической передачи.

Кроме влияния со стороны нерва и факторов, зависящих от активности синапса, есть и другие пути регуляции работы АХЭ. Например, АТФ, выделяемая в синапсах, активирует транскрипцию гена АХЭ в культуре миофибрилл посредством P2Y рецепторов (Choi et al., 2001). Кроме этого, окислительный стресс может существенно влиять на синтез и активность ацетилхолинэстеразы. Schallreuter с соавторами (2004) показали возможность активации/деактивации человеческой АХЭ при помощи пероксида водорода. De Carvalho Corrêa с соавторами, в 2008 обнаружили, что окислительный стресс при гипертензии изменяет активность АХЭ *in vivo*, а этанол (Rico et al., 2007), который вызывает синтез активных форм кислорода, способен изменять экспрессию и активность АХЭ.

В мозге крыс при гипертензии и нарушении памяти, наблюдается снижение уровня АХЭ (Srinivasan et al., 2005), также было показано, что стресс оказывает влияние на активность АХЭ и холинэргическую регуляцию (Srikumar et al., 2006). Введение пролина и аргинина также, вызывая окислительный стресс, ингибирует активность АХЭ коры мозга (Delwing et al., 2003; Wyse et al., 2004), что еще раз подтверждается сведениями о том, что гидроксильные радикалы участвуют в ингибировании АХЭ (Tsakiris et al., 2000).

Активность каждой молекулярной формы АХЭ регулируется селективно (Massoulie, Bon, 1982; Sketelj et al., 1991; Cresnar et al., 1994). Так, активность асимметричных изоформ АХЭ в развивающихся мышечных волокнах может регулироваться β -эндорфином и другими похожими по

строению пептидами (Haynes et al., 1984). В ходе дифференцировки мышечных клеток мРНК-связывающий белок HuR присоединяется к транскриптам АХЭ и регулирует их экспрессию (Deschênes-Furry et al., 2005). Экспрессия же нейрональной АХЭ может запускаться ретроградным сигналом от мышцы при помощи цАМФ-зависимых сигнальных путей (Jiang et al., 2003). В то же время, активация ацетилхолином нейрональных $\alpha 7$ рецепторов, вызывает увеличение уровня внутриклеточного цАМФ (Cheng et al., 2015), что, возможно, приводит к усилению синтеза АХЭ. Вообще, АХ способен регулировать активность АХЭ на генном уровне (Голиков и др., 1985). Было показано влияние взаимодействия nAChR и АХ на синтез отдельных молекулярных форм АХЭ. Активация АChR ацетилхолином является нейрональным фактором, необходимым для поддержания G1 и G2 изоформ АХЭ; количество A12 АХЭ определяется совместным действием АХ и некоторых нейрогенных факторов; а уровень G4 изоформы АХЭ обуславливается, помимо мышечных факторов, также и изменением частоты АХ-АChR взаимодействий (Fernandez, Hodges-Savola, 1992). Помимо этого, и другие синаптические белки способны регулировать активность АХЭ, к примеру, агрин индуцирует образование кластеров АХЭ/AChR (De la Porte et al., 1998) и, наряду с S-ламинином, обеспечивает правильное расположение АХЭ на мембране. Секреция нейрональной АХЭ осуществляется с участием микротрубочек, но без участия актина (Lucas, Kreutzberg, 1985), может индуцироваться посредством электрической стимуляции (Toutant, Massoulie, 1988) и регулироваться мышечной активностью (Brockman, Younkin, 1986; Fernandez-Valle, Rotundo, 1989; Vallette, Massoulie, 1991).

Большинство из перечисленных способов модуляции работы АХЭ — это довольно длительные процессы, связанные с изменением экспрессии и синтеза фермента, его секреции и заякоривания при помощи якорных субъединиц, такие процессы занимают десятки часов. Однако, учитывая, что физиологические изменения происходят быстрее, логично предположить

наличие более быстрых путей регуляции активности АХЭ в синапсе, например, при помощи ингибирования фермента веществами эндогенной природы. В опытах *in vitro* на гомогенатах мозга было установлено, что донор оксида азота (NO) способен подавлять активность АХЭ (Udayabanu et al., 2008). Учитывая множественность эффектов этого газообразного мессенджера, влияние оксида азота на активность АХЭ в нервно-мышечных синапсах представляется весьма вероятным.

1.4. Постсинаптическая клетка

Основным источником данных о синаптической передаче и ее изменениях в нервно-мышечном синапсе для электрофизиолога служат электрические процессы, происходящие на постсинаптической мембране мышечной клетки. Именно здесь происходит обратная трансформация химического стимула, передаваемого при помощи медиатора, в электрический процесс возбуждения. Степени ингибирования синаптической ацетилхолинэстеразы мы также можем оценить по характеру изменений амплитудно-временных параметров синаптических ответов. Какие именно структуры постсинаптической клетки и каким образом осуществляют последний этап передачи сигнала с нервной клетки на мышечную?

1.4.1. Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы: строение, функционирование, регуляция

Поверхность постсинаптической области мышечной клетки представляет собой складчатую структуру, в которой выделяют первичные и вторичные складки. За счет подобного строения площадь поверхности многократно увеличивается, что позволяет разместить на ней огромное количество ионотропных ацетилхолиновых рецепторов, так на одну

концевую пластинку приходится около 5 миллионов nAХР. Однако, эти рецепторы редки в глубине между складками, там, где располагаются натриевые каналы (Flucher, Daniels, 1989; Boudier et al., 1992). Ток, обеспечиваемый открытием каналов, ассоциированных с nAХР оказывает наибольший деполяризующий эффект на область мембраны в глубине складок, где сконцентрированы потенциалзависимые натриевые каналы. Открытие этих каналов в результате деполяризации увеличивает эффект нейротрансммиттера и обеспечивает восходящую фазу мышечного ПД (Ruff, 1992; Wood, Slater, 1997).

По чувствительности к агонистам выделяют два основных типа рецепторов ацетилхолина – никотиновые (nAХР) и мускариновые (mAХР) рецепторы. Никотиновые рецепторы являются ионотропными и ассоциированы с каналом, проницаемым для катионов, в частности натрия (Raftery et al., 1980). Для их активации и открытия канала необходимо связывание молекул ацетилхолина со специфическими участками на рецепторе; после открытия канала ионы натрия по градиенту концентрации устремляются в постсинаптическую клетку и вызывают в ней локальную деполяризацию мембраны, то есть возбуждающий постсинаптический потенциал. Кроме постсинаптических nAХР существуют и ауторецепторы на пресинаптической клетке, активация которых регулирует синаптическую передачу, в частности, оказывает влияние на выброс ацетилхолина (Tomas et al., 2014).

Мускариновые рецепторы — metabotropные рецепторы, ассоциированные с G-белками. Они не образуют поры для прохождения ионов, запуская, однако, каскад внутриклеточных реакций через систему вторичных посредников. Известно 5 подтипов мускариновых рецепторов (M1-M5), различающихся по типу G-белка, функции и локализации, а также действию антагонистов и блокаторов (Hulme et al, 1990).

Ацетилхолиновый рецептор один из самых важных белков в синаптическом контакте, более того, долгое время он был объектом интенсивных исследований и служил моделью для описания функционирования других лиганд-активируемых ионотропных рецепторов (Karlin, 2002). Рецептор расположен, как было сказано выше, на гребнях вторичных складок постсинаптической мембраны и у взрослых млекопитающих состоит из пяти субъединиц: двух α , одной β , δ и ϵ -субъединиц (Raftery et al., 1980).

Всего на постсинаптической мембране было обнаружено три различных подтипа nAChR: во взрослой мышце — $\alpha 1\beta 1\delta\epsilon$ nAChR, в процессе развития и после денервации — фетальный $\alpha 1\beta 1\delta\gamma$ nAChR, а также существует нейрональный $\alpha 7$ подтип. nAChR принадлежит к суперсемейству лиганд-управляемых ионных каналов с Cys-петлей, которые имеют общую архитектуру четырех трансмембранных доменов, составляющих каждую субъединицу, в которое также входят глициновый, 5-HT₃ и GABA_A рецепторы. Эти рецепторы синтезируются в мышечной клетке и закрепляются в мембране концевой пластинки с помощью белка рапсина весом в 43 кДа (Froehner et al., 1981). nAChR, сформированные из пяти субъединиц (Raftery et al., 1980), представляет собой цилиндрическую структуру с центральной порой для прохождения ионов. Каждая субъединица состоит из 400-500 аминокислотных остатков. Рецепторный комплекс пронизывает всю мембрану и выходит в экстраклеточное пространство. Всего у позвоночных было выделено 17 субъединиц этого рецептора: мышечные $\alpha 1$, $\beta 1$, δ , ϵ и γ субъединицы и нейрональные $\alpha 2$ — 10 и $\beta 2$ — 4 субъединицы (Lindstrom, 2003; Hogg et al., 2003). Субъединицам AChR свойственна высокая гомологичность аминокислотной последовательности, так, каждая из них содержит четыре α -спирали (M1-M4), пронизывающие плазматическую мембрану. Экстраклеточные участки субъединиц состоят из N- и C-терминальных последовательностей и участок между M2 и M3 петлей

формирует большое экстраклеточное преддверие, окружающее отверстие канала. Участки между M1 и M2 и между M3 и M4 спиралями формируют меньшее по диаметру устье поры канала (Lindstrom, 2003; Lindstrom, 2000; Unwin, 1996). Фосфорилирование и другие посттрансляционные модификации могут изменять свойства АХР и, в частности, фосфорилирование субъединиц может регулировать десенситизацию, вызываемую агонистами.

Мышечные nАХР имеют два различных сайта связывания агониста, один высокоаффинный сайт связывания расположен между $\alpha 1$ и δ -субъединицами, другой – с низкой аффинностью, на поверхности между $\alpha 1$ и ϵ или γ -субъединицами. Гетеромерный нейрональный nАХР снабжен двумя сайтами связывания, расположенными на поверхности между α и β -субъединицами (Luetje, Patrick, 1991). Нейрональные гомомерные подтипы рецепторов имеют пять потенциальных сайтов связывания (Hogg et al., 2003).

На экспрессию ацетилхолиновых рецепторов, а также на их активность, могут влиять различные факторы. Их можно разделить на две группы: связанные с активностью синапса и независящие от нее. Так, к первой группе можно отнести влияние физических упражнений, стимуляцию нерва, денервацию. При этом было показано, что физические упражнения увеличивают число nАХР в синаптической области (Desaulniers et al., 1998), а также, увеличивается количество и активность АХЭ (Crockett et al., 1975). Денервация же, напротив, снижает количество, как рецепторов, так и АХЭ в концевой пластинке, что приводит к нарушению структуры синапса. К факторам, не связанным с активностью, можно отнести, к примеру, фосфорилирование (Rudell, Ferns, 2013), действие нейрегулина (Kim et al., 2015) и др.

То, насколько эффективно возбуждается постсинаптическая мембрана в ответ на сигнал, поступающий от нервного волокна, чрезвычайно важно для осуществления конечной цели нервно-мышечной передачи —

собственно, сокращения мышцы. Эффективность передачи может быть разной и зависит от активности всех участников процесса: АХР, АХЭ, АХ, потенциал-управляемых натриевых каналов и т.д. Однако, для более объективной оценки изменения этой эффективности, особенно, в случае патологий, было введено понятие фактора надежности синаптической передачи. Именно с целью повышения этого фактора, в терапии используются препараты с антиАХЭ активностью. Из каких же составляющих складывается фактор надежности синаптической передачи и что собой представляет?

Когда мы наблюдаем электрофизиологическую активность скелетной мышцы, мы видим небольшие, спонтанные деполяризующие потенциалы на постсинаптической мышечной мембране. Эти низкоамплитудные ответы называют миниатюрными потенциалами концевой пластинки (МПКП), и каждый из них представляет собой небольшую деполяризацию, вызванную выделением одного кванта медиатора. МПКП составляют от одной сотой (у холоднокровных животных) до одной десятой (у теплокровных) амплитуды вызванного потенциала концевой пластинки, наблюдаемого при стимуляции нерва. За исключением амплитуды, МПКП похожи на ПКП по характеру нарастания и спада и по характеру изменения их параметров под воздействием различных химических агентов. Амплитуда ПКП является функцией амплитуды МПКП и квантового состава, который соответствует числу везикул с нейромедиатором, выделившихся под воздействием потенциала действия нерва. У млекопитающих, это от 50 до 300. Важно отметить, что амплитуда МПКП может быть разной, как и количество ацетилхолина в одной везикуле (Katz, Miledi, 1979; Van der Kloot, 2003). Отношение амплитуды потенциала концевой пластинки к разности мембранного потенциала и порогового потенциала, вызывающего потенциал действия называют фактором надежности синаптической передачи (Boonyapisit et al., 1999; Wood, Slater, 2001). В норме, при одном нервном ПД

выделяется большое количество медиатора, что вызывает ПКП, амплитуда которого значительно превышает порог возникновения потенциала действия мышечной клетки. То есть, фактор надежности нервно-мышечной передачи очень высок и даже имеет некоторый запас прочности (Wood, Slater, 2001). В отдельных же случаях, например при патологиях, медиатора может выделяться недостаточно, или при нормальном выделении АХ может наблюдаться недостаточность или патология никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (нАХР), в этом случае фактор надежности синаптической передачи будет заметно снижен, что проявляется нарушением моторной деятельности (миастенические синдромы). В качестве терапии таких заболеваний часто назначают экзогенные модуляторы работы синапса, в частности, антихолинэстеразные препараты. (Engel, 2007; Engel 2012) Кинетика квантового высвобождения, ацетилхолинэстераза, свойства холинорецепторов и их плотность, активность и плотность натриевых каналов, строение синаптических складок — все это оказывает влияние на фактор надежности синаптической передачи.

Как уже отмечалось выше, комедиатором ацетилхолина в синапсе может быть глутамат, более того, благодаря действию комедиаторов, передаваемый сигнал может модулироваться, а фактор надежности увеличиваться или уменьшаться. Роли глутаматных рецепторов в модуляции синаптической передачи посвящена следующая глава данного литературного обзора.

1.4.2. Аминокислотные медиаторы в нервно-мышечном синапсе

Долгое время господствовало мнение, что из одного нервного волокна может выделяться только один медиатор («принцип Дейла»), однако, со временем, стало накапливаться все больше данных о том, что и другие биологически активные вещества, наряду с основным медиатором, могут

выделяться нервным окончанием, более того, они могут закачиваться в те же везикулы и оказывать модулирующее влияние на передачу сигнала (Vyas, Bradford, 1987; Israel et al., 1993). И если для мозга разнообразие медиаторов было показано давно, то для более консервативного нервно-мышечного синапса изучение комедиаторов стало новым направлением исследований. Конечно, на сегодняшний день накопилось довольно много сведений о различных комедиаторах периферической нервной системы, среди которых полипептиды (Akasu et al., 1984; Forsgren et al., 1992; Matteoli et al., 1990), адреналин и норадреналин (Bukcharaeva et al., 1999; Vizi, 1991; Wessler, Anscheutz, 1988), АТФ и аденозин (Silinsky, Redman, 1996), аминокислоты – глутамат, глицин, гамма-аминомасляная кислота, и, ключевой предмет последних 15 лет исследований – газообразные мессенджеры (Brenman et al., 1996; Grozdanovic, Baumgarten, 1999; Kusner, Kaminski, 1996) и т.д. Функция одних определена довольно четко, в случае с другими – все не так прозрачно. Здесь мы подробнее рассмотрим два комедиатора ацетилхолина в синапсе – аминокислоты глутамат и глицин.

Глутамат – это основной возбуждающий медиатор человеческого мозга, он выделяется 75%-ми возбуждающих нейронов. Глутаматэргические пути осуществляют важнейшие когнитивные функции, такие как обучение и память, так как именно глутаматные сигналы лежат в основе долговременной потенциации и депрессии. Но, кроме этого, глутамат может быть и опасен – при чрезмерном его выделении, в нейронах запускаются процессы апоптоза (Меньшикова и др., 2000), повреждения нейронов, так глутамат вносит свой вклад в патогенез нейродегенеративных заболеваний, эпилепсии, судорог. Эта темная сторона глутаматного воздействия называется эксайтотоксичностью (Roberts, Davies, 1987), ее связывают с активацией систем синтеза активных форм кислорода (Coyle, Puttfarcken, 1993).

Несмотря на изученность этой аминокислоты в исследованиях центральной нервной системы, в нервно-мышечном синапсе долгое время ее

функции показано не было. В 1998 Году Fu W. At. с соавторами выявили наличие глутамата в ко-культуре мотонейронов и миоцитов *Xenopus* (Fu et al., 1998). Затем, при окрашивании синапсов различных мышц глутаматные рецепторы (в частности, NMDAR) были обнаружены в складках постсинаптической мембраны (Malomouzh et al., 2011). Как раньше отмечалось в центральной нервной системе (Bredt, Snyder, 1992; Garthwaite, Boulton, 1995; Marin et al., 1992), в периферических синапсах активация NMDAR опосредованно может оказывать влияние на синаптическую передачу через усиление продукции оксида азота (Malomouzh et al., 2003). Такое влияние NMDAR на активность NO-синтазы кажется закономерным, если учесть, что в нервно-мышечном синапсе показано наличие популяции этих рецепторов, ко-локализованных с ферментом (Grozdanovic, Gossrau, 1998). В центральной нервной системе связь NO-синтазы и NMDAR осуществляет белок PSD95.

1.4.2.1. Рецепторы глутамата

Известно несколько типов глутаматных рецепторов – три группы метаботропных (всего 8 типов) и три типа ионотропных рецептора, образующих канал, проницаемый для катионов. До 80х гг. предполагали, что глутамат воздействует только на ионотропные рецепторы, однако затем было обнаружено, что он способен активировать фосфолипазу C через реакцию с рецептором, ассоциированным с G-белком (Sladeczek, 1985). Так были открыты метаботропные рецепторы глутамата mGluR1-8.

Ионотропные глутаматные рецепторы бывают трех типов: NMDA-рецепторы, AMPA-рецепторы и каинатные рецепторы. Названия свои они получили в соответствии с селективными агонистами – N-метил-D-аспарат, α -амино-3-гидроксил-5-метил-4-изоксазол-пропионат и каинат (McLennan et al., 1981). При этом для всех типов свойственно облигатное наличие

субъединицы NR1, остальные же субъединицы могут быть представлены в различных сочетаниях.

1.4.2.2. Фармакология и механизм активации NMDA-рецепторов

Изучение NMDAR стало возможным, благодаря синтезу и изучению свойств NMDA и различных антагонистов NMDAR Джеффом Уоткинсом и его коллегами (Watkins, 1981). Эти соединения, среди которых стоит выделить (R)- α -аминоадипат ((R)- α -AA) и (R)-2-амино-5-фосфонопентаноат, блокировали нейрональный ответ, вызываемый NMDA, но не блокировали возбуждение, возникающее под воздействием каината или квискалата (Biscoe et al., 1977; Davies, Watkins, 1982), эти открытия привели к выделению NMDAR в отдельный подтип.

В течение следующих нескольких лет, эти и другие антагонисты NMDAR позволили открыть их ключевую роль в синаптической передаче, синаптической пластичности, обучении и памяти, развитии нервной системы, а также в эксайтотоксичности, параличе и многих других физиологических и патологических процессах. Также, эти исследования обозначили грандиозный потенциал использования NMDAR антагонистов для лечения нейропатологических и нейродегенеративных расстройств. Однако, за исключением использования мемантина при болезни Альцгеймера, NMDAR-таргетная терапия не получила широкого распространения. Некоторые препараты оказались малоэффективны при клинических испытаниях и/или вызывали большое количество побочных эффектов. Несмотря на это, разработка терапии антиNMDAR препаратами имеет значительный потенциал. Благодаря большому количеству сайтов связывания NMDA-рецептора, существует много различных типов потенциальных блокаторов, более того, нельзя исключать возможность тонкой селективной модуляции работы этих рецепторов и градуального изменения их активности.

NMDA-рецепторы представляют собой гетеромерные комплексы, состоящие из четырех субъединиц, которые относятся к трем различным подтипам: NR1, NR2 и NR3 (Nakanishi, 1992; Mori, Mishina, 1995; Seeburg et al., 1995). Обычно, глутамат-глицин активируемые NMDAR обязательно содержат NR1 и NR2 субъединицы, при этом на NR1 субъединице располагается сайт связывания с глицином (Kuryatov et al., 1994; Hirai et al., 1996), в то время как гомологичный домен NR2 субъединицы содержит (S)-глутамат связывающий участок (Anson et al., 1998; Laube et al., 1997). Было показано, что один NMDA-рецепторный комплекс состоит из двух NR1 и двух NR2 субъединиц (Laube et al., 1998), а NR3 субъединица может присоединяться к NR1 субъединице и формировать, таким образом, глицин-чувствительный возбуждающий рецептор, активация которого не требует присутствия L-глутамата (Chatterton et al., 2002).

Ионпроницаемый канал представляет собой дополнительный лиганд-связывающий сайт, а именно, сайт связывания блокаторов NMDAR, таких, как PCP, МК-801 и мемантин. По своей структуре канал напоминает калиевые каналы, где один гидрофобный сегмент формирует P петлю в толще мембраны и окружен трансмембранными доменами (Kuner et al., 2003; Zhogov, Tikhonov, 2004). Рядом с верхушкой P-петли, формирующей селективный фильтр канала, располагается аспарагиновый остаток, опосредующий связывание некоторых каналоблокаторов. Другие трансмембранные домены образуют структуру поры внеклеточно-ориентированной части мембраны и, соответственно, также могут влиять на связывание с каналоблокаторами.

1.4.2.3. Функции NMDA-рецепторов

Синаптическая передача возбуждения в мозге позвоночных, в основном, осуществляется за счет выделения L-глутамата из

пресинаптической терминали, который диффундирует через синаптическую щель и связывается с NMDA или AMPA рецепторами постсинаптической мембраны. Активация AMPA рецепторов происходит быстро, но коротечно и приводит к короткой деполяризации мембраны порядка нескольких миллисекунд. NMDAR не вносят большого вклада в этот базальный уровень синаптической передачи, однако они регулируют функциональную и структурную пластичность отдельных синапсов, дендритов и нейронов, обеспечивая активацию кальций-зависимых сигнальных каскадов, поскольку каналы этих рецепторов хорошо проницаемы для кальция. Несколько уникальных свойств NMDAR не позволяют им активироваться под воздействием глутамата, выделяемого в ходе только одного синаптического выброса (Biology of NMDA receptors, 2009).

Во-первых, NMDAR активируются значительно медленнее, чем AMPA или каинатные рецепторы. Глутамат, выделяемый пресинаптическим окончанием и вызывающий потенциал действия, довольно эффективно удаляется из синаптической щели при помощи глутаматных транспортеров, расположенных на пресинаптической мембране и окружающих глиальных клетках (Rothstein et al., 1994; Huang, Bergles, 2004), а в случае нервно-мышечного синапса — в складках постсинаптической мембраны (Rinholm et al., 2007). Соответственно, при низкой частоте синаптических сигналов глутамат может связаться с рецептором лишь в течение очень короткого времени. Так как NMDAR имеют сравнительно высокую аффинность к глутамату, короткие, порядка миллисекунд, выбросы нейромедиатора, тем не менее, способны частично (и медленно) активировать эти рецепторы. Однако, небольшая частичная деполяризация мембраны в ходе базальной активности не приводят к полному открытию канала рецептора из-за второго свойства NMDAR, а именно, их потенциал-зависимого магниевого блока.

При мембранном потенциале покоя, ионы магния снаружи заходят в пору NMDAR, но в отличие от ионов натрия, вместо того, чтобы поступать

внутри клетки, они прочно связываются с участком поры и блокируют дальнейшее прохождение ионов через рецептор (Nowak et al., 1984; Mayer et al., 1984). Ионы магния во внеклеточной среде содержатся в миллимолярных концентрациях, в то время как внутриклеточная концентрация магния находится в микромолярном диапазоне, что приводит к возникновению движущей силы для Mg^{2+} ионов при отрицательном значении мембранного потенциала. Для удаления магния из поры рецептора необходима деполяризация достаточной амплитуды и длительности, чтобы обеспечить ток ионов через рецептор. Однако даже в условиях покоя, для NMDAR характерны изменения проницаемости: ион Mg^{2+} колеблется в поре рецептора, то, блокируя ее, то освобождая. При мембранном потенциале покоя периоды открытого состояния рецептора кратки и незначительны, но с увеличением деполяризации мембраны, как и с уменьшением концентрации магния в омывающем растворе, они становятся все более продолжительными (Nowak et al., 1984; Ascher, Nowak, 1988). Таким образом, учитывая множество условий, необходимых для активации, NMDAR работает как «молекулярный детектор соответствия» (Seeburg et al., 1995), ведь для его функционирования необходимы и достаточная деполяризация мембраны, и наличие глутамата в синаптической щели. Такие свойства, вместе с их медленной кинетикой активации и инактивации позволяет NMDAR интегрировать и декодировать проходящий синаптический сигнал, функционируя как первичный молекулярный фильтр этого сигнала. Высокая проницаемость для кальция позволяет NMDAR преобразовывать паттерны синаптической активности в долговременные изменения силы синапса.

1.4.2.4. Кальциевый ток через NMDA-рецепторы

Долговременные эффекты на работу синапса возникающие вследствие активации NMDAR зависят от входа Ca^{2+} в постсинаптическую

клетку. Интересно, что и усиление синапса и ослабление его могут быть опосредованы входящим током кальция через NMDAR. Такое явление объясняется несколькими гипотезами: во-первых, выраженность роста концентрации кальция может быть определяющим параметром, во-вторых, временные параметры изменений внутриклеточной концентрации кальция могут определять, в какую из сторон изменится активность синапса (Lisman, 1989).

Высокая проницаемость NMDAR для кальция крайне важна, ведь ионы кальция могут действовать локально на большие комплексы передачи сигнала, ассоциированные с синаптическими NMDAR, которые состоят из кальций-зависимых ферментов, вторичных мессенджеров, протеинкиназ и фосфатаз, белков цитоскелета, ГТФ связывающих белков и их регуляторов и т. д. (Husi, Grant, 2001; Husi et al., 2000; Kennedy, 2000). Опосредованный NMDAR кальциевый вход активирует эти комплексы, запуская каскад передачи сигнала, который приводит к долговременным изменениям синаптической функции и структуры (Kennedy, 2000; Brambilla et al., 1997; Gnegy, 2000; Sheng, 2001; Sweatt, 2001; Riccio, Ginty, 2002; Deisseroth et al., 2003).

Способность NMDAR интегрировать и декодировать синаптические сигналы зависит от кинетики их активации, инактивации и десенситизации. Количество входящего кальция также определяется кинетикой, в частности скоростью инактивации рецептора. Состав субъединиц также является важным детерминирующим фактором кинетики инактивации рецептора и динамики концентраций кальция. То, сколько именно кальция зайдет в клетку через рецептор также определяется внешними физиологическими факторами, такими как pH, ионы цинка и полиамины. Однако, сосредоточимся на механизме активации NMDAR агонистами — глутаматом и глицином.

Для NMDAR характерно состояние субпроводимости, то есть между закрытым и открытым состоянием канала существует некое промежуточное. Такая субпроводимость отмечается и для нативных и для рекомбинантных рецепторов (Jahr, Stevens, 1987; Stern et al., 1992; Stern et al., 1994; Wyllie et al., 1996). Так, NR2A- и NR2B-содержащие рецепторы способны частично открываться и достигать уровня 80 % от проводимости в открытом состоянии. Более того, магниевый блок канала — явление также нестабильное. Магний, блокирующий пору канала, постоянно колеблется в ней то открывая канал, то снова запечатывая его, то есть претерпевает постоянные связывания и отсоединения от своего участка связывания в пору. При этом при изменении внеклеточных концентраций магния, а также при деполяризации мембраны, периоды открытого состояния канала удлиняются и учащаются, пока эти два фактора не станут настолько значительными, чтобы устранить магниевый блок полностью (Ascher, Nowak, 1988). Кроме того, чем больше и длительнее деполяризация мембраны, тем больше проводимость канала NMDAR. Так, короткие деполяризующие импульсы почти не влияют на входящий ток и незначительно изменяют ток ионов (Ichinose et al., 2003), что еще раз говорит о медленной кинетики активации NMDAR.

Кроме того, сам кальций может по механизму обратной связи контролировать деятельность NMDAR, так при увеличении концентрации внеклеточного кальция, входящий ток катионов уменьшается при отрицательных значениях мембранного потенциала, а при положительных снижается выход ионов через канал (Ascher, Nowak, 1988). Для нервно-мышечных синапсов была показана потенциация спонтанной секреции ацетилхолина при применении глутамата, причем увеличение амплитуды, длительности и частоты синаптических ответов происходило за счет активации кальций-зависимого механизма, но проявлялось только на эмбриональных стадиях развития у *Xenopus* (Liou et al., 1996; Fu et al., 1995).

В связи с этим, существовала гипотеза, что, несмотря на наличие субъединиц рецепторов глутамата в нервно-мышечных синапсах, функциональны они только на начальных этапах развития организма, и по мере созревания синапса функция их угасает.

Сами агонисты — глутамат и глицин, также могут влиять на эффекты активации NMDAR по-разному. Так, низкие концентрации аминокислот приводят к снижению активности NOS, ассоциированной с NMDAR, в то время как увеличение количества глутамата активирует этот фермент (Rameau et al., 2004). Подробнее эти и другие особенности функционирования NOS и взаимодействия комплекса NOS/NMDAR мы рассмотрим в следующих главах.

1.4.3. Оксид азота: физиологическая роль оксида азота, функция, синтез, мишени, распространение в различных органах и тканях

Оксид азота представляет собой свободный радикал, способный реагировать с другими свободными радикалами, такими как молекулярный кислород (O_2). Изначально, оксид азота был обнаружен в эндотелиальной ткани сосуда, где он играет роль вазодилататора, однако, как оказалось, эта молекула продуцируется не только эндотелием, а также обнаруживается во многих других типах клеток, включая скелетные мышечные волокна. (Stamler, Meissner, 2001)

Дальнейшие исследования показали, что NO — ключевая сигнальная молекула, регулирующая центральные биологические процессы практически во всех тканях, клетках и органах. NO участвует в регуляции кровяного давления, оказывая влияние на гладкую мускулатуру сосудов. Недостаточная эндотелиальная функция, описанная для сердечно-сосудистых заболеваний, таких как коронарная болезнь сердца (Anderson et al., 1995) связана со снижением биодоступности NO и увеличением продукции супероксидных

анионов (Oelze et al., 2000). В иммунной системе NO принимает участие в контроле над инфекционными заболеваниями (Nathan, Shiloh, 2000), опухолями (Pervin, 2001) и аутоиммунными процессами (Kolb, Kolb-Bachofen, 1998). В сердечно-сосудистой системе NO уменьшает агрегацию тромбоцитов и их адгезию и приводит к разлипанию уже агрегировавшихся тромбоцитов (Stamler et al., 1989; Radomski et al., 1987). В воспалительном процессе, NO высвобождается из эндотелия и оказывает противовоспалительное действие, ингибируя адгезию лейкоцитов и эндотелиальных клеток. В скелетной мускулатуре NO вовлечен в регуляцию сократимости и также предполагается, что оксид азота опосредует активацию клеток-сателлитов, таким образом, способствуя восстановлению мышцы (Anderson, 2000).

1.4.3.1. Синтаза оксида азота и ее регуляция

NOS – это фермент, который входит в семейство гемопротеинов, подобных цитохрому P-450 и содержит два домена, один из которых обладает оксигеназной, а другой — редуктазной активностью (Bredt et al., 1991). Функционально активная NO-синтаза состоит из двух одинаковых субъединиц массой 130-150 кДа, каждая из которых связана с кальмодулином. Субъединицы содержат по 4 простетических группы и участок связывания с кальмодулином (Marletta, 1994; Nathan, Xie, 1994). Благодаря димерной структуре, NO-синтаза объединяет в себе активность двух разных ферментов: оксидазную — как у гемсодержащего цитохрома P-450 и редуктазную - подобную флавинсодержащей редуктазе данного цитохрома. NOS представлена тремя различными изоформами, а именно, двумя конститутивными: нейрональной (nNOS), эндотелиальной (eNOS), и одной индуцибельной (iNOS); они различаются по локализации, регуляции и распространению в организме. Для конститутивных изоформ NOS (nNOS,

eNOS) характерно наличие NADPH-активности (Loech et al., 1993). NO-синтаза метаболизирует L-аргинин с образованием NO и L-цитруллина, причем этот процесс может зависеть от активности стимуляции нервной или мышечной ткани (Bredt, 1995).

В области нервно-мышечного синапса NOS экспрессируется и в нервных, и в мышечных клетках и в Шванновских клетках, причем при денервации, количество постсинаптической nNOS сокращается, что говорит о наличии, в том числе, нервной регуляции экспрессии фермента (Ribera et al., 1998). В мышечных клетках NO-синтаза – фермент, продуцирующий оксид азота, представлена тремя изоформами – nNOS (нейрональная), iNOS (индуцибельная) и eNOS (эндотелиальная), и обеспечивает, в частности, адаптацию к физическим нагрузкам продуцируя оксид азота (Stamler, Meissner, 2001). Известно, что nNOS, сконцентрированная в синаптической области, взаимодействует с белками постсинаптического уплотнения (postsynaptic density – PSD) и белком скелетных мышц α 1-синтрофином (Kusner, Kaminski, 1996; Brenman et al., 1996). Кроме того, было показано, что применение донора NO нитропруссида в нервно-мышечных препаратах лягушки, уменьшает потенциалы концевой пластинки (Lindgren, Laird, 1994). Известно, что скелетная мускулатура производит оксид азота даже в состоянии покоя (Kobzik et al., 1994). Однако синтез его увеличивается на 200% в ответ на повторяющиеся мышечные сокращения (Balon, Nadler, 1994). Вместе с увеличением уровня NO в ткани, наблюдается и возрастание концентрации активных форм кислорода и азота под действием сократительной активности (Palomero et al., 2008; Powers, Jackson, 2008; Pye et al., 2007).

Многие функции оксида азота реализуются в результате активации молекулами NO растворимой гуанилатциклазы, что приводит к повышению внутриклеточного уровня цГМФ (Knowles et al., 1989). цГМФ может, помимо прочего, принимать участие в модулировании синаптической передачи,

например, посредством регуляции свойств ионных каналов (Light et al., 1990; Каурр, 1991) или изменения экспрессии ацетилхолинэстеразы в нервно-мышечном соединении (Rubin et al., 1980). За последнее время было выявлено множество новых физиологических функций NO. Так, в головном мозге NO действует как нейротрансмиттер и модулятор синаптической передачи (Garthwaite, 1991; Crossin, 1991; Bredt, Snyder, 1992), участвует в процессах, влияющих на дифференцировку, образование связей и пластичность нервных клеток, например, на созревание двигательных нейронов (Kalb, Agostini, 1993), на установление связи между обонятельными нейронами (Roskams et al., 1994) и дифференцировку клеток нейробластомы (Reunova, Enikolopov, 1995). В периферической нервной системе NO принимает участие в самых разнообразных процессах, что было продемонстрировано в вегетативной нервной системе (Sanders, Ward, 1992). Метаболические пути, посредством которых осуществляется функция оксида азота, рассмотрим подробнее в следующей главе.

1.4.3.2. Сигналинг оксида азота: NO/цГМФ-сигнальный путь

NO как свободный газ может взаимодействовать с веществами по-разному: он может либо окисляться до нитритов и нитратов (Hendgen-Cotta et al., 2008), либо реагировать с кислородом и супероксидными анионами с образованием низкомолекулярных производных (Stamler et al., 1992), например, пероксинитрита — наиболее активного свободного радикала, вызывающего окислительные повреждения (Freeman, 1994).

В эндотелии NO постоянно продуцируется для расширения сосудов и уменьшения агрегации тромбоцитов в случае усиления кровообращения (Mellion et al., 1981). NO/цГМФ- сигнальный путь играет важную роль в сердечно-сосудистой и нервной системе, где он оказывает влияние на расслабление гладкой мускулатуры (Lincoln, 1989; Lincoln et al., 2001;

Hofmann et al., 2000) и модулирует синаптическую передачу (Garthwaite et al., 1988; Zhuo; Hawkins, 1995).

Важно отметить, что продукция цГМФ это только первый шаг в сигнальном пути NO. цГМФ способен активировать протеинкиназу G (PKG) которая, в свою очередь, фосфорилирует сериновые или треониновые остатки других белков, таким образом, изменяя их активность (Munzel et al., 2003). Другими эффекторами могут быть цГМФ-зависимые фосфодиэстеразы и катионные каналы, активируемые циклическими нуклеотидами, которые участвуют в сенсорных процессах, а также циклические цГМФ-зависимые протеинкиназы (Lincoln et al, 2001). Ключевой белок, моделируемый таким воздействием, это RhoA киназа. Этот белок вызывает фосфорилирование миозина активацией киназы и ингибированием фосфатазы легких цепей миозина. цГМФ-активируемая протеинкиназа усиливает инактивацию RhoA киназы, фосфорилируя ее. Этот эффект ингибирует сокращение гладкой мускулатуры, увеличивая таким образом поток крови, что, в свою очередь, приводит к снижению кровяного давления (Bruckdorfer, 2005). цГМФ также активирует протеинкиназу G1 (PK G1), которая, впоследствии, фосфорилирует и модулирует, тем самым, работу самых разных сигнальных мишеней. PK G1 снижает уровень внутриклеточного кальция в гладкомышечных клетках, что приводит к гиперполяризации мембраны и ингибированию фосфорилирования легких цепей миозина, все это приводит к вазодилатации (Thoonen et al., 2013). цГМФ и опосредованный им сигнальный путь имеет место и в скелетных мышцах, так, в последних исследованиях было показано участие NO и цГМФ в пролиферации миогенных предшественников, известных также как клетки-сателлиты (Buono et al., 2012). Эти данные поддерживают идею о том, что NO и цГМФ могут регулировать ключевые функции скелетной мускулатуры, не ограничиваясь лишь незначительной функциональной регуляцией. Действие оксида азота на различные белки в синаптической области, в основном,

выражается реакцией *S*-нитрозилирования. Мишеням данной реакции и ее особенностям посвящена следующая глава.

1.4.3.3. *S*-нитрозилирование как реакция, опосредующая действие оксида азота

S-нитрозилирование и денитрозилирование цистеиновых остатков белка это важные NO-зависимые посттрансляционные модификации, которые, в купе с фосфорилированием и дефосфорилированием, могут глобально модулировать активность и функцию белка как в физиологических, так и в патологических условиях (Hess et al., 2005). Эффекты NO опосредованы либо реакцией с тиоловыми группами, либо взаимодействием с гемовыми и негемовыми металлами белков, или и тем, и другим (Stamler, 1994; Stamler et al., 1992; Stamler et al., 1997). Остатки цистеина могут быть вовлечены в регулирование активности белка и сигналинг через реакции с участием их тиоловых групп, в том числе окислительно-восстановительные реакции, реакции хелатирования переходных металлов (главным образом Zn^{2+} , Mn^{2+} и Cu^{2+}) или *S*-нитрозилирования (Lipton et al., 2002). Участок для *S*-нитрозилирования был идентифицирован в ионных каналах, рецепторах, ферментах, факторах транскрипции, а также в G-белках (Stamler et al., 1997). *S*-нитрозилирование, с одной стороны, опосредует сигнальные процессы в клетке, а с другой, может лежать в основе повреждения белков. Опасные уровни нитрозилирования называют нитрозативным стрессом (Hausladen, Stamler, 1999; Stamler, Hausladen, 1998); он аналогичен окислительному стрессу, который вызывается повышенным уровнем активных форм кислорода и может являться одной из причин мышечной усталости и повреждения клеток (Barclay, Hansel, 1991; Reid, 1996). Реакции *S*-нитрозилирования оксидом азота может подвергаться множество белков. К примеру, глутаматный

рецептор GluR6 нитрозилируется оксидом азота на ранних стадиях ишемии мозга и индуцирует апоптоз нейронов (Yu et al., 2008), как и некоторые проапоптотические киназы, которые активируются NO, образуемым нейрональной NO-синтазой по тому же принципу (Pei et al., 2008).

Среди возможных мишеней для реакции *S*-нитрозилирования в скелетных мышцах, можно выделить рианодиновые рецепторы, гуанилатциклазу, АХР, NMDAR, собственно NOS и многие другие. Stoyanovski с соавторами (1997) показали, что *S*-нитрозилирование рианодинового рецептора увеличивает время открытого состояния канала, ассоциированного с этим рецептором, что приводит к выходу кальция из саркоплазматического ретикулума, причем такая активация снимается посредством денитрозилирования.

Ранее Murad с соавторами (Katsuki et al., 1977) сообщили о низком уровне гуанилатциклазной активности в скелетных мышцах. Однако, впоследствии было показано наличие цГМФ сигнального пути в скелетной мышце, а также колокализация nNOS и цГМФ в непосредственной близости от сарколеммы (Kobzik et al., 1994). Доказательство функциональной связи между уровнем цГМФ и мышечной активностью было предоставлено Lau с соавторами (1998), которые обнаружили, что в мышце конечности содержание цГМФ при электрической стимуляции увеличивается на 250%, и, что такие изменения не происходят у мутантных мышей с дефицитом nNOS. Помимо влияния на сократимость, цГМФ может способствовать поглощению и/или утилизации глюкозы в мышце. Важно отметить, однако, что эффекты цГМФ, как правило, в скелетных мышцах не ярко выражены, а гуанилатциклазная активность относительно низка по сравнению с другими тканями (Katsuki et al., 1997). Но при этом, особенный интерес вызывает тот факт, что nNOS и цГМФ-зависимая протеинкиназа – основной эффектор NO, сконцентрированы в области нервно-мышечного синапса (Chao et al., 1997), где последняя может, к примеру, фосфорилировать субъединицы nAHP

(Huganir, Miles, 1989; Wang et al., 1995). Кроме того, цГМФ-зависимая киназа способна фосфорилировать дистрофин (Luise et al., 1993). В эффекты, опосредуемые оксидом азота, могут вносить вклад такие белки, как цитохром-с-оксидазы (Borutaite, Brown, 1996; Kobzik et al., 1995), креатинкиназы (Wolosker et al., 1996) и Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулула. Существует также косвенные доказательства NO-ингибирования Ca^{2+} -АТФазы. У кролика в быстрых мышцах, устойчивая сократительная активность приводит к значительной (на 40-50%) инактивации Ca^{2+} -АТФазы (Klebl et al., 1998). Применение NO доноров также может ингибировать активность актомиозина (актин-миозиновых мостиков) и тем самым уменьшать силу, развиваемую скелетными мышцами (Perkins et al., 1997). Тем не менее, физиологические концентрации NO такого эффекта не оказывают.

Что же касается ауторегуляции NO-синтазы оксидом азота, то ранее предполагалось, что активность всех трех изоформ этого фермента может подавляться через формирование комплекса между NO и гемовой частью NO-синтазы (Hurshman, Marletta, 1995; Abu-Soud et al., 1996; Sheehy et al., 1998; Black et al., 1999). Однако последующие исследования показали, что активность эндотелиальной NO-синтазы может снижаться посредством NO, но с помощью другого механизма, а именно посредством *S*-нитрозилирования цистеиновых групп, которое запускает нарушение структуры димера (Ravi et al., 2004; Erwin et al., 2005). Также, NO может снижать чрезмерную активацию NMDAR *S*-нитрозилируя их агонисты и делая, таким образом, их недоступными для связывания с рецептором (Mustafa et al., 2007). Вообще, реакция *S*-нитрозилирования во многих случаях может быть аналогична фосфорилированию. NO обычно реагирует с цистеиновыми остатками аминокислот, формируя нитрозо-протеины (Qu et al., 2014).

Показано, что активность NO-синтазы также может изменяться посредством ее *S*-нитрозилирования или денитрозилирования, индуцируемого входящим током кальция через NMDAR. Нитрозилирование экзогенными донорами приводит к снижению активности NOS. При этом процессы дефосфорилирования NO-синтазы, приводящие к ее активации, могут запускаться денитрозилированием. В целом, это доказывает, что реакции *S*-нитрозилирования/денитрозилирования играют важную роль в процессах регуляции активности этого фермента. (Qu et al., 2012).

1.4.4. Организация комплекса NMDA-рецептор/NO-синтаза и его функциональная роль в синапсах

На постсинаптической мембране возбуждающих синапсов в ЦНС расположен специфический набор молекул, включающий глутаматные рецепторы, которые собраны в структуру, известную как постсинаптическое уплотнение (postsynaptic density – PSD). Синаптическая роль глутаматных рецепторов зависит от взаимодействий между *C*-терминальными хвостами субъединиц рецептора и специфическими PDZ-домен-содержащими каркасными белками в PSD-области. Эти белки образуют специализированный комплекс вокруг каждого класса глутаматных рецепторов и принимают участие в передаче сигнала, заякоривании и перемещении рецепторов (Sheng, Pak, 2000). Среди подтипов глутаматных рецепторов NMDAR сравнительно стабильно встроен в PSD, в то время как AMPA рецепторы довольно подвижны. Учитывая содержание рецепторов и большое количество рецептор-связанных белков, PSD можно рассматривать как протеиновую «органеллу», специализирующуюся на постсинаптической передаче сигнала (см. обзор Sheng, 2001).

Взаимодействие между NR2 субъединицами NMDAR и PSD-95 важно для специфического расположения этих рецепторов на постсинапсе

(Steigerwald et al., 2000; Mori et al., 1998), а также для связи NMDAR и цитоплазматических сигнальных путей (Migaud et al., 1998; Sprengel et al., 1998). Например, за счет присоединения к nNOS, PSD-95 облегчает ее активацию NMDA-опосредованным кальциевым входом (Brenman et al., 1996; Sattler et al., 1999). Также, с помощью PSD-95 осуществляется взаимодействие между молекулами NMDAR и GKAP (белок, ассоциированный с гуанилат-киназой). GKAP же через белки-адаптеры Shank и Homer взаимодействуют с инозитолтрифосфат-зависимыми кальциевыми каналами эндоплазматического ретикулума, таким образом, создавая возможность для дополнительной регуляции кальция в цитоплазме (Husi et al., 2000). Кроме указанных протеинов, в структуру NMDA-рецепторного комплекса входят спектрин, адаптеры Yotiao и Muo, CaMKII, PKA, Src, PP1, NOS и белок SynGAP, а также фосфатазы PP2A и PP2B, PKC, H-Ras, Rap2, Rac1, цитоплазматическая тирозинкиназа PYK2, другие протеинкиназы, белок теплового шока Hsp-70 (Sheng, Lee, 2000; Husi et al., 2000).

Стимуляция NMDAR глутаматом и глицином индуцирует входящий кальциевый ток через канал, ассоциированный с рецептором, опосредуя тем самым Ca^{2+} -зависимые функции NMDAR (Hardingham, Bading, 2003; Cummings et al., 1996; Connor et al., 1988; Franks, Sejnowski, 2002). Угнетение экспрессии PSD 95 блокирует NMDAR- и Ca^{2+} -зависимую активацию nNOS, и, в свою очередь, нарушение связи между NMDAR и PSD 95 подавляет сигналинг через NMDAR (Sattler et al., 1999; Aarts et al., 2002).

Увеличение концентрации внутриклеточного кальция, опосредованное активацией NMDAR стимулирует nNOS, обеспечивая связывание кальция с кальмодулином NOS (Ca^{2+} -CaM). К тому же, было показано, что активность nNOS может регулироваться фосфорилированием этого фермента (Bredt et al., 1992; Nakane et al., 1991; Hayashi et al., 1999). В частности, протеинкиназа CaMKII фосфорилирует nNOS по остатку Ser847, что уменьшает активность nNOS, ингибируя связывание Ca^{2+} -CaM (Hayashi

et al., 1999; Komeima et al., 2000). Однако, NMDAR-индуцированный механизм регуляции активности nNOS посредством фосфорилирования специфических остатков остается до конца невыясненным. Было показано, что после эксайтотоксического действия агонистов NMDAR в культуре корковых нейронов, nNOS подвергается полному дефосфорилированию фосфатазами кальциневрина и PP1 / PP2A (Rameau et al., 2003).

Было показано, что активация NMDAR может приводить как к увеличению, так и к уменьшению степени фосфорилирования nNOS по Ser847. Стимуляция NMDAR низкой концентрацией глутамата приводит к фосфорилированию nNOS по Ser847. И, напротив, высокие патологические концентрации глутамата стимулируют дефосфорилирование Ser847-PO₄. Первый из этих эффектов имеет сходства с долговременной потеннциацией нейронов гиппокампа и способствует активации CaMKII и снижению активности nNOS (Brown et al., 2000; Kang-Park et al., 2003), в то время как второй может относиться к эксайтотоксичности, вызванной инсультом или травмой спинного мозга, которые, как было показано, приводят к активации фосфатаз (Aronowski et al., 2000; Asai et al., 1999; Hasegawa et al., 2003; Springer et al., 2000) и сопровождаются усилением синтеза NO. Физиологический смысл такой двунаправленной регуляции активности nNOS может заключаться в том, что даже после ответа на действие глутамата в нормальных, не патологических условиях, при эксайтотоксичности и увеличении концентрации агониста NMDAR, nNOS изменит свою активность, так как отвечает nNOS на эти два процесса двумя различными химическими реакциями: в первом случае — фосфорилированием, во втором — дефосфорилированием.

Протеинкиназа А, протеинкиназа С и CaMKII участвуют в фосфорилировании nNOS (Bredt et al., 1992; Nakane et al., 1991; Hayashi et al., 1999). NMDAR увеличивают активность CaMKII (Bayer et al., 2001), которая, в свою очередь, фосфорилирует nNOS по Ser847, который располагается в

области ингибиторной петли, примыкающей к аминокислотной последовательности, связывающей Ca^{2+} -CaM сегмент nNOS. Ингибиторная петля связывает С-терминальный редуктазный домен nNOS с N-терминальным оксигеназным доменом. Связывание Ca^{2+} -CaM с ингибиторной петлей изменяет, по-видимому, расположение последней и увеличивает поток электронов от редуктазного домена к оксигеназному, увеличивая, тем самым, скорость ферментативного катализа (Rameau et al., 2004). Фосфорилирование ингибиторной петли CaMKII может тормозить связывание Ca^{2+} -CaM (Craig et al., 2002; Lane, Gross, 2000) и, таким образом, снижать активность фермента. Поскольку и активатор — Ca^{2+} -CaM, и ингибитор — CaMKII киназа, кальций-зависимы, активность nNOS, по-видимому, находится под многокомпонентным кальциевым контролем. Наличие таких Ca^{2+} -зависимых регуляторных механизмов предполагает, что кальциевый ток через NMDAR может регулировать nNOS, находящуюся в непосредственной близости. В нервно-мышечном соединении в синаптической области как раз так показана колокализация фермента NO-синтазы и NMDAR (Grozdanovic, Gossrau, 1998; Lück et al., 2000).

Поскольку активация NO-синтазы зависит от Ca^{2+} и кальмодулина (Bredt, Snyder, 1990), сигнальные пути, повышающие внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} , могут привести к усилению продукции NO. Активация рецепторов, ассоциированных с G-белком, которая стимулирует гидролиз фосфоинозотида, приводит, как было показано, к двухфазному росту внутриклеточного кальция (Meldolesi et al., 1991; Berridge, 1993). Стимуляция таких рецепторов приводит к активации фосфолипазы C, которая расщепляет фосфатидилинозитол 4,5-бифосфат до диацилглицерола и инозитол-1,4,5-трифосфата. Диацилглицерол активирует протеинкиназу C, тогда как инозитол-1,4,5-трифосфат высвобождает кальций из внутриклеточных депо, повышая тем самым внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} . Такой ответ протекает довольно быстро и приводит к быстрому нарастанию

внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . За этим следует менее выраженное, но постоянное увеличение уровня внутриклеточного кальция, которое зависит от входа кальция через кальциевые каналы плазматической мембраны из экстраклеточного пространства (Meldolesi et al., 1991; Berridge, 1993). Сравнительное значение двух фаз кальциевой сигнализации в процессе активации nNOS не было достаточно изучено. Существуют работы, раскрывающие связь мускариновых рецепторов и активации NOS (Surichamorn et al., 1990; Wang et al., 1996). Производство NO в ответ на возбуждение мускариновых M1 рецепторов идет в две стадии: первая стадия включает мобилизацию внутриклеточного кальция и усиление активности NOS этим кальцием, вторая – вход кальция из внеклеточного пространства и, соответственно, активация им. Ранее предполагалось, что активация NOS происходит только за счет внутриклеточного пула кальция (Hu, El-Fakahany, 1996). Основным клеточным механизмом, опосредующим взаимосвязь мускариновых рецепторов и мобилизации кальция, является формирование инозитолтрифосфата (Caulfield, 1993).

Существуют данные, свидетельствующие о том, что отложенное во времени увеличение уровня внутриклеточного кальция и цГМФ опосредовано входом экстраклеточного кальция, который может происходить благодаря активации рецептор-ассоциированных кальциевых каналов (Felder et al., 1993) или активации кальциевых каналов в ответ на истощение запасов внутриклеточного кальция (Putney, 1993). Получается, что максимум аккумуляции побочного продукта синтеза NO — L-цитруллина, которая, в сущности, и отражает активацию NOS, наступает через 60 минут после активации M1 рецепторов. Такой эффект стимулирования mAХР может быть более выражен в случае терапии антиАХЭ препаратами или стабильными мускариновыми агонистами при болезни Альцгеймера (Bumaster et al., 1997).

Получается, что при стимулировании нерва и выделении АХ, идет активация mAХР и, за счет этого, более значительное увеличение уровня внутриклеточного кальция, чем при активации только NMDAR в состоянии покоя. Таким образом, совместное действие АХ и глутамата может обеспечивать наиболее выраженный эффект активации NOS и через NMDAR-опосредованное усиление входа кальция, и через увеличение его концентрации посредством активации mAХР.

Понимание клеточных механизмов пролонгированной активации nNOS клинически важно, особенно учитывая, что NO принимает участие в механизмах памяти и обучения, синаптической пластичности и модуляции синаптической передачи (Aoki et al., 1995; Kuo, Schroeder, 1995; Udayabanu et al., 2008; Wotta, El-Fakahany, 1997).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на изолированных нервно-мышечных препаратах (*m. EDL* — *extensor digitorum longus*) крыс породы Wistar обоих полов весом 250-300 гр. Изолированную мышцу с подходящим к ней нервом помещали в экспериментальную ванночку, через которую протекал аэрированный карбагеном (O₂ 95%, CO₂ 5%) раствор Рингера-Кребса для теплокровных следующего состава (ммоль/л): NaCl – 120.0, KCl – 5.0, CaCl₂ – 2.0, MgCl₂ – 1.0, NaHCO₃ – 11.0, NaH₂PO₄ – 1.0, глюкоза – 11.0, pH раствора поддерживали на уровне 7.2-7.4 при температуре 20±2 С° (скорость перфузии 2-3 мл/мин). Все эксперименты проводились в соответствии с директивой European Communities Council Directive от 24 ноября 1986 года (86/609/ЕЕС).

Определение активности ацетилхолинэстеразы *in vitro*

Для определения активности АХЭ в гомогенатах мышц свежеприготовленный клеточный экстракт, проявляющий эстеразную активность, получали из мышц в гомогенизаторе Поттера в растворе, содержащем 0,05 М трис-НСl, 1% Tween 20, 1 М NaCl, 2 ммоль/л EDTA; pH 7.0, экстрагирующем как глобулярные, так и ассиметричные формы ацетилхолинэстеразы (Von et al., 1979). Также добавляли 50 мкмоль/л тетраизопропил-пирофосфорида (*iso*-ОМРА) (Koelle et al., 1974) для ингибирования бутирилхолинэстеразы. Для экстракции предварительно объединяли мышцы, полученные от 3-4 животных одного возраста и условий содержания. Экстрагировали 5 минут при +4°С, после чего центрифугировали при 13,5 тыс.об./мин и отбирали супернатант. Концентрацию белка в

супернатанте определяли по методу Брэдфорда (Bradford, 1976). Параметры эстеразной реакции определяли по методу Элмана (Ellman et al., 1961), начальную скорость реакции определяли, используя спектрофотометр Perkin-Elmer λ 25 (USA).

Gergel' и Cederbaum (1997) показали, что NO может препятствовать реакции Элмана, вызывая обесцвечивание раствора (в отсутствии АХЭ). Чтобы оценить вклад этого высветления в анализ активности АХЭ методом Элмана, использовался следующий протокол. Гомогенаты мышц инкубировались с субстратом (ацетилтиохолином) в течении 5, 10, 15 и 20 минут, после чего добавлялся ингибитор АХЭ неостигмин (10 мкмоль/л), чтобы остановить гидролиз субстрата ацетилхолинэстеразой. В качестве контроля, 10 мкмоль/л неостигмина добавляли в начале реакции. Во всех экспериментах затем добавлялось 0,5 ммоль/л 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота) и измерялось поглощение при длине волны 412 нм. Активность АХЭ подсчитывалась как изменение оптической плотности во времени. Донор NO SNAP добавлялся в концентрации 100-500 мкмоль/л, при длине волны 412 нм он снижал поглощение (из-за выцветания), однако данный эффект не превышал 3-5 %. Эти результаты показывают, что степень выцветания, вызываемого оксидом азота, находится в пределах погрешности измерений. Поскольку вклад обесцвечивания оксидом азота оказался незначительным, в последующих экспериментах им можно пренебречь.

Регистрация миниатюрных токов концевой пластинки (МТКП)

Регистрация миниатюрных токов концевой пластинки производилась с помощью стандартной микроэлектродной техники с использованием микроэлектродов из стекла Pirex, заполненных раствором KCl (3 моль/л) с сопротивлением 5-10 МОм. Мембранный потенциал поддерживался на уровне -60 мВ (если не указано иное). В каждом препарате регистрировали от 150 до

200 МТКП в каждом мышечном волокне. Затем сигналы после предварительного усиления записывали на жесткий диск компьютера и анализировали с помощью оригинальной компьютерной программы. Анализировали следующие параметры МТКП – амплитуду, время роста от 20 до 80% амплитуды, постоянную времени спада (τ). За постоянную времени спада принимался интервал времени между 0,8 и 0,367 амплитуды МТКП. Зарегистрированные амплитудно-временные параметры МТКП каждой концевой пластинки усреднялись, каждая группа экспериментальных данных состояла из усредненных значений от 20-30 концевых пластинок.

Для предотвращения спонтанных мышечных сокращений, вызванных ингибированием АХЭ параоксоном (10 мкмоль/л), в омывающий мышцу раствор добавляли блокатор Na^+ -каналов тетродотоксин (0,1 мкмоль/л).

Регистрация миниатюрных токов концевой пластинки в межстимульные интервалы при стимуляции нерва

В экспериментах со стимуляцией нерва препарат инкубировали в течение 20 минут с раствором блокатора Na^+ -каналов μ -конотоксина GIIIB в концентрации 2 мкмоль/л для предотвращения сокращений мышечных волокон. Стимуляция нерва проводилась прямоугольными электрическими импульсами длительностью 0.1 мс сверхпороговой величины с частотой 10 Гц посредством платиновых электродов.

Во всех сериях экспериментов данные представлены как средние значения \pm SEM, при этом n – обозначает количество исследуемых концевых пластинок (если не указано иного). Достоверность различий регистрируемых значений до и после аппликации действующего вещества проверялись по t критерию Стьюдента на уровне значимости $p < 0.05$. На рисунках показаны

средние значения регистрируемых параметров и их средние квадратичные отклонения.

Используемые реактивы

Параоксон (1×10^{-6} моль/л), тетродотоксин (1×10^{-7} моль/л), глутамат (100×10^{-6} моль/л), глицин (700×10^{-6} моль/л), DL-2-амино-5-фосфонопентаноиковая кислота (AP-5) (500×10^{-6} моль/л), 5,7-дихлорокинуреновая кислота (100×10^{-6} моль/л), NG-нитро-L-аргинин метил эстер (L-NAME) (100×10^{-6} моль/л), S-нитрозо-N-ацетил-DL-пеницилламин (SNAP) (различные концентрации), циклогексимид (350×10^{-6} моль/л), оокадаиковая кислота (1×10^{-6} моль/л), тетра-изопропил-пирофосфорамид (iso-OMPA) (50×10^{-6} моль/л), ацетилхолин, ацетилтиохолин, гемоглобин (30×10^{-6} моль/л), эритроцитарная ацетилхолинэстераза человека, 5,5'-дитиобис (2-нитробензойная кислота) (реактивы для реакции Элмана). Реактивы были получены от Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. μ -конотоксин (2×10^{-6} моль/л) был приобретен в Alamone Labs (Израиль).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Влияние донора NO на активность АХЭ*

Для определения того, способны ли молекулы NO ингибировать АХЭ в нервно-мышечном синапсе, были проведены биохимические эксперименты по оценке активности очищенной АХЭ эритроцитов человека в присутствии различных концентраций донора NO – SNAP. Было установлено, что в присутствии SNAP действительно имеет место снижение активности АХЭ вплоть до полного ингибирования фермента (рис. 2).

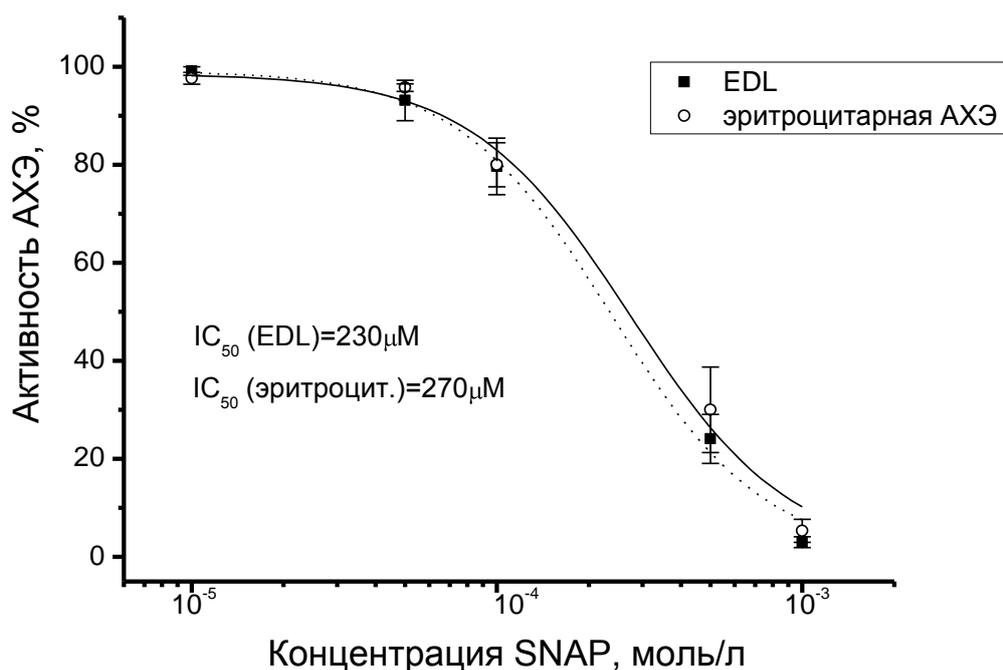


Рисунок 2 - Ингибирование активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) гомогенатов мышцы *m. EDL* (n=17) и эритроцитов человека (n=10) в присутствии донора молекул NO SNAP; IC₅₀ - концентрация ингибитора, при которой наблюдается снижение активности фермента на 50% от контрольного значения

*Эксперименты проводились совместно с м.н.с. ИОФХ им. А. Е. Арбузова, к.б.н. Харламовой А. Д.

Так, если в концентрации 10 и 50 мкмоль/л SNAP активность АХЭ почти не снижается, то при концентрации донора в 100 мкмоль/л активность снижается на 16,5 % по сравнению с контролем (рис. 2).

Дальнейшее увеличение концентрации приводит к более выраженному угнетающему действию донора, и полное ингибирование фермента наступает при использовании SNAP в концентрации 1 ммоль/л. Таким образом, IC_{50} (концентрация ингибитора, при которой наблюдается снижение активности фермента на 50% от контрольного) составила 270 мкмоль/л. SNAP – неэквивалентный донор оксида азота. Используя NO-селективный электрод, Hermann, Erxleben (2001) показали, что 1 ммоль/л SNAP выделяет приблизительно 8 мкмоль/л NO. Таким образом, IC_{50} , равная 230 мкмоль/л соответствует 1,8 мкмоль/л NO в растворе.

Далее нами была проведена серия экспериментов по тому же протоколу, но с АХЭ гомогенатов мышцы крысы *m. extensor digitorum longus (m. EDL)*. Показали, что активность АХЭ гомогенатов мышцы также ингибируется при использовании SNAP, причем в том же диапазоне концентраций и с аналогичной степенью подавления активности (рис. 2). В концентрации 10 и 50 мкмоль/л донора активность мышечной АХЭ остается без изменений, а при концентрации 100 мкмоль/л активность падает на 20% относительно контрольных значений. При этом IC_{50} составила 230 мкмоль/л.

Таким образом, можно утверждать, что молекулы NO действительно способны ингибировать фермент АХЭ мышцы *in vitro*.

3.2. Влияние донора NO на амплитудно-временные параметры МТКП в нервно-мышечном синапсе

Широко известно, что ингибирование АХЭ в холинергическом синапсе приводит к увеличению амплитуды и длительности постсинаптических сигналов (Katz, Miledi, 1973). При этом показано, что с увеличением концентрации ингибитора амплитуда сигналов растет линейно, а длительность – экспоненциально (Anglister et al., 1994). В связи с этим, встает вопрос: если интактная АХЭ концевой пластинки ингибируется NO, то будут ли наблюдаться в нервно-мышечном соединении изменения, характерные для действия ингибиторов АХЭ? Ранее было показано (Mukhtarov et al., 2000), что в диафрагмальной мышце крысы донор оксида азота SNAP (100 мкмоль/л), снижает неквантовую секрецию ацетилхолина, не оказывая влияния на миниатюрные потенциалы концевой пластинки. Мы предположили, что ингибирование синаптической АХЭ требует более высоких концентраций NO, чем это необходимо для влияния на неквантовую секрецию ацетилхолина. В связи с этим, в данной работе мы последовательно увеличивали концентрацию донора NO SNAP вплоть до 2 ммоль/л.

Основываясь на характере ингибирования АХЭ оксидом азота *in vitro*, для электрофизиологических экспериментов мы использовали концентрации SNAP от 20 мкмоль/л до 2 ммоль/л.

Средние значения амплитуды и постоянной времени спада МТКП, зарегистрированных в нервно-мышечных синапсах *m. EDL* с помощью метода двухэлектродной фиксации потенциала (потенциал при этом поддерживался на уровне -60 мВ) в контроле составили 2.77 ± 0.16 нА и 1.03 ± 0.06 мс, соответственно ($n = 41$). В присутствии SNAP в концентрации 20 мкмоль/л амплитуда МТКП достоверно не изменялась ($n=30$), тогда как при десятикратном повышении концентрации донора NO, а именно, при

концентрации SNAPa в 200 мкмоль/л, регистрируемый параметр сигнала увеличивался на 12% и составил 3.14 ± 0.09 нА ($n=30$) (рис. 3). Кроме этого, в данных экспериментах (SNAP, 200 мкмоль/л) была отмечена тенденция к увеличению постоянной времени спада МТКП, которая достигла значения 1,4 мс, что составило 10 % по сравнению с контрольным значением. Однако это изменение было недостоверным для уровня значимости в $p=0.05$.

Использование SNAP в концентрации 2 ммоль/л привело к значительному увеличению амплитуды МТКП на 47% ($p<0.001$), что составило увеличение на 1,3 нА, по сравнению с контрольным значением в 2.77 нА и постоянной времени спада на 89% ($n=27$; $p<0.001$; рис. 3), что на 0.9 мс больше по сравнению с контролем. При этом амплитуда достигла значения 4.08 ± 0.16 нА, а постоянная времени спада – 1.95 ± 0.10 мс.

Необходимо отметить, что эффекты донора NO, как на амплитуду, так и на длительность МТКП обратимы, так как они полностью исчезали после отмывки препарата. Время инкубации SNAP в экспериментах составляло – 10-20 минут.

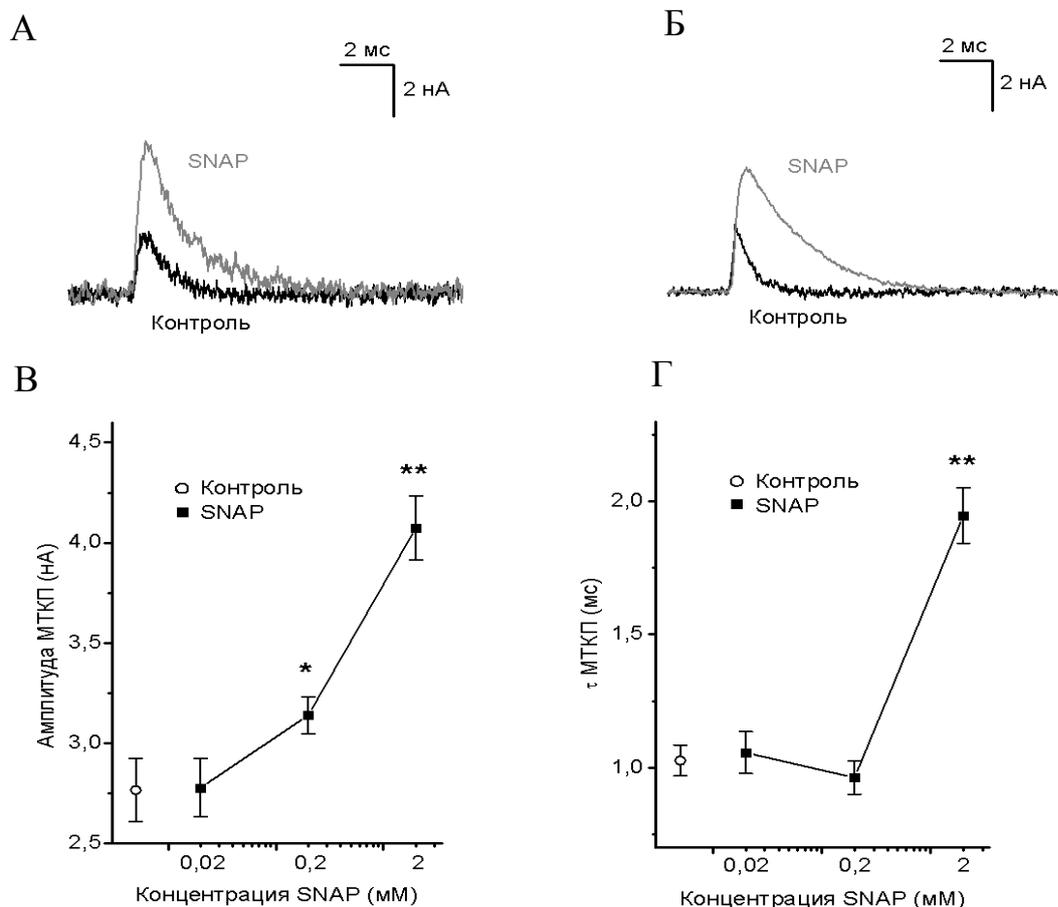


Рисунок 3 - SNAP повышает амплитуду и постоянную времени спада (τ) МТКП доза-зависимым образом. (А) Пример нативного МТКП в контроле (черная линия) и в присутствии 2 ммоль/л SNAP (серая линия). (Б) Усредненные 100 отдельных сигналов, записанных в одной и той же концевой пластинке. (В) В присутствии SNAP в концентрации 200 мкмоль/л наблюдалось умеренное увеличение амплитуды МТКП. Применение 2 ммоль/л SNAP приводило к значительному росту амплитуды МТКП ($n = 20-40$ на каждую концентрацию и на контроль). (Г) Постоянная времени спада (τ) значительно возростала при концентрации SNAP в 2 ммоль/л. Более низкие концентрации донора NO не оказывали эффекта ($n = 20-40$ на каждую концентрацию и контроль)

* - достоверное отличие от контроля ($p < 0.05$)

** - достоверное отличие от контроля ($p < 0.001$)

Действительно ли изменение параметров постсинаптических ответов под действием донора оксида азота соответствует изменениям, характерным для действия ингибитора АХЭ в нервно-мышечном синапсе и не связано ли оно с влиянием на другие пре- и/или постсинаптические молекулярные мишени, способные тем или иным образом увеличивать амплитуду и постоянную времени спада постсинаптических сигналов? Для ответа на этот вопрос были проведены следующие серии экспериментов с использованием классического ингибитора АХЭ параоксона.

В присутствие параоксона в концентрации 10 мкмоль/л, при которой ингибируется практически вся АХЭ амплитуда и постоянная времени спада МТКП выросли относительно контроля на 44% и на 298%, соответственно, и составили 4.93 ± 0.10 нА и 4.10 ± 0.13 мс. Амплитуда в контроле была 2.77 нА, а длительность – 1.03 мс ($n=19$; $p < 0.001$; рис. 4). Эти результаты сопоставимы с данными, полученными при использовании SNAP в концентрации 2 ммоль/л (рис. 2), при которой, согласно вышеприведенным биохимическим данным (*in vitro* максимальная концентрация составляла 1 ммоль/л), наблюдается полное подавление активности АХЭ из гомогенатов *m. EDL* крысы и эритроцитов человека (рис. 2).

Для подтверждения того факта, что именно подавление активности АХЭ в нервно-мышечном синапсе и есть причина наблюдаемых изменений амплитудно-временных параметров МТКП под действием молекул NO, были проведены эксперименты по следующему протоколу: SNAP добавляли в раствор после полного развития эффекта параоксона (через 30 минут). И в данном случае не наблюдалось какого-либо дополнительного увеличения амплитуды сигнала и постоянной времени спада. Амплитуда МТКП при совместном применении параоксона и SNAP составила 5.13 ± 0.20 нА, (по сравнению с 4.93 ± 0.10 нА только в параоксоне, $p = 0.31$), а постоянная времени спада сигналов 3.67 ± 0.10 мс (*vs.* 4.10 ± 0.13 мс в параоксоне, $p = 0.105$; рис. 4).

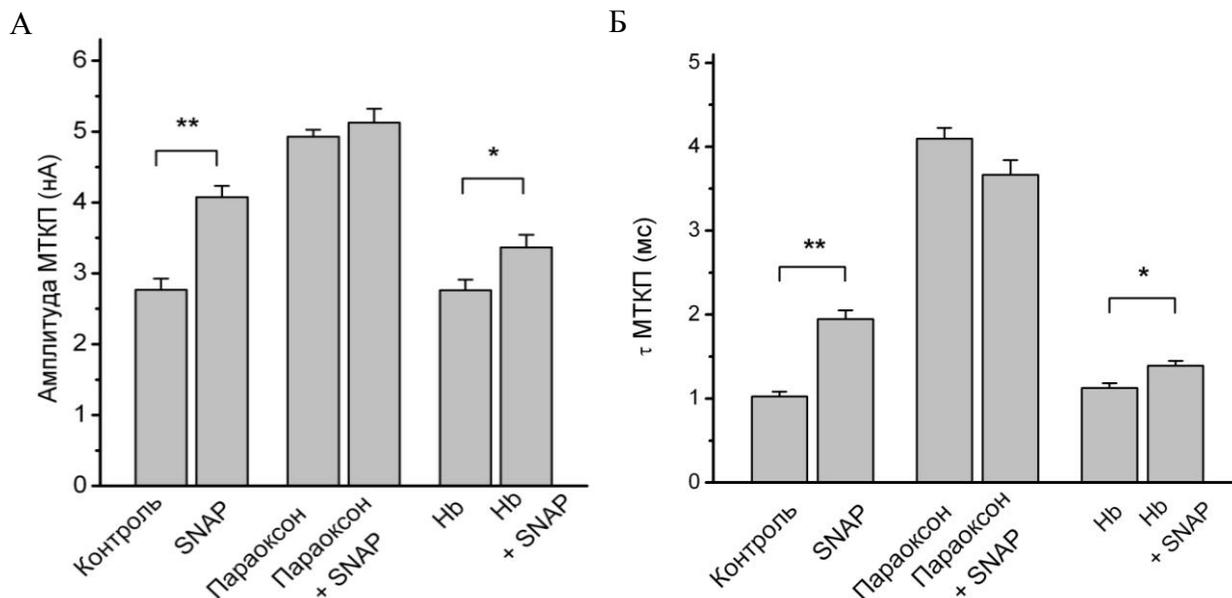


Рисунок 4 - Отсутствие влияния донора NO SNAP (2 ммоль/л) на амплитуду (нА; панель А) и длительность (постоянная времени спада – τ , мкс; панель Б) МТКП, увеличенных в условиях полного ингибирования ацетилхолинэстеразы параоксоном (10 мкмоль/л). Инкубация с ингибитором АХЭ, параоксоном (10 мкмоль/л) значительно повышала как амплитуду МТКП (А), так и τ спада (Б). Применение SNAP (2 ммоль/л) после предварительной инкубации мышцы параоксоном, не оказывало влияния на амплитудно-временные параметры МТКП. Акцептор NO, гемоглобин (Hb) (30 мкмоль/л), сам по себе не оказывал эффекта на амплитуду и длительность МТКП, однако значительно снижал действие SNAP. Данные представлены как усредненные значения \pm SEM, полученные от 4-5 животных (19-24 концевых пластинок)

** - достоверное отличие от контроля ($p < 0.001$)

* - достоверное отличие от контроля ($p < 0.05$)

Таким образом, наличие характерных для ингибирования АХЭ эффектов донора NO на амплитуду и длительность МТКП, полное соответствие выраженности действия и диапазона концентраций в биохимических и

электрофизиологических экспериментах, а также отсутствие обнаруженных эффектов SNAP на постсинаптические ответы после предварительного ингибирования АХЭ позволяет утверждать, что молекулы NO способны эффективно угнетать активность АХЭ в нервно-мышечном соединении млекопитающего.

Возникает вопрос, является ли увеличение амплитуды и постоянной времени спада МТКП, характерные для ингибирования АХЭ, результатом действия именно молекул оксида азота или мы наблюдаем угнетение активности АХЭ, опосредованное молекулами SNAP. Чтобы найти ответ на этот вопрос, мы добавили SNAP в концентрации 2 ммоль/л и NO-акцептор гемоглобин в концентрации 30 мкмоль/л (Mukhtarov et al., 2000; Thomas, Robitaille, 2001).

Гемоглобин сам по себе не оказывал влияния на амплитуду и длительность МТКП, при применении этого акцептора амплитуда МТКП составила 2.76 ± 0.15 нА, а длительность 1.13 ± 0.06 мс (рис. 4). Однако, в присутствии гемоглобина эффекты SNAP на амплитудно-временные параметры МТКП были менее выражены. Так, амплитуда МТКП возросла лишь на 22 % и составила 3.37 ± 0.18 нА при совместном применении донора и акцептора NO гемоглобина, ($p = 0.011$, рис. 4А), а постоянная времени спада увеличилась только на 24 % (гемоглобин + SNAP, 1.39 ± 0.06 мс; $p = 0.003$, рис. 4Б).

Таким образом, эффекты донора NO на амплитуду и длительность МТКП соответствуют классической картине ингибирования АХЭ. Более того, отсутствие этих эффектов после предварительного ингибирования АХЭ параоксоном и значительное их уменьшение в присутствии NO акцептора поддерживают гипотезу о том, что экзогенные молекулы оксида азота способны угнетать активность АХЭ в нервно-мышечном синапсе млекопитающих.

Полученные данные ставят вопрос: физиологична ли такая модуляция активности АХЭ в норме и если да, то чем именно запускается этот механизм? Согласно литературным данным, NO-синтаза в нервно-мышечном синапсе млекопитающих сконцентрирована в области постсинаптической мембраны и тесно ассоциирована с глутаматными NMDA-рецепторами (Grozdanovic, Gossrau, 1998; Lück et al., 2000), активация которых сопровождается входом ионов кальция, необходимого для ферментативного синтеза NO. Ранее была показана точная постсинаптическая локализация NMDAR в *m. EDL*, *m. soleus* и диафрагме (Malomouzh et al., 2011). Более того, было также показано, что ряд эффектов NO в синапсах диафрагмы крысы инициируется именно активацией NMDA-рецепторов (Urzaev et al., 1995; Malomouzh et al., 2003, 2005), что позволило нам высказать предположение о том, что активация NMDAR и связанное с этим усиление эндогенного синтеза NO, помимо прочих возможных эффектов, будет сопровождаться снижением активности АХЭ в нервно-мышечном синапсе.

3.3. Влияние активации NMDA-рецепторов на мембранный потенциал покоя клетки

Так как NMDA-рецептор представляет собой ионный канал, проницаемый для катионов, логично предположить, что в случае наличия функциональных NMDA-рецепторов на постсинаптической мембране, их активация вызовет входящий ток катионов, следовательно, приведет к деполяризации мембранного потенциала покоя. Выраженность этой деполяризации будет зависеть от количества активированных рецепторов и от концентрации ионов в среде. Однако, для NMDA-рецепторов показано наличие магниевого блока, который снимается деполяризацией мембраны (Nowak et al., 1984; Mayer et al., 1984) или, в экспериментальных условиях, использованием безмагниевого раствора.

При экспериментах на одной клетке нам удалось в некоторых случаях обнаружить падение мембранного потенциала в несколько милливольт под воздействием агонистов NMDA-рецепторов глутамата (100 мкмоль/л) и глицина (700 мкмоль/л), нативный сигнал этого падения представлен на рис. 5, однако эффект был непостоянен из-за естественного падения мембранного потенциала поврежденной клетки. В связи с этим последующие серии экспериментов были сделаны методом обкола большого числа мышечных волокон; при этом измерялся мембранный потенциал покоя.

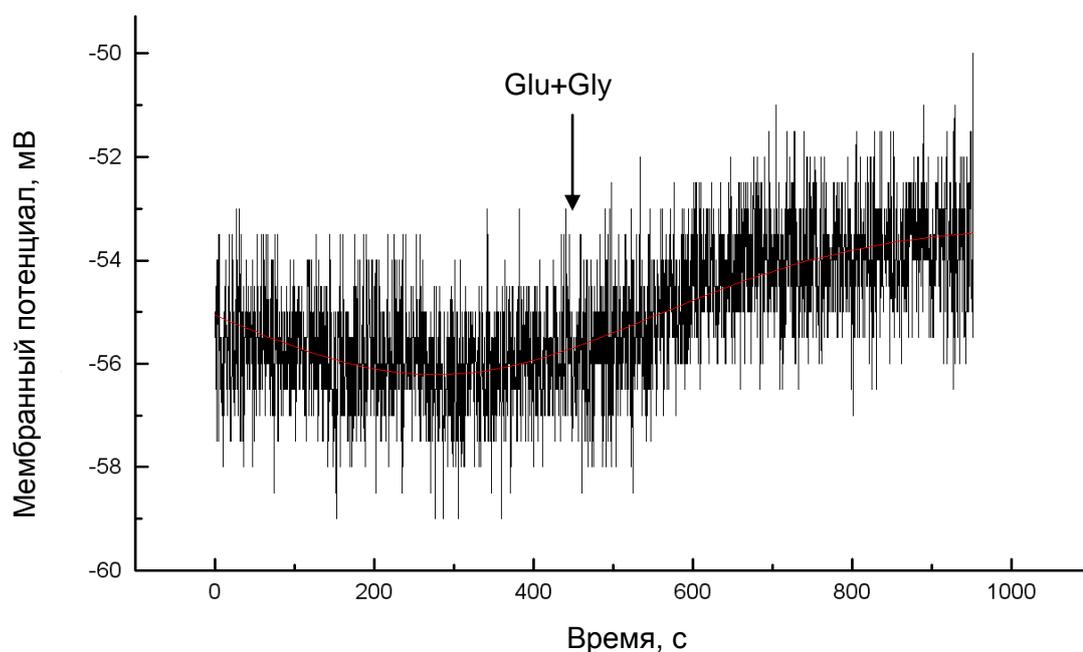


Рисунок 5 — Нативная кривая деполяризации мембраны одного мышечного волокна под действием агонистов NMDA-рецепторов глутамата (100 мкмоль/л) и глицина (700 мкмоль/л). Вследствие активации NMDA-рецепторов, ассоциированный с рецептором канал становится проницаем для катионов — Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , вход которых обуславливает деполяризацию постсинаптической мембраны

В безмагниевом растворе добавление глутамата в концентрации 100 мкмоль/л и ко-агониста NMDAR глицина в концентрации 700 мкмоль/л

приводило к достоверному падению мембранного потенциала на 6,5 % (рис. 6), при этом контрольное значение составило 79.37 ± 0.24 мВ ($n=270$), а после аппликации аминокислот мембранный потенциал составил 74.18 ± 0.32 мВ ($n=140$).

Чтобы выяснить, действительно ли данный эффект связан с активацией NMDA рецепторов, была проведена серия экспериментов с использованием селективного обратимого блокатора NMDA-рецепторов AP5 (DL-2-амино-5-фосфоновалериановая кислота). Добавление AP5 в концентрации 500 мкмоль/л само по себе не оказывало достоверного влияния на мембранный потенциал клетки. Однако, последующая аппликация глутамата и глицина вызывала значимо меньшую деполяризацию в присутствии блокатора, которая составила лишь 1,5 % (78.15 ± 0.39 мВ vs. 79.37 ± 0.24 мВ в контроле), однако была статистически достоверной ($n=127$).

Отсутствие полного блокирующего эффекта AP5 может объясняться тем, что данный блокатор обратим, конкурентно связывается с участком связывания глутамата, и его степень сродства к NMDA-рецептору сходна с аффинностью глутамата, вследствие чего аминокислота может вытеснять блокатор. Чтобы добиться полного блокирования эффекта аминокислот, мы использовали блокатор глицинового сайта NMDAR 5,7-дихлорокинуреновую кислоту (нариевая соль) в концентрации 100 мкмоль/л. При добавлении 5,7-дихлорокинуреновой кислоты достоверного изменения мембранного потенциала не наблюдалось ($n=79$). При совместной аппликации AP5 и 5,7-дихлорокинуреновой кислоты деполяризации постсинаптической мембраны также не возникало ($n=79$). При этом, на фоне этих двух блокаторов, аминокислоты не вызывали достоверного падения мембранного потенциала (78.8 ± 0.22 мВ vs. 79.37 ± 0.24 мВ в контроле; $n=85$, рис. 6).

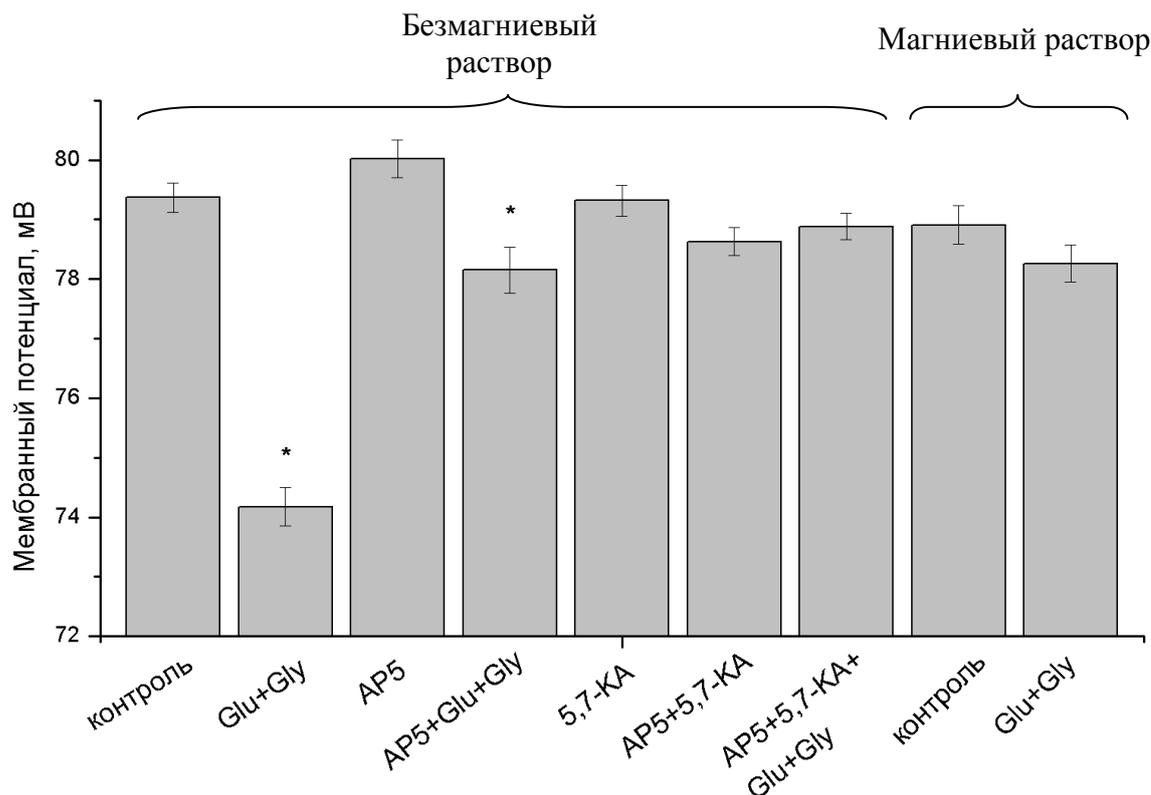


Рисунок 6 — Влияние активации NMDAR на мембранный потенциал покоя постсинаптической клетки. При аппликации глутамата (100 мкмоль/л) и глицина (700 мкмоль/л) в безмагниевом растворе наблюдалось падение мембранного потенциала покоя клетки. Добавление блокаторов NMDAR – AP5 (DL-2-амино-5-фосфоновалериановая кислота, 500 мкмоль/л) и 5,7-дихлорокинуреновой кислоты (5,7-КА; 100 мкмоль/л), а также их совместное применение не оказывали эффекта на МПП. Добавление глутамата и глицина на фоне AP5 незначительно снижало МПП, однако этот эффект полностью блокировался при аппликации двух блокаторов – и AP5, и 5,7-дихлорокинуреновой кислоты. В растворе, содержащем ионы магния, аппликация глутамата и глицина не оказывало эффекта на МПП постсинаптической клетки

* - достоверное отличие от контроля ($p < 0.05$)

Альтернативный, физиологический способ блокады NMDA-рецепторов – это магниевый блок. Если наблюдаемый эффект на мембранный потенциал обусловлен работой этих рецепторов, то присутствие магния в растворе должно блокировать развитие деполяризации при аппликации агонистов. И действительно, в присутствии Mg^{2+} аминокислоты не оказывали влияния на мембранный потенциал, в безмагниевом контроле он составил 78.91 ± 0.32 мВ, после добавления глицина и глутамата – 78.26 ± 0.31 мВ ($n=105$) (рис. 6).

Из полученных результатов можно сделать вывод, что на постсинаптической мембране имеются функциональные NMDAR, активация которых вызывает достоверные сдвиги мембранного потенциала в положительную сторону. Такая деполяризация обеспечивается входящим током катионов через канал рецептора, блокируется селективными блокаторами глутаматного и глицинового сайта связывания и не наблюдается в условиях сохранения магниевых блока.

Следующая серия экспериментов была посвящена исследованию возможных эффектов активации NMDA-рецепторов и связанного с этим увеличения продукции оксида азота на амплитудно-временные параметры синаптических ответов и представляла собой регистрацию МТКП в *m. EDL* в присутствии агонистов NMDAR глутамата и глицина и антагониста этих рецепторов AP-5.

3.4. Эффект глутамат-опосредованной активации эндогенного синтеза NO на параметры МТКП

Добавление глутамата в концентрации 100 мкмоль/л (Malomouzh et al., 2003) приводило к возрастанию амплитуды МТКП на 9% (рис. 7; $p=0,02$; $n=30$), которая составила 3.53 ± 0.10 нА (*vs.* 3.23 ± 0.07 нА в контроле), этот эффект наблюдался только через 30-40 минут после добавления аминокислоты. При добавлении ко-агониста NMDAR глицина в низкой

концентрации (100 мкмоль/л), изменений в эффекте глутамата не наблюдалось. Однако повышение концентрации глицина до 700 мкмоль/л значительно усилило влияние глутамата и привело к росту амплитуды МТКП на 19% по сравнению с контролем, при этом значения амплитуды достигли 3.87 ± 0.11 (vs. 3.23 ± 0.07 нА в контроле; $n=25$; $p < 0.0003$; рис. 7). Длительность сигналов в обоих случаях значительных изменений не претерпевала вне зависимости от состава используемого раствора. Дальнейшее увеличение концентрации глутамата (до 500 мкмоль/л в присутствии 700 мкмоль/л глицина) не усиливало влияние на амплитуду МТКП. Применение 700 мкмоль/л глицина отдельно не оказывало эффект ни на длительность МТКП, ни на амплитуду сигналов (рис. 7).

Наглядный пример изменений амплитуды МТКП при совместном применении глутамата и глицина представлен на рис. 7. Эффект глутамата появлялся через 30-40 минут инкубации в растворе и становился наиболее выраженным к 60 минуте инкубации. Для проверки того, что изменение амплитуды МТКП под действием глутамата и глицина есть следствие снижения активности АХЭ, были проведены эксперименты с добавлением аминокислот на фоне ингибирования ацетилхолинэстеразы. Амплитуда сигнала, увеличенная под действием параоксона (10 мкмоль/л) с контрольного значения 3.23 ± 0.07 нА ($n=25$) до 4.93 ± 0.1 нА ($n=24$), не изменялась при аппликации глутамата и глицина и составляла 5.07 ± 0.14 нА ($n=30$, $p=0.4$; рис. 7).

Отсутствие эффекта аминокислот при применении параоксона показывает, что увеличение амплитуды МТКП происходит не из-за изменений в чувствительности АХ рецепторов или размера кванта, а именно из-за ингибирования АХЭ.

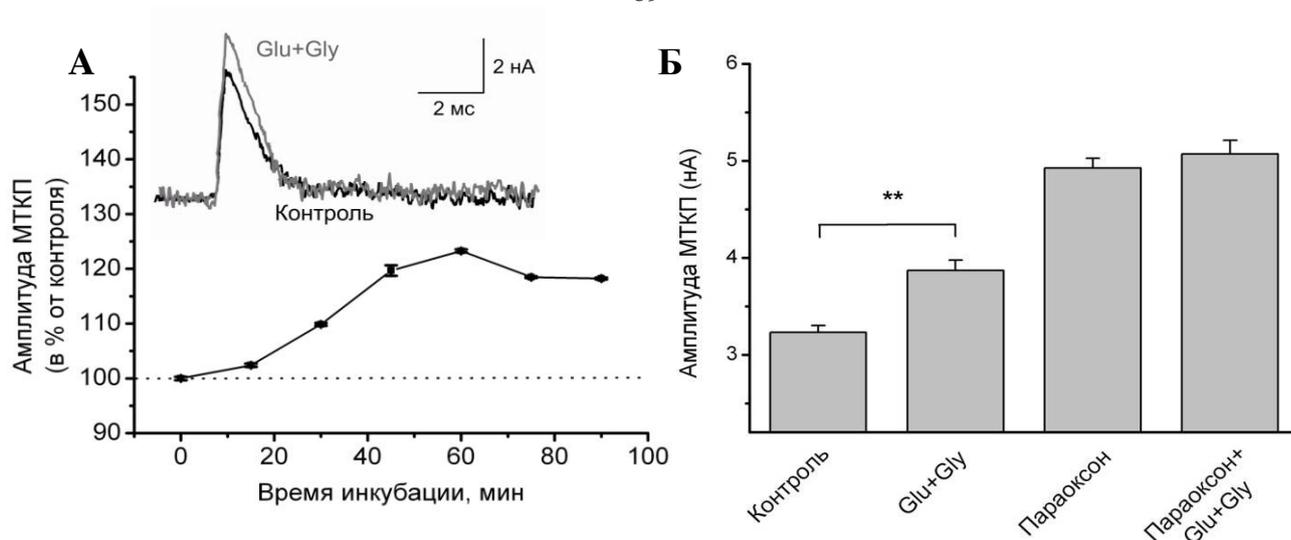


Рисунок 7 – (А) Развитие эффекта глутамата на амплитуду МТКП во времени. Влияние глутамата и глицина на амплитуду МТКП связано с ингибированием синаптической АХЭ; (Б) Влияние глутамата (Glu, 100 мкмоль/л) и глицина (Gly, 700 мкмоль/л) на амплитуду МТКП и отсутствие этого действия аминокислот при ингибировании ацетилхолинэстеразы параоксоном (10 мкмоль/л). (А) Данный пример иллюстрирует увеличение амплитуды МТКП во времени при совместном применении глутамата и глицина в одном из типовых экспериментов (каждая точка представляет собой усредненную амплитуду от 200 МТКП). На вставке – усредненный МТКП из 100 МТКП, записанных в одной и той же концевой пластинке в контроле (черная линия) и после инкубации в течение часа с раствором глутамата (100 мкмоль/л) и глицина (700 мкмоль/л) (серая линия). (Б) Инкубация в течение часа с 100 мкмоль/л глутамата привела к увеличению амплитуды МТКП на 9 %. Совместное применение глутамата (100 мкмоль/л) и глицина (700 мкмоль/л) привело к более значительному росту амплитуды МТКП (на 19 %). Применение аминокислот на фоне ингибитора АХЭ, параоксона (10 мкмоль/л), не оказывало влияния на амплитуду сигналов. Данные представлены в виде усредненных значений \pm SEM, полученных от 4-7 животных (21-40 концевых пластинок)

* - достоверное отличие от контроля ($p < 0.05$);

** - достоверное отличие от контроля ($p < 0.001$)

3.5. Исследования непосредственного влияния аминокислот на активность АХЭ *in vitro**

Далее, необходимо было получить прямые доказательства отсутствия у используемых аминокислот собственного ингибирующего действия на активность АХЭ. Для этого были проведены биохимические эксперименты по оценке активности ацетилхолинэстеразы гомогенатов *m. EDL* в присутствии тех же концентраций глутамата (100 мкмоль/л) и глицина (700 мкмоль/л), что и в электрофизиологических экспериментах. Оказалось, что в присутствии каждой из этих аминокислот, а также при их совместном действии, активность АХЭ не претерпевала никаких достоверных изменений (рис. 8; n=20).

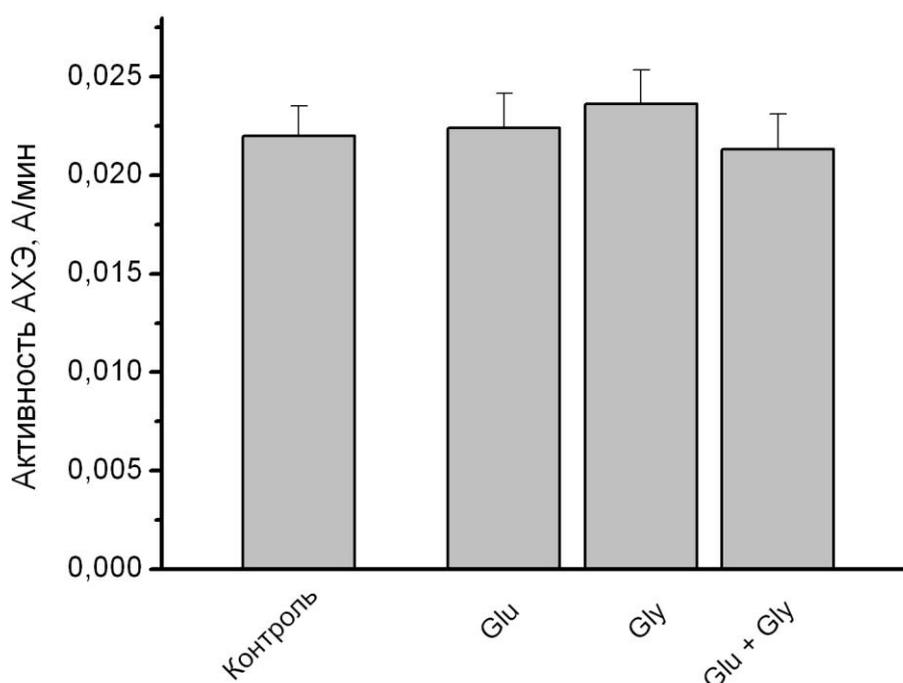


Рисунок 8 - Активность ацетилхолинэстеразы гомогенатов *m. EDL* крысы (А/мин – изменение поглощения света с длиной волны 412 нм, отражающее гидролиз субстрата холинэстеразой, в минуту) в контроле, в присутствии глутамата (Glu, 100 мкмоль/л), глицина (Gly, 700 мкмоль/л) и при совместном добавлении аминокислот

*Эксперименты проводились совместно с м.н.с. ИОФХ им. А. Е. Арбузова, к.б.н. Харламовой А. Д.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что изменение амплитуды МТКП в нервно-мышечном синапсе под действием глутамата и глицина есть следствие ингибирования АХЭ, вызванного не прямым действием этих аминокислот на фермент, а опосредованным, неустановленным до настоящего времени, молекулярным механизмом.

3.6. Исследование влияния глутамата и глицина на амплитудно-временные параметры МТКП в присутствии блокатора NMDA-рецепторов и ингибитора NO-синтазы

Наиболее вероятным кандидатом на роль белка, воспринимающего сигнал от глутамата и запускающего этот молекулярный механизм регуляции, являются NMDA-рецепторы. В частности, это подтверждается и обнаруженным нами более выраженным эффектом глутамата на амплитуду МТКП в присутствии глицина.

Действительно ли эти рецепторы опосредуют эффект глутамата на амплитуду МТКП? И реализуется ли эффект аминокислот через образование молекул NO в нервно-мышечном синапсе? Получению ответов на эти вопросы и были посвящены следующие серии электрофизиологических экспериментов с использованием классического конкурентного антагониста NMDA-рецепторов DL-2-амино-5-фосфоновалериановой кислоты (AP5) и конкурентного ингибитора NO-синтазы NG-нитро-L-аргинин-метил эстера (L-NAME).

Добавление в раствор только AP5 (500 мкмоль/л) не повлияло на амплитуду МТКП (AP5, 2.86 ± 0.11 нА; контроль, 3.09 ± 0.10 нА; $p = 0.12$; рис. 9). Последующая аппликация глутамата в концентрации 100 мкмоль/л и глицина в концентрации 700 мкмоль/л на фоне блокатора NMDA-рецепторов не приводила к достоверному изменению в амплитуде МТКП, при совместном

применении агонистов NMDAR и блокатора AP5 амплитуда МТКП составила 2.82 ± 0.10 нА (*vs.* AP-5, 2.86 ± 0.11 нА; $p = 0.82$; рис. 9), что подтверждает роль NMDA-рецепторов в реализации эффекта аминокислот на амплитуду МТКП. Добавление ингибитора NO-синтазы L-NAME в концентрации 100 мкмоль/л приводило к небольшому, но статистически достоверному снижению амплитуды МТКП на 8%, которая составила 2.96 ± 0.08 нА (*vs.* 3.23 ± 0.07 нА в контроле, $p = 0.014$; Рис. 9). Аппликация аминокислот после инкубации с L-NAME не приводила к росту амплитуды МТКП (Glu+Gly+L-NAME: 2.79 ± 0.08 нА; L-NAME: 2.96 ± 0.08 нА; $p = 0.14$, Рис. 9)

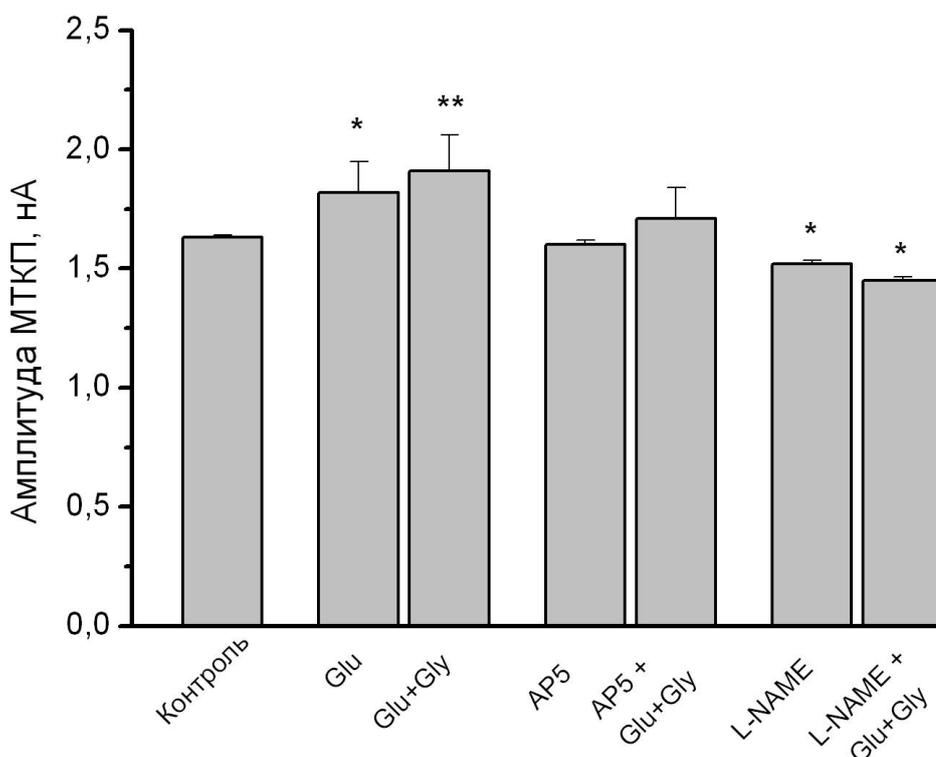


Рисунок 9 - Влияние глутамата (Glu, 100 мкмоль/л) и глицина (Gly, 700 мкмоль/л) на амплитуду МТКП в нормальных условиях и на фоне блокады NMDA-рецепторов DL-2-амино-5-фосфоновалериановой кислотой (AP5, 500 мкмоль/л) и при ингибировании фермента NO-синтазы NG-нитро-L-аргинин-метил эстером (L-NAME, 100 мкмоль/л); * - достоверное отличие от контроля ($p < 0.05$); ** - достоверное отличие от контроля ($p < 0.001$)

В дополнительной серии экспериментов мы попытались ослабить эффект аминокислот на амплитуду МТКП, используя мембранно-непроницаемый акцептор NO гемоглобин (30 мкмоль/л). И действительно, после совместного применения гемоглобина и аминокислот значительного увеличения амплитуды МТКП не наблюдалось, при этом амплитуда сигналов при аппликации гемоглобина составила 2.79 ± 0.11 нА, а при инкубации в растворе с глутаматом (100 мкмоль/л), глицином (700 мкмоль/л) и гемоглобином – 2.99 ± 0.18 нА ($p=0.31$).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что эффект аминокислот на амплитуду МТКП опосредуется NMDA-рецепторами и реализуется исключительно при активации NO-синтазы, кроме того, имеет место определенный уровень эндогенной конститутивной активности NO-синтазы в мышечных волокнах, что согласуется с данными литературы (Stamler, Meissner, 2001).

Таким образом, отсутствие влияния активации NMDAR на миниатюрные постсинаптические потенциалы, которое было показано ранее (Malomouzh et al., 2003), могло наблюдаться из-за более короткого периода инкубации с аминокислотами и, возможно, из-за различных типов мышц, на которых проводились эксперименты.

Эти серии экспериментов заставили нас пересмотреть изначальную гипотезу функциональной связи между NMDAR и NO-синтазой в нервно-мышечном соединении. Ранее, мы предполагали, что активация NMDAR приводит к последующему входу ионов кальция Ca^{2+} , которые связываются кальмодулином и напрямую активируют NO-синтазу. Однако, в наших экспериментах, эффект и от экзогенного донора NO, и от ингибитора NO-синтазы L-NAME, проявлялся по прошествии 15-20 минут инкубации, в то время как падение амплитуды МТКП под влиянием аминокислот возникало в полной мере только после 40-60 минут инкубации (рис. 7).

Данные результаты показывают, что активация NMDAR экзогенными глутаматом и глицином запускает долговременный механизм, который приводит к увеличению продукции NO и частичному ингибированию активности АХЭ.

3.7. Увеличение амплитуды МТКП через активацию NMDA-рецепторов связано с фосфатазной активностью, а не с синтезом белка *de novo*

Анализ литературы показал, что существует два наиболее подходящих механизма, объясняющих отложенный во времени эффект глутамата и глицина на амплитудно-временные параметры МТКП: 1) активация NMDA-рецепторов усиливает синтез белка *de novo* (Skinner et al., 2008), и, возможно, непосредственно синтез NO-синтазы; 2) вход ионов Ca^{2+} через NMDAR инициирует Ca^{2+} -зависимый путь регуляции NO-синтазы при помощи изменения степени ее фосфорилирования (Rameau et al., 2004). Чтобы проверить первую гипотезу, мы применили селективный ингибитор синтеза белка циклогексимид. Инкубация в течение 180 минут с раствором циклогексимида в концентрации 350 мкмоль/л привели к росту амплитуды МТКП (циклогексимид, 3.59 ± 0.09 нА; контроль, 3.23 ± 0.07 нА, $p=0.002$). Однако, после инкубации препарата в растворе циклогексимида, эффект глутамата и глицина на амплитуду МТКП сохранялся, амплитуда при этом достоверно увеличилась на 11 % до 4.05 ± 0.14 нА (*vs.* 3.59 ± 0.09 нА в циклогексимиде, $p=0.007$, рис. 10). Таким образом, можно заключить, что синтез белка *de novo* не влияет на усиление продукции NO, вызванное глутаматом.

Согласно Rameau с соавторами (2004), задержанное усиление продукции NO во времени (на 40-60 мин) после активации NMDAR, может быть опосредовано дефосфорилированием NO синтазы серин-треонин-протеин фосфатазами типа PP1 и PP2A.

Используя ооадаиковую кислоту (ОА, 1 мкмоль/л) в качестве ингибитора этих фосфатаз, мы проверили возможное участие этих ферментов в реализации действия глутамата и глицина на амплитуду МТКП. После применения ооадаиковой кислоты, средняя амплитуда МТКП повысилась на 14% по сравнению с контрольными значениями (3.68 ± 0.11 нА, $p=0.0006$). При этом, ОА полностью предотвращала действие глутамата и глицина на амплитуду МТКП (ОА, 3.68 ± 0.11 нА; ОА + глутамат + глицин, 3.43 ± 0.10 нА; $p=0.104$, рис. 10).

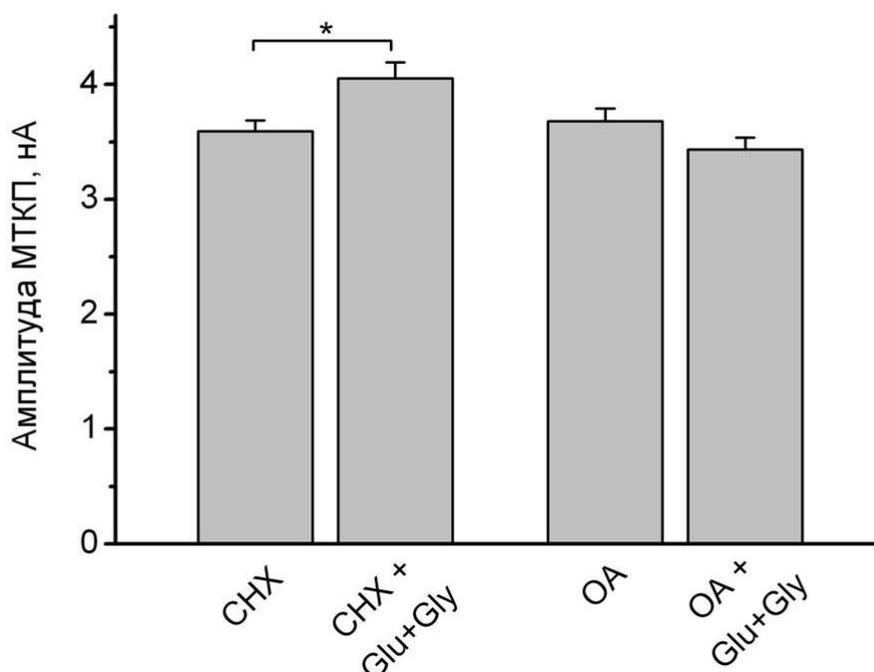


Рисунок 10 - Ингибирование фосфатаз PP1 и PP2A ооадаиковой кислотой (ОА, 1 мкмоль/л), без угнетения белкового синтеза, препятствовало росту амплитуды МТКП, индуцированному глутаматом и глицином. Предварительная инкубация с ингибитором синтеза белка, циклогексимидом (CHX, 350 мкмоль/л), не препятствовала росту амплитуды МТКП в присутствии глутамата (Glu, 100 мкмоль/л) и глицина (Gly, 700 мкмоль/л). Данные представлены в виде усредненных значений \pm SEM, полученных от 4-7 животных (21-40 концевых пластинок). * - достоверное отличие от контроля ($p<0.05$); ** - достоверное отличие от контроля ($p<0.001$).

Таким образом, можно сделать заключение, что активация NMDA-рецепторов экзогенным глутаматом запускает ингибирование активности АХЭ через метаболический путь, включающий дефосфорилирование NO-синтазы

3.8. Активация NMDAR эндогенным глутаматом приводит к увеличению амплитуды МТКП, регистрируемых в межстимульные интервалы, при высокочастотной стимуляции*

Основываясь на проделанных экспериментах, мы предположили возможность регуляции активности синаптической АХЭ посредством эндогенного глутамата. Эта аминокислота известна как ко-медиатор ацетилхолина в холинэргических синапсах (Vyas, Bradford, 1987; Israel et al., 1993; Meister et al., 1993; Waerhaug, Ottersen, 1993; Pinard et al., 2003; Nishimaru et al., 2005). Усиление синаптической активности (такое, как ритмическая высокочастотная стимуляция) может привести к накоплению глутамата в синаптической щели, где он может оказывать депрессорный эффект на активность синаптической АХЭ, а также модулировать квантовую (Pinard et al., 2003) и неквантовую секрецию ацетилхолина (Malomouzh et al., 2003).

Следующие серии электрофизиологических экспериментов были направлены на исследование ингибирования АХЭ при помощи NO в процессе ритмической высокочастотной стимуляции. Поскольку NO способен модулировать интенсивность вызванной квантовой секреции (Thomas, Robitaille, 2001), мы использовали для анализа амплитудно-временные параметры спонтанных ответов (МТКП), записанных в межстимульные интервалы, как показатель активности синаптической АХЭ. Нерв стимулировался с частотой 10 Гц – это частота позволяет зарегистрировать достаточное количество МТКП в межстимульных интервалах.

*Эксперименты проводились совместно с с.н.с. КИББ КазНЦ РАН, к.б.н. Ковязиной И. В.

В нормальных физиологических условиях, глицин необходимый для активации NMDAR, обычно присутствует в межклеточном пространстве (Edmonds et al., 1995). Вследствие этого, мы провели эксперименты как в растворе, не содержащем глицин, чтобы выявить возможные эффекты высокочастотной активности как таковой на МТКП, так и в присутствии глицина в концентрации 700 мкмоль/л для усиления действия глутамата. Было зарегистрировано 100-200 МТКП каждой концевой пластинки в покое, затем в течение 5 минут при частоте стимуляции 10 Гц в межстимульных интервалах и после окончания стимуляции. Вследствие значительной вариабельности параметров миниатюрных токов различных концевых пластинок, мы сравнивали параметры МТКП, записанных в одних и тех же клетках в покое и во время высокочастотной стимуляции. В растворе, не содержащем глицин, стимуляция частотой 10 Гц не изменяла амплитуду и длительность МТКП, записанных в межстимульные интервалы по сравнению с сигналами, полученными в покое, до стимуляции, при этом в контроле амплитуда МТКП составила 2.86 ± 0.16 нА, а во время стимуляции без глицина – 2.84 ± 0.18 нА ($p = 0.72$, рис. 11). Эти результаты согласуются с ранее полученными данными об инвариабельности МТКП, зарегистрированных в нервно-мышечном соединении лягушки в процессе десяти- и пятидесятигерцовой стимуляции (Kovyazina et al., 2010). Однако, в присутствии глицина (700 мкмоль/л), стимуляция частотой в 10 Гц привела к росту амплитуды МТКП межстимульных интервалов до $108.7 \pm 2.9\%$ относительно значений, полученных до стимуляции (амплитуда МТКП до стимуляции по сравнению со значениями во время стимуляции, $p = 0.03$, рис. 11). Длительность МТКП, однако, не изменялась.

Когда нервно-мышечный препарат был инкубирован либо с раствором AP5 (25 мкмоль/л), либо L-NAME (100 мкмоль/л), никаких изменений в амплитуде МТКП в процессе высокочастотной стимуляции не наблюдалось как в растворе с глицином, так и без глицина.

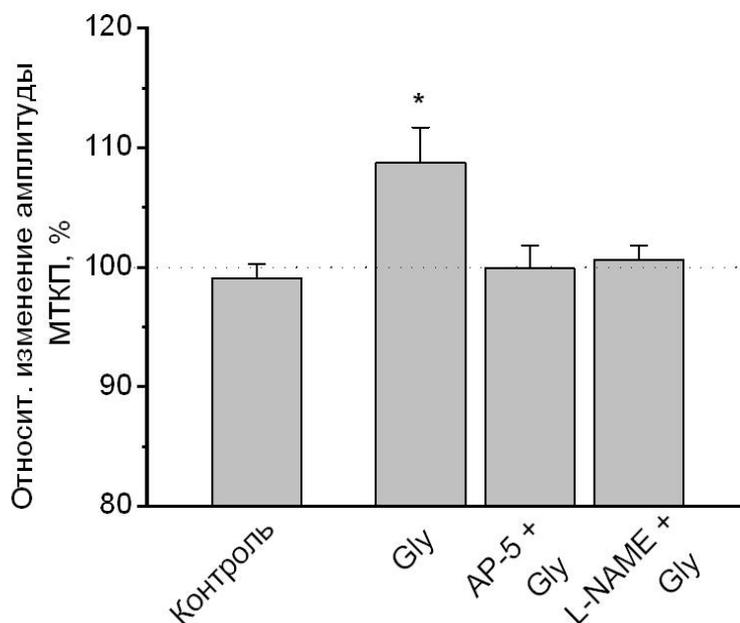


Рисунок 11 - Высокочастотная (10 Гц) стимуляция нерва повышает амплитуду МТКП, что обусловлено активацией NMDAR, запускаемой эндогенным глутаматом с последующим усилением продукции NO. В контрольных концевых пластинках амплитуда МТКП не изменялась в течение 5 минут стимуляции с частотой 10 Гц. Добавление глицина (700 мкмоль/л) в омывающий раствор привело к небольшому росту амплитуды МТКП (на $8.7\% \pm 2.9\%$ vs. контроль), записанных в межстимульные интервалы. Предварительная инкубация с блокатором NMDA-рецепторов, AP5 (25 мкмоль/л), или с ингибитором NO-синтазы, L-NAME (100 мкмоль/л), предотвращала все эффекты, связанные с добавлением глицина. Контрольные значения записывались до стимуляции. Данные представлены в процентах от контрольных значений, как усредненные показатели \pm SEM, в одних и тех же 16-20 концевых пластинках (от 4 животных)

* - достоверное отличие от контроля ($p < 0.05$)

** - достоверное отличие от контроля ($p < 0.001$)

Таким образом, можно сделать заключение, что в процессе нормального функционирования синапса, увеличение амплитуды синаптических ответов происходит благодаря частичному ингибированию АХЭ молекулами NO, синтез которых запускается активацией NMDAR при помощи глутамата и глицина. В отличие от медленно развивающихся эффектов экзогенных аминокислот, действие эндогенного глутамата проявляется сразу же, во время сессии высокочастотной (10 Гц) стимуляции нерва.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Газообразный мессенджер NO модулирует множество процессов в организме, в том числе, синаптическую передачу (Schuman, Madison, 1994; Ohkuma, Katsura, 2001), а также оказывает влияние на ряд синаптических белков. Мы показали, что донор оксида азота S-нитрозо-N-ацетил-DL-пеницилламин (SNAP) ингибирует активность ацетилхолинэстеразы как *in vitro*, так и *ex vivo*. Ранее было показано, что другой донор NO, spermine NONOate, способен угнетать активность АХЭ гомогенатов мозга *in vitro* (Udayabani et al., 2008), полученный нами результат показывает, что донор NO SNAP ингибирует также АХЭ эритроцитов человека и гомогенатов мышц крысы в биохимических экспериментах. В электрофизиологических опытах было выявлено, что SNAP (в концентрациях, ингибирующих АХЭ *in vitro*) повышает амплитуду и длительность МТКП, что характерно для ингибирования АХЭ в нервно-мышечном синапсе. Отсутствие этих эффектов SNAP после предварительной инкубации с параоксоном (необратимым ингибитором АХЭ) доказывает, что в присутствии донора NO изменение амплитудно-временных параметров МТКП обусловлено именно снижением активности АХЭ, а не изменением размера кванта медиатора или чувствительности постсинаптических рецепторов. Более того, акцептор NO гемоглобин (Mukhtarov et al., 2000; Thomas, Robitaille, 2001), значительно снижал влияние SNAP на МТКП. Таким образом, частичное ингибирование активности АХЭ в присутствии доноров NO может оказывать влияние на синаптическую передачу, что делает необходимым учитывать этот аспект при их терапевтическом применении. Продукция эндогенного оксида азота, опосредованная активацией NMDAR, достаточна для частичного

ингибирования активности ацетилхолинэстеразы. Однако, остается невыясненным, проявляется ли ингибирующий эффект NO только при аппликации доноров NO, при патологиях (когда продукция NO усилена), или NO может влиять на активность АХЭ и при нормальных физиологических условиях. Не так давно была показана колокализация фермента NO-синтазы и NMDA-рецепторов в нервно-мышечном соединении млекопитающих (Grozdanovic, Gossrau, 1998; Lück et al., 2000). NMDAR обладают достаточно высокой проницаемостью для ионов кальция и расположены непосредственно на постсинаптической мембране во вторичных складках, где локализовано основное количество АХЭ (Mays et al., 2009; Bernard et al., 2011; Malomouzh et al., 2011).

Глутамат хорошо известен как медиатор ацетилхолина (Vyas, Bradford, 1987; Israel et al., 1993; Meister et al., 1993; Waerhaug, Ottersen, 1993; Pinard et al., 2003; Nishimaru et al., 2005). Если рассматривать полученные ранее экспериментальные данные о том, что активация NMDAR приводит к усилению продукции NO, можно предположить наличие NO-опосредованного ингибирования АХЭ, которое запускается молекулой глутамата. Добавление глутамата и глицина увеличивало амплитуду МТКП, и этот эффект полностью исчезал после блокирования NMDAR, ингибирования NO-синтазы или АХЭ. К тому же, чтобы проверить отсутствие непосредственного ингибирующего эффекта глутамата и глицина, был проведен ряд дополнительных биохимических исследований.

Наконец, это исследование показало, что дефосфорилирование белка (а точнее, дефосфорилирование NO-синтазы) может играть ключевую роль в «тонкой» регуляции продукции NO в нервно-мышечном синапсе млекопитающих.

Мы также провели серию электрофизиологических экспериментов, чтобы выяснить предполагаемое действие эндогенного глутамата на амплитудно-временные параметры сигналов. Высокочастотная (10 Гц)

стимуляция мотонейрона проводилась как в растворе, содержащем глицин, так и в растворе без глицина, МТКП при этом записывались в межстимульные интервалы. Достоверных изменений амплитуды не наблюдалось при стимуляции в растворе без глицина, а также при блокаде NMDA-рецепторов или ингибировании NO-синтазы. Таким образом, увеличение амплитуды МТКП во время высокочастотной стимуляции обусловлено активацией NMDAR, индуцированной эндогенным глутаматом, с последующим ростом продукции NO и частичным ингибированием активности синаптической АХЭ. Интересно, что рост амплитуды МТКП во время стимуляции нерва начинался непосредственно после начала стимуляции (т.е. без задержки) и оставался на одном уровне в течение всех 5 минут записи. Это означает, что в случае высвобождения эндогенного глутамата во время высокочастотной стимуляции, рост продукции NO мог быть обусловлен «быстрой» прямой активацией NO-синтазы ионами Ca^{2+} без вовлечения в процесс дефосфорилирования NO-синтазы. Необходимо учитывать, что в случае ритмической стимуляции двичательного нерва, наряду с секрецией эндогенного глутамата происходит и секреция АХ, способного, как увеличивать поступление ионов кальция в клетку через канал никотиновых АХР, так и запускать выход ионов кальция из внутриклеточных компартментов путем активации метаботропных мускариновых рецепторов (Wotta et al., 1998). Таким образом, отличия в действии экзогенного и эндогенного глутамата можно объяснить, например, наличием дополнительного к NMDAR источником ионов кальция, активирующих NO-синтазу. Относительно высокий внутриклеточный уровень ионов кальция приводит к быстрому увеличению продукции оксида азота NO-синтазой. Низкие концентрации ионов кальция также способны приводить к усилению продукции NO, однако в этом случае эффект реализуется посредством активации сложных метаболических путей и требует значительно большего промежутка времени (Rameau et al., 2004).

Взаимодействие NMDAR, ацетилхолинэстеразы и оксида азота отмечались и ранее. Так в гладких мышцах, показано, что применение агонистов NMDAR приводит к увеличению чувствительности мышцы к ацетилхолину, при этом наблюдается увеличение продукции оксида азота (Antošová, Strapková, 2013). Более того, в центральной нервной системе наблюдается взаимодействие активности ацетилхолинэстеразы и NMDAR. Так, ингибирование АХЭ может модулировать действие антагонистов NMDAR, а именно, уменьшать повреждающее действие таких веществ на нейроны через усиление экспрессии фактора роста нервов BDNF (Bendix et al., 2014), что, возможно, осуществляется за счет снижения продукции оксида азота (Maiese et al., 1993). Более того, было показано, что в гиппокампе при ингибировании АХЭ или стимуляции АХР, наблюдается усиление NMDA-опосредованного сигнала (Ishibashi et al., 2014).

Также, изменения рН могут существенно повлиять на работу всех участников данного процесса. Оксид азота, как и активные формы кислорода, с одной стороны, является одним из факторов оксидативного стресса, образуя высокоактивные окисляющие соединения, такие как пероксинитрит (Sherman et al., 1992; Beckman, 1991; Radi et al., 1991), а с другой стороны, было показано, что *S*-нитрозилирование белков и ферментов оксидом азота может уберечь их от повреждения окислителями (Kohr et al., 2014). Более того, NO/цГМФ метаболический путь активирует антиапоптотическую серин-треонин-киназу Akt при помощи активации через протеинкиназу G фосфотидилинозитол-3-киназы (Kang et al., 2004). В то же время, на активность синаптической АХЭ также могут оказывать влияние процессы окислительного стресса, существенно снижая ее активность (Delwing et al., 2003; Wyse et al., 2004).

Также, NO может снижать чрезмерную активацию NMDAR *S*-нитрозилируя их агонисты и делая их, таким образом, недоступными для связывания с рецептором (Mustafa et al., 2007). Показано, что активность NO-

синтазы также может изменяться посредством ее *S*-нитрозилирования или денитрозилирования, индуцируемого входящим током кальция через NMDAR. Нитрозилирование экзогенными донорами приводит к снижению активности NOS. При этом процессы дефосфорилирования NO-синтазы, приводящие к ее активации, могут запускаться денитрозилированием. В целом, это доказывает, что реакции *S*-нитрозилирования/денитрозилирования играют важную роль в процессах регуляции активности этого фермента. (Qu et al., 2012).

Агонисты NMDAR могут действовать на активность NO-синтазы противоположным образом, в зависимости от концентрации выделяемых аминокислот. Так, низкие концентрации глутамата (порядка 10 мкмоль/л) вызывают снижение активности NO-синтазы, которое приводит, соответственно, к снижению продукции оксида азота, в то время как использование высоких концентраций (100-500 мкмоль/л) приводит к усилению деятельности этого фермента (Rameau et al., 2004).

Интересно отметить, что при патологиях, для лечения которых обычно используются ингибиторы АХЭ (болезнь Альцгеймера и миастения Гравис) наблюдается усиление синтеза NO. Причем в случае миастении показано, что мышцы, отличающиеся повышенной продукцией NO, более устойчивы к симптомам заболевания (Garcia et al., 2003). Тонкая регуляция активности АХЭ может не только компенсировать снижение фактора надежности синаптической передачи при патологических процессах, но и преобразовать долговременную потенциацию в депрессию (Drever et al., 2011). Что более важно, в контексте данного исследования, эти эффекты зависят не только от типа и расположения рецепторов, но и от длительности действия агониста.

Несмотря на обилие разрозненных данных, свойства и функции NMDAR в нервно-мышечном синапсе позвоночных изучены недостаточно. В частности, остаются неизвестными эффективные дозы агонистов и коагонистов, рН- и потенциал-чувствительность NMDAR в нервно-мышечном окончании. Вклад транспортеров глутамата и глицина в ограничение

диффузии этих аминокислот в глубокие вторичные складки также остается невыясненным.

Таким образом, вполне возможно, что влияние NMDAR-опосредованной NO продукции на активность АХЭ *in vivo*, может быть более значительным, чем выявлено в этом исследовании. Это исследование представляет первое доказательство возможности тонкой и быстрой регуляции активности синаптической АХЭ эндогенным веществом. Однако, остается возможность существования альтернативных путей активации NO-синтазы (помимо пути, опосредованного активацией NMDAR) и наличия других эндогенных модуляторов активности АХЭ в нервно-мышечных синапсах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Традиционно, механизмы, лежащие в основе синаптической пластичности, включают в себя факторы, изменяющие число квантов медиатора, синхронность их секреции или чувствительность постсинаптических рецепторов к агонистам (Van der Kloot, Molgo, 1994; Glavinovic, 1995; Atwood, Karunanithi, 2002; Lin, Faber, 2002; Nikolsky et al., 2004; Taschenberger et al., 2005). Это исследование доказывает существование еще одного способа модуляции синаптической передачи через регуляцию продолжительности действия ацетилхолина в синаптической щели. Так как частичное ингибирование активности АХЭ действительно очень эффективный способ увеличения амплитуды синаптических ответов, возможно, что тонкая регуляция активности АХЭ осуществляется эндогенными агентами для компенсации снижения квантового состава (например, при синаптическом утомлении) или пониженной чувствительности постсинаптической мембраны (в условиях патологии).

Таким образом, в области нервно-мышечного контакта существует популяция NMDAR ко-локализованных с NO-синтазой, активация которой способна опосредованно ингибировать активность синаптической АХЭ. Это, вероятно, первое свидетельство о возможности модуляции активности синаптической АХЭ эндогенными ингибиторами и одно из немногих свидетельств, проливающих свет на возможные функции NMDA-рецепторов в нервно-мышечном синапсе.

Подводя итог, можно заключить, что молекулы оксида азота действительно способны ингибировать активность синаптической ацетилхолинэстеразы вне зависимости от их происхождения – экзогенного

(при применении доноров) или эндогенного (рис. 12). Одним из механизмов ингибирования синаптической АХЭ эндогенными молекулами NO является активация комплекса NMDA-рецептор/NO-синтаза, которая приводит либо к непосредственному усилению синтеза NO входящими ионами кальция, либо к отложенной во времени модуляции активности NO-синтазы посредством дефосфорилирования ее серин-треонин-протеин фосфатазами.

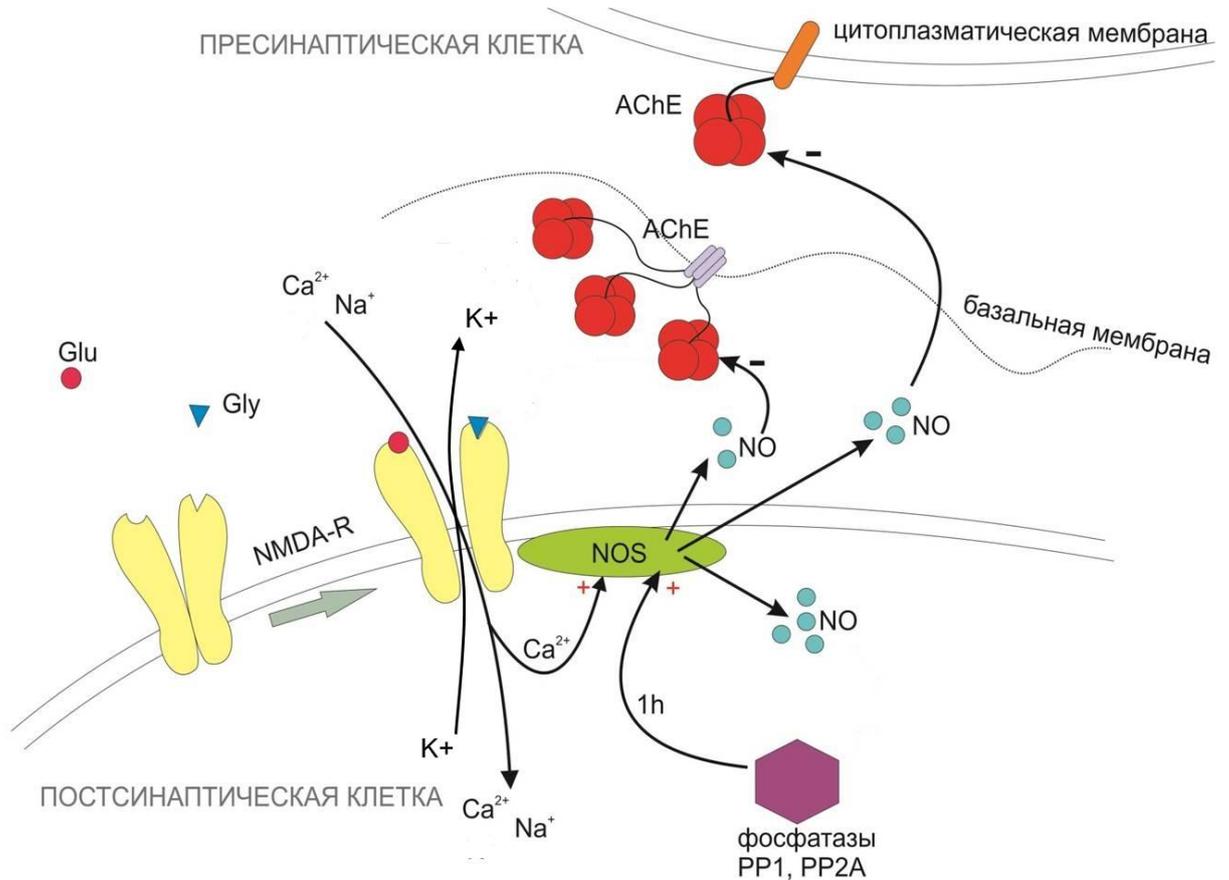


Рисунок 12 — Принципиальная схема метаболического пути эндогенного ингибирования АХЭ молекулами оксида азота в нервно-мышечном синапсе.

NMDAR, активируясь агонистами, становятся проницаемы для кальция, который, в свою очередь может либо непосредственно активировать NO-синтазу через взаимодействие с Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протеинкиназой, либо, опосредованно изменять активность этого фермента, активируя серин-треонин-протеин фосфатазы PP1 и PP2A. Они дефосфорилируют NO-синтазу, увеличивая ее активность. Выделяемый при этом оксид азота ингибирует активность синаптической ацетилхолинэстеразы, предположительно, S-нитрозилируя цистеиновые остатки фермента

ВЫВОДЫ

1. Донор оксида азота SNAP ингибирует активность ацетилхолинэстеразы гомогенатов мышцы длинный разгибатель пальцев (*m. extensor digitorum longus*) крысы.
2. SNAP доза-зависимым образом увеличивает амплитуду и постоянную времени спада миниатюрных токов концевой пластинки в синапсах мышцы *extensor digitorum longus* крысы. Данный эффект не связан с изменением размера кванта медиатора или чувствительности рецепторов постсинаптической мембраны к ацетилхолину, поскольку не наблюдается на фоне предварительного ингибирования ацетилхолинэстеразы параоксоном.
3. Акцептор оксида азота гемоглобин значительно снижает эффекты SNAP на амплитуду и длительность синаптических ответов, что свидетельствует об ингибировании синаптической ацетилхолинэстеразы молекулами NO, а не его донора.
4. Активация NMDA рецепторов экзогенными глутаматом и глицином приводит к изменениям амплитудно-временных параметров миниатюрных токов концевой пластинки, характерным для ингибирования синаптической ацетилхолинэстеразы. Данный эффект не развивается на фоне предварительного ингибирования ацетилхолинэстеразы и при ингибировании синтазы оксида азота.
5. В гомогенатах мышц, где нарушена связь NMDA-рецепторов и NO-синтазы, глутамат и глицин не оказывают влияния на активность ацетилхолинэстеразы.
6. Эффект активации NMDA-рецепторов экзогенными глутаматом и глицином, приводящий к ингибированию синаптической ацетилхолинэстеразы, начинает проявляться спустя 20 минут после аппликации агонистов и достигает максимума к 60 минуте.

7. Ингибирование фосфатаз типа PP1 и PP2A ооадаиковой кислотой блокирует эффект активации NMDA-рецепторов на амплитудно-временные характеристики миниатюрных токов концевой пластинки. Это свидетельствует об опосредовании задержанной активации NO-синтазы ее дефосфорилированием данными фосфатазами.
8. Эндогенный глутамат, выделяющийся при ритмической стимуляции двигательного нерва, способен снижать активность синаптической ацетилхолинэстеразы посредством активации комплекса «NMDA-рецептор – NO-синтаза».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Голиков, С. Н. Холинергическая регуляция биохимических систем клетки / С. Н. Голиков, В. Б. Долго-Сабуров, Н. Р. Елаев; и др. // М. : Медицина, 1985 . – С. 202-220
2. Меньшикова, Е. Б. Оксид азота и NO-синтаза в организме млекопитающих при различных функциональных состояниях / Е. Б. Меньшикова, Н. К. Зенков, В. П. Реутов // Биохимия. – 2000 – Т.65. Вып.4. – С. 485-503
3. Aarts, M. Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor- PSD-95 protein interactions / M. Aarts, Y. Liu, L. Liu, S. Besshoh, M. Arundine, J. W. Gurd, Y. T. Wang, M. W. Salter, M. Tymianski // Science. – 2002. – Vol. 298. – P. 846–850
4. Abu-Soud, H. M. Nitric oxide binding to the heme of neuronal nitric-oxide synthase links its activity to changes in oxygen tension / H. M. Abu-Soud, D. L. Rousseau, D. J. Stuehr // The Journal of Biological Chemistry. – 1996. – Vol. 271(51). – P. 32515-32518.
5. Akasu, T. Neuropeptides facilitate the desensitization of nicotinic acetylcholine-receptor in frog skeletal muscle endplate / T. Akasu, Y. Ohta, K. Koketsu // Brain Research. – 1984. – Vol. 290(2). – P. 342-347.
6. Allen, T. G. Simultaneous release of glutamate and acetylcholine from single magnocellular "cholinergic" basal forebrain neurons / T. G. Allen, F. C. Abogadie, D. A. Brown // The Journal of Neuroscience. - 2006. - Vol. 26(5). - P. 1588-1595.
7. Anderson, J. E. A role for nitric oxide in muscle repair: nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells / J. E. Anderson // Molecular Biology of the Cell – 2000. – Vol. 11(5). – P. 1859-1874.
8. Anderson, T. J. Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis / T. J. Anderson, M. D. Gerhard, I. T. Meredith, F. Charbonneau, D. Delagrang, M.

A. Creager, A. P. Selwyn, P. Ganz. // *American Journal of Cardiology*. – 1995. – Vol. 75(6). – P. 71B-74B. Review.

9. Anglister, L. Acetylcholinesterase density and turnover number at frog neuromuscular junctions, with modeling of their role in synaptic function / L. Anglister, J. R. Stiles, M. M. Salpeter // *Neuron*. – 1994. – Vol. 4. – P. 783-794.

10. Anglister, L. Acetylcholinesterase from the motor nerve terminal accumulates on the synaptic basal lamina of the myofiber / L. Anglister // *The Journal of Cell Biology*. – 1991. – Vol. 115(3). – P. 755-764.

11. Anson, L. C. Identification of amino acid residues of the NR2A subunit that control glutamate potency in recombinant NR1/NR2A NMDA receptors / L. C. Anson, P. E. Chen, D. J. Wyllie, D. Colquhoun, R. Schoepfer // *The Journal of Neuroscience*. – 1998. – Vol. 18(2). – P. 581-589.

12. Antořová, M. Study of the interaction of glutamatergic and nitrenergic signalling in conditions of the experimental airways hyperreactivity / M. Antořová, A. Strapková // *Pharmacological Reports*. – 2013. – Vol. 65(3). – P. 650-657.

13. Aoki, E. Nitric oxide: an attractive signaling molecule / E. Aoki, I. K. Takeuchi, R. Shoji // *Acta Histochemica et Cytochemica*. – 1995. – Vol. 28. – P. 97–106.

14. Aronowski, J., Interplay between the gamma isoform of PKC and calcineurin in regulation of vulnerability to focal cerebral ischemia / J. Aronowski, J. C. Grotta, R. Strong, M. N. Waxham // *Journal of cerebral blood flow and metabolism*. – 2000. – Vol. 20. – P. 343–349

15. Asai, A. High level calcineurin activity predisposes neuronal cells to apoptosis / A. Asai, J. Qiu, Y. Narita, S. Chi, N. Saito, N. Shinoura, H. Hamada, Y. Kuchino, T. Kirino // *The Journal of Biological Chemistry* – 1999. – Vol. 274. – P. 34450–34458

16. Ascher, P. The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture / P. Ascher, L. Nowak // *Journal of Physiology*. - 1988. - Vol. 399. - P. 247-266.
17. Atwood, H. L. Diversification of synaptic strength: presynaptic elements / H. L. Atwood, S. Karunanithi // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2002. – Vol. 3(7). – P. 497-516. Review.
18. Auld, D.S. Perisynaptic Schwann cells at the neuromuscular junction: nerve- and activity-dependent contributions to synaptic efficacy, plasticity, and reinnervation / D. S. Auld, R. Robitaille. // *Neuroscientist*. – 2003. – Vol. 9(2) – P. 144-157. Review.
19. Balon, T. W. Nitric oxide release is present from incubated skeletal muscle preparations / T. W. Balon, J. L. Nadler // *Journal of Applied Physiology* (1985). – 1994. – Vol. 77(6). – P. 2519-2521.
20. Barclay, J. K. Free radicals may contribute to oxidative skeletal muscle fatigue / J. K. Barclay, M. Hansel // *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. – 1991. - Vol. 69. – P. 279–284.
21. Bayer, K. U. Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation / K. U. Bayer, P. De Koninck, A. S. Leonard, J. W. Hell, H. Schulman // *Nature*. - 2001. – Vol. 411. – P. 801–805
22. Beckman, J. S. The double-edged role of nitric oxide in brain function and superoxide-mediated injury / J. S. Beckman // *Journal of Developmental Physiology*. - 1991. - Vol. 15(1). - P. 53-59.
23. Bendix, I. Inhibition of acetylcholinesterase modulates NMDA receptor antagonist mediated alterations in the developing brain / I. Bendix, M. Serdar, J. Herz, C. von Haefen, F. Nasser, B. Rohrer, S. Endesfelder, U. Felderhoff-Mueser, C. D. Spies, M. Sifringer // *International Journal of Molecular Science*. – 2014. – Vol. 15(3). – P. 3784-3798.

- 24.** Bernard, V. Distinct localization of collagen Q and PRiMA forms of acetylcholinesterase at the neuromuscular junction / V. Bernard, E. Girard, A. Hrabovska, S. Camp, P. Taylor, B. Plaud, E. Krejci // *Molecular and Cellular Neurosciences*. – 2011. – Vol. 46(1). – P. 272-281.
- 25.** Berridge, M. J. Inositol trisphosphate and calcium signaling / M. J. Berridge // *Nature*. – 1993. – Vol. 361. – P. 315—325.
- 26.** Bevan, S. The distribution of alpha-bungarotoxin binding sites of mammalian skeletal muscle developing in vivo / S. Bevan, J. H. Steinbach // *The Journal of Physiology*. – 1977. – Vol. 267(1). – P. 195-213.
- 27.** Blanke, M. L. Activation Mechanisms of the NMDA Receptor / M. L. Blanke, A. M. J. VanDongen // *Biology of the NMDA Receptor* / edited by A. M. Van Dongen, Boca Raton (FL): CRC Press, Taylor & Francis. - 2009. - Chapter 13.2. – P. 2.
- 28.** Biscoe, T. J. D-alpha-Aminoadipate as a selective antagonist of amino acid-induced and synaptic excitation of mammalian spinal neurons / T. J. Biscoe, R. H. Evans, A. A. Francis, M. R. Martin, J. C. Watkins, J. Davies, A. Dray // *Nature*. – 1977. – Vol. 270(5639). – P. 743-745.
- 29.** Black, S. M. Inhaled nitric oxide inhibits NOS activity in lambs: potential mechanism for rebound pulmonary hypertension / S. M. Black, R. S. Heidersbach, D. M. McMullan, J. M. Bekker, M. J. Johengen, J. R. Fineman // *The American Journal of Physiology*. – 1999. – Vol. 277. – P. 1849-1856.
- 30.** Bon, S. Asymmetric and globular forms of acetylcholinesterase in mammals and birds / S. Bon, M. Vigny, J. Massoulié. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1979. – Vol. 76(6). – P. 2546-2550.
- 31.** Boonyapisit, K. Disorders of neuromuscular junction ion channels / K. Boonyapisit, H. J. Kaminski, R. L. Ruff // *The American Journal of Medicine*. – 1999. – Vol. 106(1). – P. 97-113. Review.

- 32.** Borutaite, V. Rapid reduction of nitric oxide by mitochondria, and reversible inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide / V. Borutaite, G. C. Brown // *The Biochemical Journal* – 1996. – Vol. 315. – P. 295–299.
- 33.** Botti, S. A. A modular treatment of molecular traffic through the active site of cholinesterase / S. A. Botti, C. E. Felder, S. Lifson, J. L. Sussman, I. Silman // *Biophysical Journal*. – 1999. – Vol. 77(5). – P. 2430-2450.
- 34.** Boudier, J.L. Autoradiographic localization of voltage-dependent sodium channels on the mouse neuromuscular junction using ¹²⁵I-a scorpion toxin. II. Sodium channel distribution on postsynaptic membranes / J. L. Boudier, T. Le Treut, E. Jover. // *The Journal of Neuroscience*. – 1992. – Vol. 12. – P. 454-466.
- 35.** Boudreau-Larivière, C. Fast and slow skeletal muscles express a common basic profile of acetylcholinesterase molecular forms / C. Boudreau-Larivière, V. Gisiger, R. N. Michel, D. A. Hubatsch, B. J. Jasmin // *American Journal of Physiology*. – 1997. – Vol. 272(1 Pt 1). – P. 68-76.
- 36.** Boudreau-Lariviere, C. Myotubes originating from single fast and slow satellite cells display similar patterns of AChE expression / C. Boudreau-Lariviere, D. J. Parry, B. J. Jasmin // *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. - 2000. – Vol. 278. – P. 140–148
- 37.** Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford. // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.
- 38.** Brambilla, R. A role for the Ras signalling pathway in synaptic transmission and long-term memory / R. Brambilla, N. Gnesutta, L. Minichiello, G. White, A. J. Roylance, C. E. Herron, M. Ramsey, D. P. Wolfer, V. Cestari, C. Rossi-Arnaud, S. G. Grant, P. F. Chapman, H. P. Lipp, E. Sturani, R. Klein // *Nature*. – 1997. – Vol. 390(6657). – P. 281-286.

- 39.** Brecht, D. S. Molecular characterization of nitric oxide synthase / D. S. Brecht // *Nitric Oxide in the Nervous System* / edited by S. R. Vincent, Academic Press, San Diego – 1995. - P. 1—19.
- 40.** Brecht, D. S. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase / D. S. Brecht, P. M. Hwang, C. E. Glatt, C. Lowenstein, R. R. Reed, S. H. Snyder // *Nature*. - 1991. - Vol. 351(6329). - P. 714-718.
- 41.** Brecht, D. S. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme / D. S. Brecht, S. H. Snyder // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 1990. - Vol. 87(2). - P. 682-685.
- 42.** Brecht, D. S. Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites / D. S. Brecht, C. D. Ferris, S. H. Snyder // *The Journal of Biological Chemistry*. - 1992. – Vol. 267. – P. 10976–10981
- 43.** Brecht, D. S. Nitric oxide, a novel neuronal messenger / D. S. Brecht, S. H. Snyder // *Neuron*. – 1992. – Vol. 8(1). – P. 3-11. Review.
- 44.** Brenman, J. E. Cloning and characterization of postsynaptic density 93, a nitric oxide synthase interacting protein / J. E. Brenman, K. S. Christopherson, S. E. Craven, A. W. McGee, D. S. Brecht // *The Journal of Neuroscience*. – 1996. – Vol. 16(23). – P. 7407-7415.
- 45.** Brockman, S. K. Effect of fibrillation on the secretion of acetylcholinesterase from cultured embryonic rat myotubes / S. K. Brockman, S. G. Younkin // *Brain Research*. - 1986. - Vol. 376(2). - P. 409-411.
- 46.** Brown, G. P. Long-term potentiation induced by theta frequency stimulation is regulated by a protein phosphatase-1-operated gate / G. P. Brown, R. D. Blitzer, J. H. Connor, T. Wong, S. Shenolikar, R. Iyengar, E. M. Landau // *The Journal of Neuroscience*. - 2000. – Vol. 20. – P. 7880–7887

- 47.** Bruckdorfer, R. The basics about nitric oxide / R. Bruckdorfer // *Molecular Aspects of Medicine*. – 2005. – Vol. 26(1-2). – P. 3-31. Review.
- 48.** Bukcharaeva, E. A. Noradrenaline synchronizes evoked quantal release at frog neuromuscular junctions / E. A. Bukcharaeva, K. C. Kim, J. Moravec, E. E. Nikolsky, F. Vyskocil // *The Journal of Physiology*. – 1999. – Vol. 517 (Pt 3). – P. 879-888.
- 49.** Bunge, R. P. The role of the Schwann cell in trophic support and regeneration / R. P. Bunge // *Journal of Neurology*. – 1994. – Vol. 242. – P. 19-21. Review.
- 50.** Buono, R. Nitric oxide sustains long-term skeletal muscle regeneration by regulating fate of satellite cells via signaling pathways requiring Vangl2 and cyclic GMP / R. Buono, C. Vantaggiato, V. Pisa, E. Azzoni, M. T. Bassi, S. Brunelli, C. Sciorati, E. Clementi // *Stem Cells*. – 2012. – Vol. 30(2). – P. 197-209.
- 51.** Bymaster, F. P. Xanomeline: a selective muscarinic agonist for the treatment of Alzheimer's disease / F. P. Bymaster, C. A. Whitesitt, H. E. Shannon, N. DeLapp, J. S. Ward, D. O. Calligaro, L. A. Shipley, J. L. Buelke-Sam, N. C. Bodick, L. Farde, M. J. Sheardown, P. H. Olesen, K. T. Hansen, P. D. Suzdak, M. D. Swedberg, P. Sauerberg, C. H. Mitch // *Drug Development Research*. – 1997. – Vol. 40. – P. 158—170.
- 52.** Caulfield, M. P. Muscarinic receptors—characterization, coupling and function / M. P. Caulfield // *Pharmacology and Therapeutics*. – 1993. – Vol. 58. – P. 319—379.
- 53.** Chao, D. S. Nitric oxide synthase and cyclic GMP-dependent protein kinase concentrated at the neuromuscular endplate / D. S. Chao, F. Silvagno, H. Xia, T. L. Cornwell, T. M. Lincoln, D. S. Bredt // *Neuroscience*. – 1997. – Vol. 76. – P. 665–672.
- 54.** Chatterton, J. E. Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits / J. E. Chatterton, M. Awobuluyi, L. S. Premkumar, H.

Takahashi, M. Talantova, Y. Shin, J. Cui, S. Tu, K. A. Sevarino, N. Nakanishi, G. Tong, S. A. Lipton, D. Zhang // *Nature*. – 2002. – Vol. 415(6873). – P. 793-798.

55. Cheng, Q. Activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors increases intracellular cAMP levels via activation of AC1 in hippocampal neurons / Q. Cheng, J. L. Yakel // *Neuropharmacology*. – 2015. – Vol. 95. – P. 405-414.

56. Chiu, A. Y. Development of basal lamina in synaptic and extrasynaptic portions of embryonic rat muscle / A. Y. Chiu, J. R. Sanes // *Developmental Biology*. – 1984. – Vol. 103(2). – P. 456-467.

57. Choi, R. C. Y. Expression of the P2Y1 nucleotide receptor in chick muscle: its functional role in the regulation of acetylcholinesterase and acetylcholine receptor / R. C. Choi, M. L. S. Man, K. K. Y. Ling, N. Y. Ip, J. Simon, E. A. Barnard, K. W. K. Tsim // *The Journal of Neuroscience*. -2001. –Vol. 21. – P. 9224–923430.

58. Cohen-Cory, S. The developing synapse: construction and modulation of synaptic structures and circuits / S. Cohen-Cory // *Science*. – 2002. – Vol. 298(5594). – P. 770-776. Review.

59. Collins, P. L. Effect of denervation on the molecular forms of acetylcholinesterase in rat diaphragm / P. L. Collins, S. G. Younkin // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1982. – Vol. 257(22). – P. 13638-13644.

60. Connor, J. A. Sustained dendritic gradients of Ca^{2+} induced by excitatory amino acids in CA1 hippocampal neurons / J. A. Connor, W. J. Wadman, P. E. Hockberger, R. K. Wong // *Science*. – 1988. – Vol. 240. – P. 649–653

61. Corrêa, M. de C. Oxidative stress and erythrocyte acetylcholinesterase (AChE) in hypertensive and ischemic patients of both acute and chronic stages / M. De C. Corrêa, P. Maldonado, C. S. da Rosa, G. Lunkes, D. S. Lunkes, R. R. Kaizer, M. Ahmed, V. M. Morsch, M. E. Pereira, M. R. Schetinger // *Biomedicine and Pharmacotherapy*. - 2008. - Vol. 62(5). - P. 317-324.

62. Coyle, J. T. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders / J. T. Coyle, P. Puttfarcken // *Science*. - 1993. - Vol. 262(5134). - P. 689-695.

- 63.** Craig, D. H. Calmodulin activates electron transfer through neuronal nitric-oxide synthase reductase domain by releasing an NADPH-dependent conformational lock / D. H. Craig, S. K. Chapman, S. Daff // *The Journal of Biological Chemistry*. - 2002. - Vol. 277(37). - P. 33987-33994.
- 64.** Cresnar, B. Neural regulation of muscle acetylcholinesterase is exerted on the level of its mRNA / B. Cresnar, N. Crne-Finderle, K. Breskvar, J. Sketelj // *Journal of Neuroscience Research*. – 1994. – Vol. 38(3). – P. 294-299.
- 65.** Crockett, J. L. Exercise and restricted activity effects on reinnervated and cross-innervated skeletal muscles / J. L. Crockett, V. R. Edgerton // *Journal of Neurological Sciences*. – 1975. – Vol. 25(1). – P. 1-9.
- 66.** Crossin, K. L. Nitric oxide (NO): a versatile second messenger in brain / K. L. Crossin // *Trends in Biochemical Sciences*. - 1991. - Vol. 16(3). - P. 81-82.
- 67.** Cummings, J. A. Ca²⁺ signaling requirements for long-term depression in the hippocampus / J. A. Cummings, R. M. Mulkey, R. A. Nicoll, R. C. Malenka // *Neuron*. – 1996. – Vol. 16. – P. 825–833
- 68.** Davies, J. Actions of D and L forms of 2-amino-5-phosphonovalerate and 2-amino-4-phosphonobutyrate in the cat spinal cord / J. Davies, J. C. Watkins // *Brain Research*. – 1982. – Vol. 235(2). – P. 378-386.
- 69.** Davis, R. Electron microscopic localization of acetylcholinesterase and nonspecific cholinesterase at the neuromuscular junction by the gold-thiocholine and gold-thiolacetic acid methods / R. Davis, G. B. Koelle // *The Journal of Cell Biology*. – 1967. – Vol. 34. – P. 157–171.
- 70.** De La Porte, S. Accumulation of acetylcholine receptors is a necessary condition for normal accumulation of acetylcholinesterase during in vitro neuromuscular synaptogenesis / S. De La Porte, E. Chaubourt, F. Fabre, K. Poulas, J. Chapron, B. Eymard, S. Tzartos, J. Koenig // *European Journal of Neuroscience*. - 1998. - Vol. 10(5). - P. 1631-1643.
- 71.** De La Porte, S. Presynaptic or postsynaptic origin of acetylcholinesterase at neuromuscular junctions? An immunological study in heterologous nerve-muscle

cultures / S. De La Porte, F. M. Vallette, J. Grassi, M. Vigny, J. Koenig // *Developmental Biology*. – 1986. – Vol. 116(1). – P. 69-77.

72. De Robertis, E. D. Some features of the submicroscopic morphology of synapses in frog and earthworm / E. D. De Robertis, H. S. Bennett // *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*. – 1955. – Vol. 1(1). – P. 47-58.

73. Deisseroth, K. Signaling from synapse to nucleus: the logic behind the mechanisms / K. Deisseroth, P. G. Mermelstein, H. Xia, R. W. Tsien // *Current Opinion in Neurobiology*. – 2003. – Vol. 13(3). – P. 354-365. Review.

74. Del Castillo, J. Localization of active spots within the neuromuscular junction of the frog / J. Del Castillo, B. Katz // *The Journal of Physiology*. – 1956. – Vol. 132(3). – P. 630-649.

75. Delwing, D. Proline reduces acetylcholinesterase activity in cerebral cortex of rats / D. Delwing, F. Chiarani, D. Delwing, C. S. Bavaresco, C. M Wannmacher, M. Wajner, A. T. Wyse // *Metabolic Brain Disease*. – 2003. – Vol. 18(1). – P. 79-86.

76. Desaulniers, P. Endurance training increases acetylcholine receptor quantity at neuromuscular junctions of adult rat skeletal muscle / P. Desaulniers, P. A. Lavoie, P. F. Gardiner // *Neuroreport*. – 1998. – Vol. 9(16). – P. 3549-3552.

77. Descarries, L. M. Localization and characterization of nitric oxide synthase at the frog neuromuscular junction / L. M. Descarries, S. Cai, R. Robitaille, E. M. Josephson, D. K. Morest // *Journal of Neurocytology*. - 1998. - Vol. 27(11). - P. 829-840.

78. Deschênes-Furry, J. The RNA-binding protein HuR binds to acetylcholinesterase transcripts and regulates their expression in differentiating skeletal muscle cells / J. Deschênes-Furry, G. Bélanger, J. Mwanjewe, J. A. Lunde, R. J. Parks, N. Perrone-Bizzozero, B. J. Jasmin // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280(27). – P. 25361-25368.

- 79.** Drever, B. D. The cholinergic system and hippocampal plasticity / B. D. Drever, G. Riedel, B. Platt // *Behavioural Brain Research*. – 2011. – Vol. 221(2). – P. 505-514. Review.
- 80.** Edmonds, B. Mechanisms of activation of glutamate receptors and the time course of excitatory synaptic currents / B. Edmonds, A. J. Gibb, D. Colquhoun // *Annual Review of Physiology*. – 1995. – Vol. 57. – P. 495-519. Review.
- 81.** Ellman, G. L. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity / G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres Jr, R. M. Feather-Stone // *Biochemical Pharmacology*. – 1961. – Vol. 7. – P. 88-95.
- 82.** Engel, A. G. Current status of the congenital myasthenic syndromes / A. G. Engel // *Neuromuscular Disorders*. – 2012. – Vol. 22(2). – P. 99-111. Review.
- 83.** Engel, A. G. The therapy of congenital myasthenic syndromes / A. G. Engel // *Neurotherapeutics*. – 2007. – Vol. 4(2). – P. 252-257. Review.
- 84.** Erwin, P. A. Receptor-regulated dynamic S-nitrosylation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells / P. A. Erwin, A. J. Lin, D. E. Golan, T. J. Michel // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280(20). – P. 19888-19894.
- 85.** Fatt, P. The electric activity of the motor end-plate / P. Fatt, B. Katz // *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. – 1952. – Vol. 140(899). – P. 183-186.
- 86.** Felder C. C. Tumor-suppressor function of muscarinic acetylcholine receptors is associated with activation of receptor-operated calcium influx / C. C. Felder, L. MacArthur, A. L. Ma, F. Gusovsky, E. C. Kohn // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1993. – Vol. 90. – P. 1706—1710.
- 87.** Fernandez, H. L. Denervation induced changes in subcellular pools of 16S acetylcholinesterase activity from adult mammalian skeletal muscle / H. L. Fernandez, J. R. Stiles // *Neuroscience Letters*. – 1984. – Vol. 44. – P. 187–192

- 88.** Fernandez, H. L. Exercise selectively increases G4 AChE activity in fast-twitch muscle / H. L. Fernandez, J. A. Donoso // *Journal of Applied Physiology* (1985). – 1988. – Vol. 65(5). – P. 2245-2252
- 89.** Fernandez, H. L. Trophic regulation of acetylcholinesterase isoenzymes in adult mammalian skeletal muscles / H. L. Fernandez, C. A. Hodges-Savola // *Neurochemical Research*. – 1992. – Vol. 17(1). – P. 115-124.
- 90.** Fernandez-Valle, C. Regulation of acetylcholinesterase synthesis and assembly by muscle activity. Effects of tetrodotoxin / C. Fernandez-Valle, R. L. Rotundo // *The Journal of Biological Chemistry*. - 1989. - Vol. 264(24). - P. 14043-49.
- 91.** Flucher, B. E. Distribution of Na⁺ channels and ankyrin in neuromuscular junctions is complementary to that of acetylcholine receptors and the 43 kd protein / B. E. Flucher, M. P. Daniels // *Neuron*. – 1989. – Vol. 3(2). – P. 163-175.
- 92.** Forsgren, S. Bilateral irradiation of head and neck induces an enhanced expression of substance P in the parasympathetic innervation of the submandibular gland / S. Forsgren, L. Franzén, U. Funegård, H. Gustafsson, R. Henriksson // *Neuroscience*. – 1992. – Vol. 46(1). – P. 233-240.
- 93.** Frahm, S. An essential role of acetylcholine-glutamate synergy at habenular synapses in nicotine dependence / S. Frahm, B. Antolin-Fontes, A. Görlich, J. F. Zander, G. Ahnert-Hilger, I. Ibañez-Tallon // *Elife*. – 2015. – Vol. 4. – P. 1-31
- 94.** Franks, K. M. Complexity of calcium signaling in synaptic spines / K. M. Franks, T. J. Sejnowski // *Bioessays*. - 2002. – Vol. 24. – P. 1130–1144
- 95.** Freeman, B. Free radical chemistry of nitric oxide. Looking at the dark side / B. Freeman // *Chest*. – 1994. – Vol. 105(3 Suppl). – P. 79-84. Review.
- 96.** Froehner, S. C. Immunofluorescence localization at the mammalian neuromuscular junction of the Mr 43,000 protein of *Torpedo* postsynaptic membranes / S. C. Froehner, V. Gulbrandsen, C. Hyman, A. Y. Jeng, R. R. Neubig,

J. B. Cohen // *Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America*. - 1981. – Vol. 78(8). – P. 5230-5234.

97. Fu, W. M. Potentiation of neurotransmitter release by activation of presynaptic glutamate receptors at developing neuromuscular synapses of *Xenopus* / W. M. Fu, J. C. Liou, Y. H. Lee, H. C. Liou // *The Journal of Physiology*. – 1995. – Vol. 489 (Pt 3). – P. 813-823.

98. Fu, W. M. Release of acetylcholine from embryonic myocytes in *Xenopus* cell cultures / W. M. Fu, H. C. Liou, Y. H. Chen, S. M. Wang // *The Journal of Physiology*. – 1998. – Vol. 509 (Pt 2). – P. 497-506.

99. Garcia, Y. R. Myocyte production of nitric oxide in response to AChR-reactive antibodies in two inbred rat strains may influence disease outcome in experimental myasthenia gravis / Y. R. Garcia, J. C. Pothitakis, K. A. Krolick // *Clinical Immunology*. – 2003. – Vol. 106(2). – P. 116-126.

100. Garthwaite, J. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain / J. Garthwaite, S. L. Charles, R. Chess-Williams // *Nature*. – 1988. – Vol. 336(6197). – P. 385-388.

101. Garthwaite, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system / J. Garthwaite // *Trends in Neurosciences*. - 1991. - Vol. 14(2). - P. 60-67.

102. Garthwaite, J. Nitric oxide signaling in the central nervous system / J. Garthwaite, C. L. Boulton // *Annual Review of Physiology*. – 1995. – Vol. 57. – P. 683-706. Review.

103. Gergel', D. Interaction of nitric oxide with 2-thio-5-nitrobenzoic acid: implications for the determination of free sulfhydryl groups by Ellman's reagent / D. Gergel', A. I. Cederbaum // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. - 1997. - Vol. 347(2). - P. 282-288.

- 104.** Gisiger, V. Localization of the pool of G4 acetylcholinesterase characterizing fast muscles and its alteration in murine muscular dystrophy / V. Gisiger, H. R. Stephens // *Journal of Neuroscience Research*. – 1988. – Vol. 19. – P. 62–78.
- 105.** Glavinovic, M. I. Decrease of quantal size and quantal content during tetanic stimulation detected by focal recording / M. I. Glavinovic // *Neuroscience*. – 1995. – Vol. 69(1). – P. 271-281.
- 106.** Gnegy, M. E. Ca²⁺/calmodulin signaling in NMDA-induced synaptic plasticity. / M. E. Gnegy // *Critical Reviews in Neurobiology*. – 2000. – Vol. 14(2). – P. 91-129. Review.
- 107.** Gomes, F. C. Cross-talk between neurons and glia: highlights on soluble factors / F. C. Gomes, T. C. Spohr, R. Martinez, V. Moura Neto // *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. – 2001. – Vol. 34(5). – P. 611-620. Review.
- 108.** Grifman, M. In vitro phosphorylation of acetylcholinesterase at non-consensus protein kinase A sites enhances the rate of acetylcholine hydrolysis. / M. Grifman, A. Arbel, D. Ginzberg, D. Glick, S. Elgavish, B. Shaanan, H. Soreq // *Brain Research. Molecular Brain Research*. – 1997. – Vol. 51(1-2). – P. 179-187.
- 109.** Gritti, I. Stereological estimates of the basal forebrain cell population in the rat, including neurons containing choline acetyltransferase, glutamic acid decarboxylase or phosphate-activated glutaminase and colocalizing vesicular glutamate transporters / I. Gritti, P. Henny, F. Galloni, L. Mainville, M. Mariotti, B. E. Jones // *Neuroscience*. - 2006. - Vol. 143(4). - P. 1051-1064.
- 110.** Grozdanovic, Z. Co-localization of nitric oxide synthase I (NOS I) and NMDA receptor subunit 1 (NMDAR-1) at the neuromuscular junction in rat and mouse skeletal muscle / Z. Grozdanovic, R. Gossrau. // *Cell and Tissue Research*. – 1998. – Vol. 291. – P. 57–63.
- 111.** Grozdanovic, Z. Nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: a signaling component of the dystrophin-glycoprotein complex / Z. Grozdanovic, H. G. Baumgarten // *Histology and Histopathology*. – 1999. – Vol. 14(1). – P. 243-256.

- 112.** Hall, Z. W. Multiple forms of acetylcholinesterase and their distribution in endplate and non-endplate regions of rat diaphragm muscle / Z. W. Hall // *Journal of Neurobiology*. – 1973. – Vol. 4(4). – P. 343-361.
- 113.** Hardingham, G. E. The Yin and Yang of NMDA receptor signaling / G. E. Hardingham, H. Bading // *Trends in Neurosciences*. – 2003. – Vol. 26. – P. 81–89
- 114.** Hasegawa, Y. Neuroprotective effect of postischemic administration of sodium orthovanadate in rats with transient middle cerebral artery occlusion / Y. Hasegawa, J. Hamada, M. Morioka, S. Yano, T. Kawano, Y. Kai, K. Fukunaga, Y. Ushio // *Journal of cerebral blood flow and metabolism*. – 2003. – Vol. 23. – P. 1040–1051
- 115.** Hausladen, A. Nitrosative stress / A. Hausladen, J. S. Stamler // *Methods in Enzymology*. – 1999. – Vol. 300. – P. 389–395.
- 116.** Hayashi, Y. Regulation of neuronal nitric-oxide synthase by calmodulin kinases / Y. Hayashi, M. Nishio, Y. Naito, H. Yokokura, Y. Nimura, H. Hidaka, Y. Watanabe // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – Vol. 274. – P. 20597–20602
- 117.** Haynes, L. W. Evidence for the neurotrophic regulation of collagen-tailed acetylcholinesterase in immature skeletal muscle by beta-endorphin / L. W. Haynes, M. E. Smith, D. G. Smyth // *Journal of Neurochemistry*. – 1984. – Vol. 42(6). – P. 1542-1551.
- 118.** Hendgen-Cotta, U. B. Nitrite reductase activity of myoglobin regulates respiration and cellular viability in myocardial ischemia-reperfusion injury / U. B. Hendgen-Cotta, M. W. Merx, S. Shiva, J. Schmitz, S. Becher, J. P. Klare, H. J. Steinhoff, A. Goedecke, J. Schrader, M. T. Gladwin, M. Kelm, T. Rassaf // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2008. – Vol. 105(29). – P. 10256-10261.
- 119.** Henny, P. Projections from basal forebrain to prefrontal cortex comprise cholinergic, GABAergic and glutamatergic inputs to pyramidal cells or interneurons

/ P. Henny, B. E. Jones // *European Journal of Neuroscience*. - 2008. - Vol. 27(3). - P. 654-670.

120. Hermann, A. Nitric oxide activates voltage-dependent potassium currents of crustacean skeletal muscle / A. Hermann, C. Erxleben // *Nitric Oxide*. – 2001. – Vol. 5(4). – P. 361-369.

121. Hess, D. T. Protein S-nitrosylation: purview and parameters / D. T. Hess, A. Matsumoto, S. O. Kim, H. E. Marshall, J. S. Stamler // *Nature reviews. Molecular cell biology*. – 2005. – Vol. 6(2). – P. 150-166.

122. Hirai, H. The glycine binding site of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1: identification of novel determinants of co-agonist potentiation in the extracellular M3-M4 loop region / H. Hirai, J. Kirsch, B. Laube, H. Betz, J. Kuhse // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1996. – Vol. 93(12). – P. 6031-6036.

123. Hofmann, F. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases / F. Hofmann, A. Ammendola, J. Schlossmann // *Journal of Cell Science*. – 2000. – Vol. 113 (Pt 10). – P. 1671-1676.

124. Hogg, R. C. Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function / R. C. Hogg, M. Raggenbass, D. Bertrand // *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. – 2003. – Vol. 147. – P. 1-46. Review.

125. Hu, J. Intricate regulation of nitric oxide synthesis in neurons / J. Hu, E. E. el-Fakahany // *Cellular Signalling*. - 1996. - Vol. 8(3). - P. 185-189.

126. Hu, J. Role of intercellular and intracellular communication by nitric oxide in coupling of muscarinic receptors to activation of guanylate cyclase in neuronal cells / J. Hu, E. E. El-Fakahany // *Journal of Neurochemistry*. – 1993. – Vol. 61. – P. 578—585.

127. Huang, Y. H. Glutamate transporters bring competition to the synapse / Y. H. Huang, D. E. Bergles // *Current Opinion in Neurobiology*. – 2004. – Vol. 14(3). – P. 346-352.

- 128.** Huganir, R. L. Protein phosphorylation of nicotinic acetylcholine receptors / R. L. Huganir, K. Miles // *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. – 1989. – Vol. 24. – P. 183–215.
- 129.** Hulme, E. C. Muscarinic receptor subtypes / E. C. Hulme, N. J. Birdsall, N. J. Buckley // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. – 1990. – Vol. 30. – P. 633-673
- 130.** Hurshman, A. R. Nitric oxide complexes of inducible nitric oxide synthase: spectral characterization and effect on catalytic activity / A. R. Hurshman, M. A. Marletta // *Biochemistry*. – 1995. – Vol. 34(16). – P. 5627-5634.
- 131.** Husi, H. Isolation of 2000-kDa complexes of N-methyl-D-aspartate receptor and postsynaptic density 95 from mouse brain / H. Husi, S. G. Grant // *Journal of Neurochemistry*. – 2001. – Vol. 77(1). – P. 281-291.
- 132.** Husi, H. Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes / H. Husi, M. A. Ward, J. S. Choudhary, W. P. Blackstock, S. G. Grant // *Nature Neuroscience*. – 2000. – Vol. 3(7). – P. 661-669.
- 133.** Ichinose, T. Ca²⁺-independent, but voltage- and activity-dependent regulation of the NMDA receptor outward K⁺ current in mouse cortical neurons / T. Ichinose, S. Yu, X. Q. Wang, S. P. Yu // *The Journal of Physiology*. – 2003. – Vol. 551(Pt 2). – P. 403-417.
- 134.** Ishibashi, M. Nicotinic and muscarinic agonists and acetylcholinesterase inhibitors stimulate a common pathway to enhance GluN2B-NMDAR responses / M. Ishibashi, Y. Yamazaki, R. Milei, K. Sumikawa // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2014. – Vol. 111(34). – P. 12538-12543.
- 135.** Israel, M. Glutamate and acetylcholine release from cholinergic nerve terminals, a calcium control of the specificity of the release mechanism / M. Israël, B. Lesbats, J. Bruner // *Neurochemistry International*. – 1993. – Vol. 22(1). – P. 53-58.

- 136.** Jahr, C. E. Glutamate activates multiple single channel conductances in hippocampal neurons / C. E. Jahr, C. F. Stevens // *Nature*. – 1987. – Vol. 325(6104). – P. 522-525.
- 137.** Jiang, J. X. Muscle induces neuronal expression of acetylcholinesterase in neuron-muscle co-culture: transcriptional regulation mediated by cAMP-dependent signaling / J. X. Jiang, R. C. Choi, N. L. Siow, H. H. Lee, D. C. Wan, K. W. Tsim // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278(46). – P. 45435-45444.
- 138.** Kalb, R. G. Molecular evidence for nitric oxide-mediated motor neuron development / R. G. Kalb, J. Agostini // *Neuroscience*. - 1993. - Vol. 57(1). - P. 1-8.
- 139.** Kang, Y. C. Regulation of programmed cell death in neuronal cells by nitric oxide / Y. C. Kang, P. K. Kim, B. M. Choi, H. T. Chung, K. S. Ha, Y. G. Kwon, Y. M. Kim // *In Vivo*. – 2004. – Vol. 18(3). – P. 367-376.
- 140.** Kang-Park, M. H. Protein phosphatases mediate depotentiation induced by high-intensity theta-burst stimulation / M. H. Kang-Park, M. A. Sarda, K. H. Jones, S. D. Moore, S. Shenolikar, S. Clark, W. A. Wilson // *Journal of Neurophysiology* – 2003. – Vol. 89. – P. 684–690
- 141.** Karlin, A. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors / A. Karlin // *Nature Reviews. Neuroscience*. – 2002. – Vol. 3(2). – P. 102-114. Review.
- 142.** Katsuki, S. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine / S. Katsuki, W. Arnold, C. Mittal, F. Murad // *Journal of Cyclic Nucleotide Research*. – 1977. – Vol. 3. – P. 23–35.
- 143.** Katz, B. Estimates of quantal content during “chemical potentiation” of transmitter release / B. Katz, R. Miledi // *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. – 1979. – Vol. 205(1160). – P. 369-378.
- 144.** Katz, B. The binding of acetylcholine to receptors and its removal from the synaptic cleft / B. Katz, R. Miledi // *The Journal of Physiology*. – 1973. – Vol. 231(3). – P. 549-574.

- 145.** Kaupp, U. B. The cyclic nucleotide-gated channels of vertebrate photoreceptors and olfactory epithelium / U. B. Kaupp // *Trends in Neurosciences*. - 1991. - Vol. 14(4). - P. 150-157.
- 146.** Kennedy, M. B. Signal-processing machines at the postsynaptic density / M. B. Kennedy // *Science*. – 2000. – Vol. 290(5492). – P. 750-754.
- 147.** Kim, H. G. Neuregulin 1 as an endogenous regulator of nicotinic acetylcholine receptors in adult major pelvic ganglion neurons / H. G. Kim, S. M. Cho, C. K. Lee, S. W. Jeong // *Biochemical and Biophysical Research Communication*. – 2015. – Vol. 463(4). – P. 632-637.
- 148.** Klebl, B. M. Protein oxidation, tyrosine nitration, and inactivation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in low-frequency stimulated rabbit muscle / B. M. Klebl, A. T. Ayoub, D. Pette // *FEBS Letters*. – 1998. – Vol. 422. – P. 381–384.
- 149.** Knowles, R. G. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase / R. G. Knowles, M. Palacios, R. M. Palmer, S. Moncada // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 1989. - Vol. 86(13). - P. 5159-5162.
- 150.** Kobzik, L. Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships / L. Kobzik, B. Stringer, J. L. Balligand, M. B. Reid, J. S. Stamler // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1995. – Vol. 211. - P 375–381.
- 151.** Kobzik, L. Nitric oxide in skeletal muscle / L. Kobzik, M. B. Reid, D. S. Brecht, J. S. Stamler // *Nature*. – 1994. – Vol. 372. – P. 546–548.
- 152.** Koelle, G. B. Selective, near-total, irreversible inactivation of peripheral pseudocholinesterase and acetylcholinesterase in cats in vivo / G. B. Koelle, R. Davis, E. J. Diliberto Jr, W. A. Koelle. // *Biochemical Pharmacology*. – 1974. – Vol. 23(2). – P. 175-188.

- 153.** Kohr, M. J. S-nitrosylation of TRIM72 at cysteine 144 is critical for protection against oxidation-induced protein degradation and cell death / M. J. Kohr, A. M. Evangelista, M. Ferlito, C. Steenbergen, E. Murphy // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2014. – Vol. 69. – P. 67-74.
- 154.** Koirala, S. Roles of glial cells in the formation, function, and maintenance of the neuromuscular junction / S. Koirala, L. V. Reddy, C. P. Ko // *Journal of Neurocytology*. – 2003. – Vol. 32(5-8). – P. 987-1002. Review.
- 155.** Kolb, H. Nitric oxide in autoimmune disease: cytotoxic or regulatory mediator? / H. Kolb, V. Kolb-Bachofen // *Immunology Today*. – 1998. – Vol. 19(12). – P. 556-561.
- 156.** Komeima, K. Inhibition of neuronal nitric-oxide synthase by calcium// calmodulin-dependent protein kinase IIalpha through Ser847 phosphorylation in NG108-15 neuronal cells / K. Komeima, Y. Hayashi, Y. Naito, Y. Watanabe // *The Journal of Biological Chemistry*. - 2000. - Vol. 275(36). - P. 28139-28143.
- 157.** Kovyazina, I. V. Kinetics of acetylcholine quanta release at the neuromuscular junction during high-frequency nerve stimulation / I. V. Kovyazina, A. N. Tsentssevitsky, E. E. Nikolsky, E. A. Bukharaeva // *European Journal of Neuroscience*. - 2010. - Vol. 32(9). - P. 1480-1489.
- 158.** Krejci, E. Primary structure of a collagenic tail peptide of Torpedo acetylcholinesterase: co-expression with catalytic subunit induces the production of collagen-tailed forms in transfected cells / E. Krejci, F. Coussen, N. Duval, J. M. Chatel, C. Legay, M. Puype, J. Vandekerckhove, J. Cartaud, S. Bon, J. Massoulié // *The EMBO Journal*. – 1991. – Vol. 10(5). – P. 1285-1293.
- 159.** Krejci, E. The mammalian gene of acetylcholinesterase-associated collagen / E. Krejci, S. Thomine, N. Boschetti, C. Legay, J. Sketelj, J. Massoulié // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1997. – Vol. 272(36). – P. 22840-22847.
- 160.** Kummer, T. T. Assembly of the postsynaptic membrane at the neuromuscular junction: paradigm lost / T. T. Kummer, T. Misgeld, J. R. Sanes // *Current Opinion in Neurobiology*. – 2006. – Vol. 16(1). – P. 74-82. Review.

- 161.** Kuner, T. A common architecture for K⁺ channels and ionotropic glutamate receptors? / T. Kuner, P. H. Seeburg, H. R. Guy // *Trends in Neurosciences*. – 2003. – Vol. 26(1). – P. 27-32. Review.
- 162.** Kuo, P. C. The emerging multifaceted roles of nitric oxide / P. C. Kuo, R. A. Schroeder // *Annals of Surgery*. – 1995. – Vol. 221. – P. 220—235.
- 163.** Kuryatov, A. Mutational analysis of the glycine-binding site of the NMDA receptor: structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins / A. Kuryatov, B. Laube, H. Betz, J. Kuhse // *Neuron*. – 1994. – Vol. 12(6). – P. 1291-1300.
- 164.** Kusner, L. L. Nitric oxide synthase is concentrated at the skeletal muscle endplate / L. L. Kusner, H. J. Kaminski // *Brain Research*. – 1996. – Vol. 730(1-2). – P. 238-242.
- 165.** Lai, J. Neural control of the forms of acetylcholinesterase in slow mammalian muscles / J. Lai, J. Jedrzejczyk, J. A. Pizzey, D. Green, E. A. Barnard // *Nature*. – 1986. – Vol. 321. – P. 72–74
- 166.** Land, B. R. Diffusion and binding constants for acetylcholine derived from the falling phase of miniature endplate currents / B. R. Land, W. V. Harris, E. E. Salpeter, M. M. Salpeter // *Proceedings of National Academy Science of the United Sciences of America*. – 1984. – Vol. 81(5). – P. 1594-1598.
- 167.** Lane, P. The autoinhibitory control element and calmodulin conspire to provide physiological modulation of endothelial and neuronal nitric oxide synthase activity / P. Lane, S. S. Gross // *Acta Physiologica Scandinavica*. – 2000. – Vol. 168(1). – P. 53-63.
- 168.** Lau, K. S. Skeletal muscle contractions stimulate cGMP formation and attenuate vascular smooth muscle myosin phosphorylation via nitric oxide / K. S. Lau, R. W. Grange, W. J. Chang, K. E. Kamm, I. Sarelius, J. T. Stull // *FEBS Letters*. – 1998. – Vol. 431. – P. 71–74.

- 169.** Laube, B. Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors / B. Laube, J. Kuhse, H. Betz // *The Journal of Neuroscience*. – 1998. – Vol. 18(8). – P. 2954-2961.
- 170.** Laube, B. Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit / B. Laube, H. Hirai, M. Sturgess, H. Betz, J. Kuhse // *Neuron*. – 1997. – Vol. 18(3). – P. 493-503.
- 171.** Lee, H. H. Transcriptional regulation of acetylcholinesterase-associated collagen ColQ: differential expression in fast and slow twitch muscle fibers is driven by distinct promoters / H. H. Lee, R. C. Choi, A. K. Ting, N. L. Siow, J. X. Jiang, J. Massoulié, K. W. Tsim // *The Journal of Biological Chemistry*. - 2004. - Vol. 279(26). - P. 27098-27107.
- 172.** Legay, C. Developmental regulation of acetylcholinesterase transcripts in the mouse diaphragm: alternative splicing and focalization / C. Legay, M. Huchet, J. Massoulié, J. P. Changeux // *European Journal of Neuroscience*. - 1995. - Vol. 7(8). - P. 1803-1809.
- 173.** Legay, C. Developmental regulation of acetylcholinesterase transcripts in the mouse diaphragm: alternative splicing and focalization / C. Legay, M. Huchet, J. Massoulie, J.-P. Changeux // *The European Journal of Neuroscience*. – 1995. – Vol. 7. – P. 1803–1809.
- 174.** Legay, C. Stability and secretion of acetylcholinesterase forms in skeletal muscle cells / C. Legay, F. A. Mankal, J. Massoulie, B. J. Jasmin // *The Journal of Neuroscience*. – 1999. – Vol. 19. – P. 8252–82591.
- 175.** Li, B. The butyrylcholinesterase knockout mouse is obese on a high-fat diet / B. Li, E. G. Duysen, O. Lockridge // *Chemico-Biological Interactions*. – 2008. – Vol. 175(1-3). – P. 88-91.
- 176.** Li, H. Individual synaptic vesicles from the electroplaque of *Torpedo californica*, a classic cholinergic synapse, also contain transporters for glutamate

and ATP / H. Li, M. L. Harlow // *Physiological Reports*. - 2014. - Vol. 2(1). - P. e00206.

177. Light, D. B. Dual ion-channel regulation by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase / D. B. Light, J. D. Corbin, B. A. Stanton // *Nature*. - 1990. - Vol. 344(6264). - P. 336-339.

178. Lin, J. W. Modulation of synaptic delay during synaptic plasticity / J. W. Lin, D. S. Faber // *Trends in Neuroscience*. - 2002. - Vol. 25(9). - P. 449-455. Review.

179. Lincoln, T. M. Cyclic GMP and mechanisms of vasodilation / T. M. Lincoln // *Pharmacology and Therapeutics*. - 1989. - Vol. 41(3). - P. 479-502. Review.

180. Lincoln, T. M. Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression / T. M. Lincoln, N. Dey, H. Sellak // *Journal of Applied Physiology* (1985). - 2001. - Vol. 91(3). - P. 1421-1430. Review.

181. Lindgren, C. A. Nitroprusside inhibits neurotransmitter release at the frog neuromuscular junction / C. A. Lindgren, M. V. Laird // *Neuroreport*. - 1994. - Vol. 5(16). - P. 2205-2208.

182. Lindstrom, J. M. Acetylcholine receptors and myasthenia / J. M. Lindstrom // *Muscle and Nerve*. - 2000. - Vol. 23(4). - P. 453-477. Review.

183. Lindstrom, J. M. Nicotinic acetylcholine receptors of muscles and nerves: comparison of their structures, functional roles, and vulnerability to pathology / J. M. Lindstrom // *Annals of the New York Academy of Sciences*. - 2003. - Vol. 998. - P. 41-52. Review.

184. Liou, H. C. Potentiation of spontaneous acetylcholine release from motor nerve terminals by glutamate in *Xenopus* tadpoles / H. C. Liou, R. S. Yang, W. M. Fu // *Neuroscience*. - 1996. - Vol. 75(1). - P. 325-331.

185. Lipton, S. A. Cysteine regulation of protein function--as exemplified by NMDA-receptor modulation / S. A. Lipton, Y. B. Choi, H. Takahashi, D. Zhang, W. Li, A. Godzik, L. A. Bankston // *Trends in Neurosciences*. - 2002. - Vol. 25(9). - P. 474-480. Review.

- 186.** Lisman, J. A mechanism for the Hebb and the anti-Hebb processes underlying learning and memory / J. Lisman // *Proceedings of National Academy Science of the United States of America*. – 1989. – Vol. 86(23). – P. 9574-9578.
- 187.** Lockridge, O. Large scale purification of butyrylcholinesterase from human plasma suitable for injection into monkeys; A potential new therapeutic for protection against cocaine and nerve agent toxicity / O. Lockridge, L. M. Schopfer, G. Winger, J. H. Woods // *The Journal of Medical, Chemical, Biological and Radiological Defense*. – 2005. – Vol. 3. – P. 1-23.
- 188.** Loesch, A. Ultrastructural localization of NADPH-diaphorase and colocalization of nitric oxide synthase in endothelial cells of the rabbit aorta / A. Loesch, A. Belai, G. Burnstock // *Cell Tissue Research*. - 1993. - Vol. 274(3). - P. 539-545.
- 189.** Lømo, T. Control of junctional acetylcholinesterase by neural and muscular influences in the rat / T. Lømo, C. R. Slater // *The Journal of Physiology*. – 1980. – Vol. 303. – P. 191-202.
- 190.** Lømo, T. Stimulation of denervated rat soleus muscle with fast and slow activity patterns induces different expression of acetylcholinesterase molecular forms / T. Lømo, J. Massoulié, M. Vigny // *The Journal of Neuroscience*. – 1985. – Vol. 5(5). – P. 1180-1187.
- 191.** Lucas, C. A. Regulation of acetylcholinesterase secretion from neuronal cell cultures.--1. Actions of nerve growth factor, cytoskeletal inhibitors and tunicamycin / C. A. Lucas, G. W. Kreutzberg // *Neuroscience*. - 1985. - Vol. 14(1). - P. 349-360.
- 192.** Lück, G. Nitric oxide synthase (NOS-1) coclustered with agrin-induced AChR-specializations on cultured skeletal myotubes / G. Lück, W. Hoch, C. Hopf, D. Blottner // *Molecular and Cellular Neurosciences*. – 2000. – Vol. 16(3). – P. 269-281.
- 193.** Luetje, C. W. Both alpha- and beta-subunits contribute to the agonist sensitivity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors / C. W. Luetje, J. Patrick // *The Journal of Neuroscience*. – 1991. – Vol. 11(3). – P. 837-845.

- 194.** Luise, M. Dystrophin is phosphorylated by endogenous protein kinases / M. Luise, C. Presotto, L. Senter, R. Betto, S. Ceoldo, S. Furlan, S. Salvatori, R. A. Sabbadini, G. Salviati // *The Biochemical Journal*. – 1993. – Vol. 293. – P. 243–247, 1993.
- 195.** Maiese, K. Peptide growth factors protect against ischemia in culture by preventing nitric oxide toxicity / K. Maiese, I. Boniece, D. DeMeo, J. A. Wagner // *The Journal of Neuroscience*. – 1993. – Vol. 13(7). – P. 3034-3040.
- 196.** Malomouzh, A. I. Effect of N-acetylaspartylglutamate (NAAG) on non-quantal and spontaneous quantal release of acetylcholine at the neuromuscular synapse of rat / A. I. Malomouzh, E. E. Nikolsky, E. M. Lieberman, J. A. Sherman, J. L. Lubischer, R. M. Grossfeld, A. K. Urazaev // *Journal of Neurochemistry*. – 2005. – Vol. 94(1). – P. 257-267.
- 197.** Malomouzh, A. I. Glutamate regulation of non-quantal release of acetylcholine in the rat neuromuscular junction / A. I. Malomouzh, M. R. Mukhtarov, E. E. Nikolsky, F. Vyskocil, E. M. Lieberman, A. K. Urazaev // *Journal of Neurochemistry*. – 2003. – Vol. 85(1). – P. 206-213.
- 198.** Malomouzh, A. I. NMDA receptors at the endplate of rat skeletal muscles: precise postsynaptic localization / A. I. Malomouzh, L. F. Nurullin, S. S. Arkhipova, E. E. Nikolsky // *Muscle and Nerve*. – 2011. – Vol. 44(6). – P. 987-989.
- 199.** Marin, P. A nitric oxide synthase activity selectively stimulated by NMDA receptors depends on protein kinase C activation in mouse striatal neurons / P. Marin, M. Lafon-Cazal, J. Bockaert // *The European Journal of Neuroscience*. - 1992. – Vol. 4(5). – P. 425-432.
- 200.** Marletta, M. A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis / M. A. Marletta // *Cell*. - 1994. - Vol. 78(6). - P. 927-930.
- 201.** Marnay, A. Cholinesterase in voluntary frog's muscle / A. Marnay, D. Nachmansohn // *The Journal of Physiology*. – 1937. – Vol. 89(4). – P. 359-367.

- 202.** Massoulie, J. Molecular and cellular biology of cholinesterases / J. Massoulie, L. Pezzementi, S. Bon, E. Krejci, F.-M. Vallette // *Progress in neurobiology*. – 1993. – Vol. 41. – P. 31–91
- 203.** Massoulié, J. The C-terminal peptides of acetylcholinesterase: cellular trafficking, oligomerization and functional anchoring / J. Massoulié, S. Bon, N. Perrier, C. Falasca // *Chemico-Biological Interactions*. – 2005. – Vol. 157-158. – P. 3-14.
- 204.** Massoulié, J. The C-terminal T peptide of cholinesterases: structure, interactions, and influence on protein folding and secretion / J. Massoulié, S. Bon // *Journal of Molecular Neuroscience*. – 2006. – Vol. 30(1-2). – P. 233-236.
- 205.** Massoulie, J. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates / J. Massoulié, S. Bon // *Annual Review of Neuroscience*. – 1982. – Vol. 5. – P. 57-106.
- 206.** Matteoli, M. Substance P-like immunoreactivity at the frog neuromuscular junction / M. Matteoli, C. Haimann, P. De Camilli // *Neuroscience*. – 1990. – Vol. 37(1). – P. 271-275.
- 207.** Mayer, M. L. Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones / M. L. Mayer, G. L. Westbrook, P. B. Guthrie // *Nature*. – 1984. – Vol. 309(5965). – P. 261-263.
- 208.** Mays, T. A. Glutamate receptors localize postsynaptically at neuromuscular junctions in mice / T. A. Mays, J. L. Sanford, T. Hanada, A. H. Chishti, J. A. Rafael-Fortney // *Muscle and Nerve*. – 2009. – Vol. 39(3). – P. 343-349.
- 209.** McMahan, U. J. Cholinesterase is associated with the basal lamina at the neuromuscular junction / U. J. McMahan, J. R. Sanes, L. M. Marshall // *Nature*. – 1978. – Vol. 271(5641). – P. 172-174.
- 210.** Meister, B. Glutamate transporter mRNA and glutamate-like immunoreactivity in spinal motoneurons / B. Meister, U. Arvidsson, X. Zhang, G. Jacobsson, M. J. Villar, T. Hökfelt // *Neuroreport*. – 1993. – Vol. 5(3). – P. 337-340.

- 211.** Meldolesi, J. Ca^{2+} -influx following receptor activation / J. Meldolesi, E. Clementi, C. Fasolato, D. Zacchetti, T. Pozzan // *Trends in Pharmacological Sciences*. – 1991. – Vol. 12. – P. 289—292.
- 212.** Mellion, B. T. Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators / B. T. Mellion, L. J. Ignarro, E. H. Ohlstein, E. G. Pontecorvo, A. L. Hyman, P. J. Kadowitz // *Blood*. – 1981. – Vol. 57(5). – P. 946-955.
- 213.** Michel, R. N. Neural regulation of acetylcholinesterase mRNAs at mammalian neuromuscular synapses / R. N. Michel, C. Q. Vu, W. Tetzlaff, B. J. Jasmin // *The Journal of Cell Biology*. – 1994. – Vol. 127(4). – P. 1061-1069.
- 214.** Migaud, M. Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein / M. Migaud, P. Charlesworth, M. Dempster, L. C. Webster, A. M. Watabe, M. Makhinson, Y. He, M. F. Ramsay, R. G. Morris, J. H. Morrison, T. J. O'Dell, S. G. Grant // *Nature*. - 1998. - Vol. 396(6710). - P. 433-439.
- 215.** Moran, M. A. Colocalization of cholinesterases with beta amyloid protein in aged and Alzheimer's brains / M. A. Morán, E. J. Mufson, P. Gómez-Ramos // *Acta Neuropathologica*. – 1993. – Vol. 85(4). – P. 362-369.
- 216.** Mori, H. Structure and function of the NMDA receptor channel / H. Mori, M. Mishina // *Neuropharmacology*. – 1995. – Vol. 34(10). – P. 1219-1237. Review.
- 217.** Mori, H. Role of the carboxy-terminal region of the GluR epsilon2 subunit in synaptic localization of the NMDA receptor channel / H. Mori, T. Manabe, M. Watanabe, Y. Satoh, N. Suzuki, S. Toki, K. Nakamura, T. Yagi, E. Kushiya, T. Takahashi, Y. Inoue, K. Sakimura, M. Mishina // *Neuron*. – 1998. – Vol. 21(3). – P. 571-580.
- 218.** Mukhtarov, M. R. Effect of nitric oxide and NO synthase inhibition on nonquantal acetylcholine release in the rat diaphragm / M. R. Mukhtarov, A. K.

Urazaev, E. E. Nikolsky, F. Vyskocil // *The European Journal of Neuroscience*. – 2000. – Vol. 12(3). – P. 980-986.

219. Münzel, T. Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase / T. Münzel, R. Feil, A. Mülsch, S. M. Lohmann, F. Hofmann, U. Walter // *Circulation*. – 2003. – Vol. 108(18). – P. 2172-2183. Review.

220. Mustafa, A. K. Nitric oxide S-nitrosylates serine racemase, mediating feedback inhibition of D-serine formation / A. K. Mustafa, M. Kumar, B. Selvakumar, G. P. Ho, J. T. Ehmsen, R. K. Barrow, L. M. Amzel, S. H. Snyder // *Proceedings of National Academy Science of the United States of America*. – 2007. – Vol. 104(8). – P. 2950-2955.

221. Nakane, M. Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase / M. Nakane, J. Mitchell, U. Forstmann, F. Murad // *Biochemical and Biophysical Research Communication*. – 1991. – Vol. 180. – P. 1396–1402

222. Nakanishi, S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function / S. Nakanishi // *Science*. – 1992. – Vol. 258(5082). – P. 597-603.

223. Nathan, C. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls / C. Nathan, Q. W. Xie // *Cell*. - 1994. - Vol. 78(6). - P. 915-918.

224. Nathan, C. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls / C. Nathan, Q. W. Xie // *Cell*. - 1994. - Vol. 78(6). - P. 915-918.

225. Nathan, C. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens / C. Nathan, M. U. Shiloh // *Proceedings of National Academy Science of the United States of America*. – 2000. – Vol. 97(16). – P. 8841-8848. Review.

226. Nicolet, Y. Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products / Y. Nicolet, O. Lockridge, P. Masson, J. C.

Fontecilla-Camps, F. Nachon // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278. – P. 41141–41147.

227. Nikolsky, E. E. Cholinergic regulation of the evoked quantal release at frog neuromuscular junction / E. E. Nikolsky, F. Vyskocil, E. A. Bukharaeva, D. Samigullin, L. G. Magazanik // *The Journal of Physiology*. – 2004. – Vol. 560(Pt 1). – P. 77-88.

228. Nishimaru, H. Mammalian motor neurons corelease glutamate and acetylcholine at central synapses / H. Nishimaru, C. E. Restrepo, J. Ryge, Y. Yanagawa, O. Kiehn // *Proceedings of National Academy Science of the United Sciences of America*. – 2005. – Vol. 102(14). – P. 5245-5249.

229. Nowak, L. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones / L. Nowak, P. Bregestovski, P. Ascher, A. Herbet, A. Prochiantz // *Nature*. – 1984. – Vol. 307(5950). – P. 462-465.

230. Oelze, M. Vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation as a sensitive monitor of defective nitric oxide//cGMP signaling and endothelial dysfunction / M. Oelze, H. Mollnau, N. Hoffmann, A. Warnholtz, M. Bodenschatz, A. Smolenski, U. Walter, M. Skatchkov, T. Meinertz, T. Münzel // *Circulation Research*. – 2000. – Vol. 87(11). – P. 999-1005.

231. Ohkuma, S. Nitric oxide and peroxynitrite as factors to stimulate neurotransmitter release in the CNS / S. Ohkuma, M. Katsura // *Progress in Neurobiology*. – 2001. – Vol. 64(1). – P. 97-108. Review.

232. Palomero, J. In situ detection and measurement of intracellular reactive oxygen species in single isolated mature skeletal muscle fibers by real time fluorescence microscopy / J. Palomero, D. Pye, T. Kabayo, D. G. Spiller, M. J. Jackson // *Antioxidants and Redox Signalling*. – 2008. – Vol. 10(8). – P. 1463-1474.

233. Pan, Z. H. Nitric oxide-related species inhibit evoked neurotransmission but enhance spontaneous miniature synaptic currents in central neuronal cultures / Z. H. Pan, M. M. Segal, S. A. Lipton // *Proceedings of National Academy Science of the United Sciences of America*. – 1996. – Vol. 93(26). – P. 15423-15428.

- 234.** Patton, B. L. Basal lamina and the organization of neuromuscular synapses / B. L. Patton // *Journal of Neurocytology*. – 2003. – Vol. 32(5-8). – P. 883-903. Review.
- 235.** Pei, D. S. Exogenous nitric oxide negatively regulates c-Jun N-terminal kinase activation via inhibiting endogenous NO-induced S-nitrosylation during cerebral ischemia and reperfusion in rat hippocampus / D. S. Pei, Y. J. Song, H. M. Yu, W. W. Hu, Y. Du, G. Y. Zhang // *Journal of Neurochemistry*. – 2008. – Vol. 106(4). – P. 1952-1963.
- 236.** Perkins, W. J. Skeletal muscle force and actomyosin ATPase activity reduced by nitric oxide donor / W. J. Perkins, Y-S. Han, G. C. Sieck // *Journal of applied physiology*. – 1997. – Vol. 83(4). – P. 1326-1332.
- 237.** Perrier, A. L. PRiMA: the membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain / A. L. Perrier, J. Massoulié, E. Krejci // *Neuron*. – 2002. – Vol. 33(2). – P. 275-285.
- 238.** Pervin, S. Nitric oxide-induced cytostasis and cell cycle arrest of a human breast cancer cell line (MDA-MB-231): potential role of cyclin D1 / S. Pervin, R. Singh, G. Chaudhuri // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2001. - Vol. 98(6). - P. 3583-3588.
- 239.** Petrov, K. A. Schwann cells sense and control acetylcholine spillover at the neuromuscular junction by $\alpha 7$ nicotinic receptors and butyrylcholinesterase / K. A. Petrov, E. Girard, A. D. Nikitashina, C. Colasante, V. Bernard, L. Nurullin, J. Leroy, D. Samigullin, O. Colak, E. Nikolsky, B. Plaud, E. Krejci // *The Journal of Neuroscience*. – 2014. – Vol. 34(36). – P. 11870-11883.
- 240.** Peunova, N. Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells / N. Peunova, G. Enikolopov // *Nature*. - 1995. - Vol. 375(6526). - P. 68-73.
- 241.** Pinard, A. Glutamatergic modulation of synaptic plasticity at a PNS vertebrate cholinergic synapse / A. Pinard, S. Lévesque, J. Vallée, R. Robitaille // *The European Journal of Neuroscience*. – 2003. – Vol. 18(12). – P. 3241-3250.

- 242.** Powers, S. K. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production / S. K. Powers, M. J. Jackson // *Physiological Reviews*. – 2008. – Vol. 88(4). – P. 1243-1276.
- 243.** Putney, J. W. Jr. Excitement about calcium signaling in excitable cells / J. W. Putney, Jr. // *Science*. – 1993. – Vol. 262. – P. 676—678.
- 244.** Pye, D. Real-time measurement of nitric oxide in single mature mouse skeletal muscle fibres during contractions / D. Pye, J. Palomero, T. Kabayo, M. Jackson // *The Journal of Physiology*. – 2007. – Vol. 581(Pt 1). – P. 309-318.
- 245.** Qu, Z. Proteomic quantification and site-mapping of S-nitrosylated proteins using isobaric iodoTMT reagents / Z. Qu, F. Meng, R. D. Bomgarden, R. I. Viner, J. Li, J. C. Rogers, J. Cheng, C. M. Greenlief, J. Cui, D. B. Lubahn, G. Y. Sun, Z. Gu // *Journal of Proteome Research*. – 2014. – Vol. 13(7). – P. 3200-3211.
- 246.** Qu, Z.-W. N-methyl-D-aspartate receptor-dependent denitrosylation of neuronal nitric oxide synthase increase the enzyme activity / Z.-W.Qu, W. Y. Miao, S. Q. Hu, C. Li, X. L. Zhuo, Y. Y. Zong, Y. P. Wu, G. Y. Zhang // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7(12). – P. 1-16.
- 247.** Radi, R. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide / R. Radi, J. S. Beckman, K. M. Bush, B. A. Freeman // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1991. – Vol. 288(2). – P. 481-487.
- 248.** Radomski, M. W. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium / M. W. Radomski, R. M. Palmer, S. Moncada // *Lancet*. – 1987. – Vol. 2(8567). – P. 1057-1058.
- 249.** Raftery, M. A. Acetylcholine receptor: complex of homologous subunits. / M. A. Raftery, M. W. Hunkapiller, C. D. Strader, L. E. Hood // *Science*. – 1980. – Vol. 208(4451). – P. 1454-1456.
- 250.** Rameau, G. A. Bidirectional regulation of neuronal nitric-oxide synthase phosphorylation at serine 847 by the N-methyl-D-aspartate receptor / G. A. Rameau,

L. Y. Chiu, E. B. Ziff // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279(14). – P. 14307-14314.

251. Rameau, G. A. NMDA receptor regulation of nNOS phosphorylation and induction of neuron death / G. A. Rameau, L. Y. Chiu, E. B. Ziff // *Neurobiology of Aging*. – 2003. – Vol. 24. – P. 1123–1133

252. Ravi, K. S-nitrosylation of endothelial nitric oxide synthase is associated with monomerization and decreased enzyme activity / K. Ravi, L. A. Brennan, S. Levic, P. A. Ross, S. M. Black // *Proceedings of National Academy Science of the United Sciences of America*. – 2004. – Vol. 101(8). – P. 2619-2624.

253. Reddy, L. V. Glial cells maintain synaptic structure and function and promote development of the neuromuscular junction in vivo / L. V. Reddy, S. Koirala, Y. Sugiura, A. A. Herrera, C. P. Ko // *Neuron*. – 2003. – Vol. 40(3). – P. 563-580.

254. Reid, M. B. Reactive oxygen and nitric oxide in skeletal muscle / M. B. Reid // *News Physiol Sci*. – 1996. – Vol. 11. – P. 114–121.

255. Reist, N. E. Neurally evoked calcium transients in terminal Schwann cells at the neuromuscular junction / N. E. Reist, S. J. Smith // *Proceedings of National Academy Science of the United Sciences of America*. – 1992. – Vol. 89(16). – P. 7625-7629.

256. Renganathan, M. Nitric oxide blocks fast, slow, and persistent Na⁺ channels in C-type DRG neurons by S-nitrosylation / M. Renganathan, T. R. Cummins, S. G. Waxman // *Journal of Neurophysiology*. – 2002. – Vol. 87(2). – P. 761-775.

257. Reyes, A. E. Acetylcholinesterase-Abeta complexes are more toxic than Abeta fibrils in rat hippocampus: effect on rat beta-amyloid aggregation, laminin expression, reactive astrocytosis, and neuronal cell loss / A. E. Reyes, M. A. Chacón, M. C. Dinamarca, W. Cerpa, C. Morgan, N. C. Inestrosa // *The American Journal of Pathology*. – 2004. – Vol. 164(6). – P. 2163-2174.

258. Ribera, J. Nitric oxide synthase in rat neuromuscular junctions and in nerve terminals of Torpedo electric organ: its role as regulator of acetylcholine release / J.

Ribera, J. Marsal, A. Casanovas, M. Hukkanen, O. Tarabal, J. E. Esquerda // *Journal of Neuroscience Research*. - 1998. - Vol. 51(1). - P. 90-102.

259. Riccio, A. What a privilege to reside at the synapse: NMDA receptor signaling to CREB / A. Riccio, D. D. Ginty // *Nature Neuroscience*. – 2002. – Vol. 5(5). – P. 389-390.

260. Rico, E. P. Ethanol alters acetylcholinesterase activity and gene expression in zebrafish brain / E. P. Rico, D. B. Rosemberg, R. D. Dias, M. R. Bogo, C. D. Bonan // *Toxicology Letters*. – 2007. – Vol. 174(1-3). – P. 25-30.

261. Rieger, F. The effects of nerve growth factor on acetylcholinesterase and its multiple forms in cultures of rat PC12 pheochromocytoma cells: increased total specific activity and appearance of the 16 S molecular form / F. Rieger, M. L. Shelanski, L. A. Greene // *Developmental Biology*. – 1980. – Vol. 76(1). – P. 238-243.

262. Rinholm, J. E. Subcellular localization of the glutamate transporters GLAST and GLT at the neuromuscular junction in rodents / J. E. Rinholm, G. Slettaløkken, P. Marcaggi, Ø. Skare, J. Storm-Mathisen, L. H. Bergersen // *Neuroscience*. – 2007. – Vol. 145(2). – P. 579-591.

263. Roberts, P. J. Excitatory receptors and their role in excitotoxicity / P. J. Roberts, S. W. Davies // *Biochemical Society Transaction*. - 1987. - Vol. 15(2). - P. 218-219.

264. Robertson, J. D. The ultrastructure of a reptilian myoneural junction / J. D. Robertson // *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*. – 1956. – Vol. 2(4). – P. 381-394.

265. Robitaille, R. Purinergic receptors and their activation by endogenous purines at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction / R. Robitaille // *The Journal of Neuroscience*. – 1995. – Vol. 15(11). – P. 7121-7131.

266. Rochon, D. Synapse-glia interactions at the mammalian neuromuscular junction / D. Rochon, I. Rousse, R. Robitaille // *The Journal of Neuroscience*. – 2001. – Vol. 21(11). – P. 3819-3829.

- 267.** Roskams, A. J. Nitric oxide mediates the formation of synaptic connections in developing and regenerating olfactory receptor neurons / A. J. Roskams, D. S. Bredt, T. M. Dawson, G. V. Ronnett // *Neuron*. - 1994. - Vol. 13(2). - P. 289-299.
- 268.** Rothstein, J. D. Localization of neuronal and glial glutamate transporters / J. D. Rothstein, L. Martin, A. I. Levey, M. Dykes-Hoberg, L. Jin, D. Wu, N. Nash, R. W. Kuncl // *Neuron*. - 1994. - Vol. 13(3). - P. 713-725.
- 269.** Rotundo, R. L. Assembly and regulation of acetylcholinesterase at the vertebrate neuromuscular junction / R. L. Rotundo, C. A. Ruiz, E. Marrero, L. M. Kimbell, S. G. Rossi, T. Rosenberry, A. Darr, P. Tsoufas // *Chemico-Biological Interactions*. - 2008. - Vol. 175(1-3). - P. 26-29.
- 270.** Rotundo, R. L. Expression and localization of acetylcholinesterase at the neuromuscular junction / R. L. Rotundo // *Journal of Neurocytology*. - 2003. - Vol. 32(5-8). - P. 743-766. Review.
- 271.** Rubin, L. L. Regulation of acetylcholinesterase appearance at neuromuscular junctions in vitro / L. L. Rubin, S. M. Schuetze, C. L. Weill, G. D. Fischbach // *Nature*. - 1980. - Vol. 283(5744). - P. 264-267.
- 272.** Rudell, J. B. Regulation of muscle acetylcholine receptor turnover by β subunit tyrosine phosphorylation / J. B. Rudell, M. J. Ferns // *Developmental Neurobiology*. - 2013. - Vol. 73(5). - P. 399-410.
- 273.** Ruff, R. L. Na current density at and away from end plates on rat fast- and slow-twitch skeletal muscle fibers / R. L. Ruff // *The American Journal of Physiology*. - 1992. - Vol. 262(1 Pt 1). - P. 229-234.
- 274.** Sanders, K. M. Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission / K. M. Sanders, S. M. Ward // *American Journal of Physiology*. - 1992. - Vol. 262. - P. 379-392.
- 275.** Sanes, J. R. Development of the vertebrate neuromuscular junction / J. R. Sanes, J. W. Lichtman // *Annual Review of Neuroscience*. - 1999. - Vol. 22. - P. 389-442.

- 276.** Sattler, R. Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein / R. Sattler, Z. Xiong, W. Y. Lu, M. Hafner, J. F. MacDonald, M. Tymianski // *Science*. - 1999. - Vol. 284(5421). - P. 1845-1848.
- 277.** Sattler, R. Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein / R. Sattler, Z. Xiong, W. Y. Lu, M. Hafner, J. F. MacDonald, M. Tymianski // *Science*. - 1999. - Vol. 284. - P. 1845-1848.
- 278.** Sayed, N. Desensitization of soluble guanylyl cyclase, the NO receptor, by S-nitrosylation / N. Sayed, P. Baskaran, X. Ma, F. van den Akker, A. Beuve // *Proceedings of National Academy Science of the United States of America*. - 2007. - Vol. 104(30). - P. 12312-12317.
- 279.** Schallreuter, K. U. Activation/deactivation of acetylcholinesterase by H₂O₂: more evidence for oxidative stress in vitiligo / K. U. Schallreuter, S. M. Elwary, N. C. Gibbons, H. Rokos, J. M. Wood // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. - 2004. - Vol. 315(2). - P. 502-508.
- 280.** Schuman, E. M. Nitric oxide and synaptic function / E. M. Schuman, D. V. Madison // *Annual Review of Neuroscience*. - 1994. - Vol. 17. - P. 153-183. Review.
- 281.** Seagar, M. Interactions between proteins implicated in exocytosis and voltage-gated calcium channels / M. Seagar, C. Lévêque, N. Charvin, B. Marquèze, N. Martin-Moutot, J. A. Boudier, J. L. Boudier, Y. Shoji-Kasai, K. Sato, M. Takahashi // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. - 1999. - Vol. 354(1381). - P. 289-297. Review.
- 282.** Seeburg, P. H. The NMDA receptor channel: molecular design of a coincidence detector / P. H. Seeburg, N. Burnashev, G. Köhr, T. Kuner, R. Sprengel, H. Monyer // *Recent Progress in Hormone Research*. - 1995. - Vol. 50. - P. 19-34. Review.
- 283.** Sheehy, A. M. Nitric oxide exposure inhibits endothelial NOS activity but not gene expression: a role for superoxide / A. M. Sheehy, M. A. Burson, S. M. Black // *The American Journal of Physiology*. - 1998. - Vol. 274(5 Pt 1). - P. 833-841.

- 284.** Sheng, M. Growth of the NMDA receptor industrial complex / M. Sheng, S. H. Lee // *Nature Neuroscience*. - 2000. - Vol. 3(7). - P. 633-635.
- 285.** Sheng, M. Ligand-gated ion channel interactions with cytoskeletal and signaling proteins / M. Sheng, D. T. S. Pak // *Annual Review of Physiology*. – 2000. – Vol. 62. – P. 755–778.
- 286.** Sheng, M. Molecular organization of the postsynaptic specialization / M. Sheng // *Proceedings of National Academy Science of the United States of America*. – 2001. – Vol. 98(13). – P. 7058-7061. Review.
- 287.** Sherman, M. P. Nitric oxide-mediated neuronal injury in multiple sclerosis / M. P. Sherman, J. M. Griscavage, L. J. Ignarro // *Medical Hypotheses*. – 1992. – Vol. 39(2). – P. 143-146.
- 288.** Shih T. M. Neurochemical mechanisms in soman-induced seizures / T. M. Shih, J. H. McDonough Jr. // *Journal of Applied Toxicology*. – 1997. – Vol. 17(4). – P. 255-264.
- 289.** Silinsky, E. M. Synchronous release of ATP and neurotransmitter within milliseconds of a motor nerve impulse in the frog / E. M. Silinsky, R. S. Redman // *The Journal of Physiology*. – 1996. – Vol. 492 (Pt 3). – P. 815-822.
- 290.** Silman, I. Intrinsic forms of acetylcholinesterase in skeletal muscle / I. Silman, J. M. Lyles, E. A. Barnard // *FEBS Letters*. – 1978. – Vol. 94. – P. 166–170
- 291.** Sketelj, J. Acetylcholinesterase mRNA level and synaptic activity in rat muscles depend on nerve-induced pattern of muscle activation / J. Sketelj, N. Crne-Finderle, B. Strukelj, J. V. Trontelj, D. Pette // *The Journal of Neuroscience*. – 1998. – Vol. 18. – P. 1944–1952
- 292.** Sketelj, J. Asymmetric molecular forms of acetylcholinesterase in mammalian skeletal muscles / J. Sketelj, M. Brzin // *Journal of Neuroscience Research*. – 1985. – Vol. 14. – P. 95–103.
- 293.** Sketelj, J. Interactions between intrinsic regulation and neural modulation of acetylcholinesterase in fast and slow skeletal muscles / J. Sketelj, N. Crne-Finderle,

S. Ribaric, M. Brzin // *Cellular and Molecular Neurobiology*. – 1991. – Vol. 11(1). – P. 35-54.

294. Sketelj, J. Neural regulation of acetylcholinesterase in skeletal muscles // *J. Sketelj / BAM*. – 1994. – Vol. 4. – P. 281–291

295. Sketelj, J. Specific impulse patterns regulate acetylcholinesterase activity in skeletal muscles of rats and rabbits / J. Sketelj, E. Leisner, B. Gohlsch, D. Skorjanc, D. Pette // *Journal of Neuroscience Research*. – 1997. – Vol. 47(1). – P. 49-57.

296. Skinner, C. B. Signal transduction and gene expression in cultured accessory olfactory bulb neurons / C.B. Skinner, S.C. Upadhyaya, T. K. Smith, C. P. Turner, A. N. Hegde // *Neuroscience*. – 2008. – Vol. 157(2). – P. 340–348.

297. Sladeczek, F. Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones / F. Sladeczek, J. P. Pin, M. Récasens, J. Bockaert, S. Weiss // *Nature*. – 1985. – Vol. 317(6039). – P. 717-719.

298. Sprengel, R. Importance of the intracellular domain of NR2 subunits for NMDA receptor function in vivo / R. Sprengel, B. Suchanek, C. Amico, R. Brusa, N. Burnashev, A. Rozov, O. Hvalby, V. Jensen, O. Paulsen, P. Andersen, J. J. Kim, R. F. Thompson, W. Sun, L. C. Webster, S. G. Grant, J. Eilers, A. Konnerth, J. Li, J. O. McNamara, P. H. Seeburg // *Cell*. - 1998. - Vol. 92(2). - P. 279-289.

299. Springer, J. E. Calcineurin-mediated BAD dephosphorylation activates the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury / J. E. Springer, R. D. Azbill, S. A. Nottingham, S. E. Kennedy // *The Journal of Neuroscience*. – 2000. – Vol. 20. – P. 7246–7251

300. Srikumar, B. N. The involvement of cholinergic and noradrenergic systems in behavioral recovery following oxotremorine treatment to chronically stressed rats / B. N. Srikumar, T. R. Raju, B. S. Shankaranarayana Rao // *Neuroscience*. – 2006. – Vol. 143(3). – P. 679-688.

301. Srinivasan, J. Effect of losartan and enalapril on cognitive deficit caused by Goldblatt induced hypertension / J. Srinivasan, S. Jayadev, D. Kumaran, K. F.

- Ahamed, B. Suresh, M. Ramanathan // *Indian Journal of Experimental Biology*. – 2005. – Vol. 43(3). – P. 241-246.
- 302.** Stamler J. S. (S)NO signals: translocation, regulation, and a consensus motif / J. S. Stamler, E. J. Toone, S. A. Lipton, N. J. Sucher // *Neuron*. – 1997. – Vol. 18. – P. 691–696, 1997.
- 303.** Stamler J. S. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms / J. S. Stamler, D. J. Singel, J. Loscalzo // *Science*. – 1992. – Vol. 258. - P. 1898–1902.
- 304.** Stamler J. S. Oxidative modifications in nitrosative stress / J. S. Stamler, A. Hausladen // *Nature Structural Biology*. – 1998. – Vol. 5. – P. 247–249.
- 305.** Stamler J. S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide / J. S. Stamler // *Cell*. – 1994. – Vol. 78. – P. 931–936.
- 306.** Stamler, J. S. Endothelium-derived relaxing factor modulates the atherothrombogenic effects of homocysteine / J. S. Stamler, J. Loscalzo // *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. – 1992. – Vol. 20 – P. 202-204.
- 307.** Stamler, J. S. N-acetylcysteine potentiates platelet inhibition by endothelium-derived relaxing factor / J. Stamler, M. E. Mendelsohn, P. Amarante, D. Smick, N. Andon, P. F. Davies, J. P. Cooke, J. Loscalzo // *Circulation Research*. – 1989. – Vol. 65(3). – P. 789-795.
- 308.** Stamler, J. S. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle / J. S. Stamler, G. Meissner // *Physiological Reviews*. – 2001. – Vol. 81(1). – P. 209-237. Review.
- 309.** Steigerwald, F. C-Terminal truncation of NR2A subunits impairs synaptic but not extrasynaptic localization of NMDA receptors / F. Steigerwald, T. W. Schulz, L. T. Schenker, M. B. Kennedy, P. H. Seeburg, G. Kohr // *The Journal of Neuroscience*. – 2000. – Vol. 20. – P. 4573–4581.
- 310.** Stern, P. Single channel properties of cloned NMDA receptors in a human cell line: comparison with results from *Xenopus* oocytes / P. Stern, M. Cik, D. Colquhoun, F. A. Stephenson // *The Journal of Physiology*. – 1994. – Vol. 476(3). – P. 391-397.

- 311.** Stern, P. Single-channel conductances of NMDA receptors expressed from cloned cDNAs: comparison with native receptors / P. Stern, P. Béhé, R. Schoepfer, D. Colquhoun // *Proceedings. Biological Sciences / Royal Society.* – 1992. – Vol. 250(1329). – P. 271-277.
- 312.** Stoyanovsky, D. Nitric oxide activates skeletal and cardiac ryanodine receptors / D. Stoyanovsky, T. Murphy, P. R. Anno, Y. M. Kim, G. Salama // *Cell Calcium.* – 1997. – Vol. 21. – P. 19–29.
- 313.** Sudhof, T. C. The synaptic vesicle cycle / T. C. Sudhof // *Annual Review of Neuroscience.* – 2004. – Vol. 27. – P. 509-547. Review.
- 314.** Surichamorn, W. Role of intracellular Ca²⁺-mobilization in muscarinic and histamine receptor-mediated activation of guanylate cyclase in NIE-IIS neuroblastoma cells: assessment of the arachidonic acid release hypothesis / W. Surichamorn, C. Forray, E. E. El-Fakahany // *Molecular Pharmacology.* – 1990. – Vol. 37. – P. 860—869.
- 315.** Sweatt, J. D. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory / J. D. Sweatt // *Journal of Neurochemistry.* - 2001. - Vol. 76(1). - P. 1-10. Review.
- 316.** Taschenberger, H. Release kinetics, quantal parameters and their modulation during short-term depression at a developing synapse in the rat CNS / H. Taschenberger, V. Scheuss, E. Neher // *The Journal of Physiology.* – 2005. – Vol. 568(Pt 2). – P. 513-537.
- 317.** Taylor, P. Structure and regulation of expression of the acetylcholinesterase gene / P. Taylor, Y. Li, S. Camp, T. L. Rachinsky, T. Ekström, D. Getman, M. E. Fuentes, D. C. Vellom, Z. Radić // *Chemico-Biological Interactions.* - 1993. - Vol. 87(1-3). - P. 199-207.
- 318.** Thomas, S. Differential frequency-dependent regulation of transmitter release by endogenous nitric oxide at the amphibian neuromuscular synapse / S. Thomas, R. Robitaille // *The Journal of Neuroscience.* – 2001. – Vol. 21(4). – P. 1087-1095.

- 319.** Thoonen, R. Pathophysiology of hypertension in the absence of nitric oxide//cyclic GMP signaling / R. Thoonen, P. Y. Sips, K. D. Bloch, E. S. Buys // *Current Hypertension Reports*. – 2013. – Vol. 15(1). – P. 47-58.
- 320.** Tomàs, J. Presynaptic membrane receptors in acetylcholine release modulation in the neuromuscular synapse / J. Tomàs, M. M. Santafé, N. Garcia, M. A. Lanuza, M. Tomàs, N. Besalduch, T. Obis, M. Priego, E. Hurtado // *Journal of Neuroscience Research*. – 2014. – Vol. 92 (5). – P. 543-554
- 321.** Toutant, J.P. Cholinesterases: tissue and cellular distribution of molecular forms and their physiological regulation / J. P. Toutant, J. Massoulié // *Handbook of Experimental Pharmacology*. / edited by V.P. Whittaker. Springer-Verlag - 1988. - Vol. 86. - P. 225–265.
- 322.** Tsakiris, S. Protective effect of L-phenylalanine on rat brain acetylcholinesterase inhibition induced by free radicals / S. Tsakiris, P. Angelogianni, K. H. Schulpis, J. C. Stavridis // *Clinical Biochemistry*. - 2000. - Vol. 33(2). - P. 103-106.
- 323.** Udayabanu, M. Nitric oxide associated with iNOS expression inhibits acetylcholinesterase activity and induces memory impairment during acute hypobaric hypoxia / M. Udayabanu, D. Kumaran, R. U. Nair, P. Srinivas, N. Bhagat, R. Aneja, A. Katyal // *Brain Research*. - 2008. - Vol. 1230. - P. 138-149.
- 324.** Unwin, N. Projection structure of the nicotinic acetylcholine receptor: distinct conformations of the alpha subunits / N. Unwin // *Journal of Molecular Biology*. - 1996. - Vol. 257(3). - P. 586-596.
- 325.** Urazaev, A. K. Muscle NMDA receptors regulate the resting membrane potential through NO-synthase / A. K. Urazaev, S. T. Magsumov, G. I. Poletayev, E. E. Nikolsky, F. Vyskocil // *Physiological Research*. - 1995. - Vol. 44(3). - P. 205-208.
- 326.** Vallette, F. M. Regulation of the expression of acetylcholinesterase by muscular activity in avian primary cultures / F. M. Vallette, J. Massoulié // *Journal of Neurochemistry*. - 1991. - Vol. 56(5). - P. 1518-1525.

- 327.** Van der Kloot, W. A chloride channel blocker reduces acetylcholine uptake into synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction / W. Van der Kloot // *Brain Research*. - 2003. - Vol. 961(2). - P. 287-289.
- 328.** Van der Kloot, W. Quantal acetylcholine release at the vertebrate neuromuscular junction / W. Van der Kloot, J. Molgó // *Physiological Reviews*. - 1994. - Vol. 74(4). - P. 899-991. Review.
- 329.** Vigny, M. The motor end-plate specific form of acetylcholinesterase: appearance during embryogenesis and reinnervation of rat muscle // M. Vigny, J. Koenig, F. Rieger / *Journal of Neurochemistry*. - 1976. – Vol. 27. – P. 1347–1353.
- 330.** Vizi, E. S. Evidence that catecholamines increase acetylcholine release from neuromuscular junction through stimulation of alpha-1 adrenoceptors / E. S. Vizi // *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. - 1991. - Vol. 343(5). - P. 435-438.
- 331.** Vyas, S. Co-release of acetylcholine, glutamate and taurine from synaptosomes of Torpedo electric organ / S. Vyas, H. F. Bradford // *Neuroscience Letters*. - 1987. - Vol. 82(1). - P. 58-64.
- 332.** Vyskocil, F. Non-quantal release of transmitter at mouse neuromuscular junction and its dependence on the activity of Na⁺-K⁺ ATP-ase / F. Vyskocil, P. Illés // *Pflugers Archive: European journal of physiology*. - 1977. - Vol. 370(3). - P. 295-297.
- 333.** Waerhaug, O. Demonstration of glutamate-like immunoreactivity at rat neuromuscular junctions by quantitative electron microscopic immunocytochemistry / O. Waerhaug, O. P. Ottersen // *Anatomy and Embryology (Berlin)*. - 1993. - Vol. 188(5). - P. 501-513.
- 334.** Wang, S. Z. Differential coupling of m1, m3, and m5 muscarinic receptors to activation of neuronal nitric oxide synthase / S. Z. Wang, S. Y. Lee, S. Z. Zhu, E. E. El-Fakahany // *Pharmacology*. – 1996. – Vol. 53. – P. 271—280.

- 335.** Wang, T. Nitric oxide mediates activity-dependent synaptic suppression at developing neuromuscular synapses / T. Wang, Z. Xie, B. Lu // *Nature*. – 1995. – Vol. 374. – P. 262–266.
- 336.** Watkins, J. C. Pharmacology of excitatory amino acid transmitters / J. C. Watkins // *Advances in Biochemical Psychopharmacology*. - 1981. - Vol. 29. - P. 205-212. Review.
- 337.** Weinberg, C. B. Junctional form of acetylcholinesterase restored at nerve-free endplates / C. B. Weinberg, Z. W. Hall // *Developmental Biology*. - 1979. - Vol. 68(2). - P. 631-635.
- 338.** Wessler, I. Beta-adrenoceptor stimulation enhances transmitter output from the rat phrenic nerve / I. Wessler, S. Anshütz // *British Journal of Pharmacology*. - 1988. - Vol. 94(3). - P. 669-674.
- 339.** Wildemann, B. Nitric oxide and cyclic GMP induce vesicle release at *Drosophila* neuromuscular junction / B. Wildemann, G. Bicker // *Journal of Neurobiology*. - 1999. - Vol. 39(3). - P. 337-346.
- 340.** Witzemann, V. Development of the neuromuscular junction / V. Witzemann // *Cell and Tissue Research*. - 2006. - Vol. 326(2). - P. 263-271. Review.
- 341.** Wolosker, H. Inhibition of creatine kinase by S-nitrosoglutathione / H. Wolosker, R. Panizzutti, S. Engelender // *FEBS Letters*. – 1996. – Vol. 392. – P. 274–276.
- 342.** Wood S.J. Safety factor at the neuromuscular junction / S.J. Wood, C.R. Slater // *Progress in Neurobiology*. - 2001. – Vol. 64. – P. 393-429.
- 343.** Wood, S. J. The contribution of postsynaptic folds to the safety factor for neuromuscular transmission in rat fast- and slow-twitch muscles / S. J. Wood, C.R. Slater // *The Journal of Physiology*. - 1997. - Vol. 500 (Pt 1). - P. 165-176.
- 344.** Wotta, D. R. M1 muscarinic receptors stimulate rapid and prolonged phases of neuronal nitric oxide synthase activity: involvement of different calcium pools / D. R. Wotta, A. M. Parsons, J. Hu, A. W. Grande, E. E. El-Fakahany // *Journal of Neurochemistry*. - 1998. - Vol. 71(2). - P. 487-497.

- 345.** Wotta, D. R. Muscarinic receptor mediated activation of nitric oxide synthase / D. R. Wotta, E. E. El-Fakahany // *Drug Discovery Research*. – 1997. – Vol. 40. – P. 205—214.
- 346.** Wu, H. To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly / H. Wu, W. C. Xiong, L. Mei // *Development*. - 2010. - Vol. 137(7). - P. 1017-1033.
- 347.** Wyllie, D. J. Single-channel currents from recombinant NMDA NR1a//NR2D receptors expressed in *Xenopus* oocytes / D. J. Wyllie, P. Béhé, M. Nassar, R. Schoepfer, D. Colquhoun // *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*. - 1996. - Vol. 263(1373). - P. 1079-1086.
- 348.** Wyse, A. T. Arginine administration decreases cerebral cortex acetylcholinesterase and serum butyrylcholinesterase probably by oxidative stress induction / A. T. Wyse, F. M. Stefanello, F. Chiarani, D. Delwing, C. M. Wannmacher, M. Wajner // *Neurochemical Research*. - 2004. - Vol. 29(2). - P. 385-389.
- 349.** Yu, H. M. Coupling between neuronal nitric oxide synthase and glutamate receptor 6-mediated c-Jun N-terminal kinase signaling pathway via S-nitrosylation contributes to ischemia neuronal death / H. M. Yu, J. Xu, C. Li, C. Zhou, F. Zhang, D. Han, G. Y. Zhang // *Neuroscience*. - 2008. - Vol. 155(4). - P. 1120-1132.
- 350.** Yurchenco, P. D. Basal lamina assembly / P. D. Yurchenco, J. J. O'Rear // *Current Opinion in Cell Biology*. - 1994. - Vol. 6(5). - P. 674-681. Review.
- 351.** Zhorov, B. S. Potassium, sodium, calcium and glutamate-gated channels: pore architecture and ligand action / B. S. Zhorov, D. B. Tikhonov // *Journal of Neurochemistry*. - 2004. - Vol. 88(4). - P. 782-799. Review.
- 352.** Zhuo, M. Long-term depression: a learning-related type of synaptic plasticity in the mammalian central nervous system / M. Zhuo, R. D. Hawkins // *Reviews in the Neurosciences*. - 1995. - Vol. 6(3). - P. 259-277.
- 353.** Ziskind-Conhaim, L. Acetylcholinesterase is functional in embryonic rat muscle before its accumulation at the sites of nerve-muscle contact / L. Ziskind-

Conhaim, N. C. Inestrosa, Z. W. Hall // *Developmental Biology*. - 1984. - Vol. 103(2). - P. 369-377.