

## НАРУШЕНИЕ РЕГУЛЯЦИИ СИСТЕМЫ цАМФ В ОБОНЯТЕЛЬНЫХ НЕЙРОНАХ В МОДЕЛИ ШИЗОФРЕНИИ, ИНДУЦИРУЕМОЙ ВВЕДЕНИЕМ (+)-МК-801 КРЫСАМ

© 2022 г. Е.В. Бигдай, А.А. Синегубов

*Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6*

*E-mail: artem\_sinegubov@aol.com*

Поступила в редакцию 06.12.2021 г.

После доработки 06.12.2021 г.

Принята к публикации 19.01.2022 г.

Одним из ключевых патогенетических звеньев шизофрении является нарушение хода развития нервной системы. Сходные изменения наблюдаются в рамках модели данной патологии, индуцируемой введением антагонистов NMDA-рецепторов на ранних стадиях развития. В работе продемонстрировано, что в данной модели шизофрении проявляются функциональные изменения в одном из крупных очагов постнатального нейрогенеза — обонятельном нейроэпителии. Обонятельные сенсорные нейроны модельных животных обладают сниженной чувствительностью к активатору аденилатциклазы и нарушениями регуляции ее активности со стороны кальмодулин-зависимых сигнальных путей.

*Ключевые слова:* обоняние, шизофрения, нейрогенез, NMDA

**DOI:** 10.31857/S0006302922020107

Шизофрения — сложное психическое заболевание, клеточные и молекулярные субстраты которого до конца не изучены. Современные представления о патофизиологии этого заболевания особое внимание уделяют глутаматэргической системе, в первую очередь связанной с функционированием NMDA-рецепторов. Накопленные данные позволяют говорить о данной патологии как о болезни развития нервной системы, при которой ведущим звеном патогенеза является аномальный ход нейрогенеза [1].

Циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) играет очень важную роль в различных типах клеток, включая нейроны, поскольку влияет на развитие клеточного цикла, и при повышении его внутриклеточного содержания подавляет митогенную передачу сигналов через фосфорилирование протеинкиназой А фактора Raf. Доказана роль циклического аденозинмонофосфата в механизме формирования наркотической зависимости, обусловленной аномальной его регуляцией в нейронах коры головного мозга, полосатого тела и голубого пятна. Показана роль цАМФ-за-

висимых транскрипционных факторов в механизме развития алкоголизма [2].

Исследования на трансгенных животных установили, что цАМФ-сигнализация важна для обучения и памяти, как для ее приобретения, так и для потери контекстной памяти [3]. Сигнальный путь цАМФ вовлекается в регуляцию нейрогенеза, выживаемости нейронов и синаптической связи, которые участвуют в патогенезе депрессии [4].

Синтез цАМФ изменен при ряде нейропсихических расстройств, включая шизофрению. Так, в тромбоцитах у пациентов с шизофренией обнаружено снижение его продукции [5]. При исследовании остроты обоняния у пациентов с шизофренией с помощью одорантов, трансдукция которых вовлекает внутриклеточный цАМФ, было показано, что внутриклеточные сигнальные пути цАМФ разрегулированы при шизофрении, и разрегулированная цАМФ-сигнализация может вносить вклад в патогенез шизофрении [6].

При использовании вестерн-блот-анализа и посмертных образцов из хорошо охарактеризованной коллекции пожилых пациентов с шизофренией было показано, что белки и фосфопротеины, содержащие митоген-активированную протеинкиназу и цАМФ-связанные сигнальные пути аномально экспрессируются в передней по-

*Сокращения:* цАМФ — циклический аденозинмонофосфат, PDE — фосфодиэстераза, АСП — аденилатциклаза III, ОСН — обонятельный сенсорный нейрон, ЦНС — центральная нервная система, IBMX — 3-изобутил-1-метилксантин, СаМ — кальмодулин.

ясной извилине и дорсолатеральной префронтальной коре при шизофрении. Ассоциированный с митоген-активированной протеинкиназой путь активирует факторы транскрипции, влияющие на обучение, память, пролиферацию клеток и апоптоз [7–9].

Следует отметить, что концентрация цАМФ изменяется при шизофрении не только в цитозоле различных клеток, но и во внеклеточном пространстве. Уровни цАМФ уменьшаются в обонятельной слизи у этих пациентов, и измерения обонятельной остроты и циклических нуклеотидов в носовой слизи предлагаются для выявления патологии у пациентов, которые жалуются на потерю обоняния [10].

Помимо цАМФ при шизофрении изменяется активность протеинкиназы А. Это один из ключевых ферментов цАМФ-сигнального пути, который обеспечивает многочисленные клеточные реакции, зависящие от фосфорилирования белков. Следовательно, дисфункции в различных компонентах передачи сигналов цАМФ могут быть вовлечены в патогенез шизофрении [11].

Как известно, концентрация внутриклеточного цАМФ регулируется посредством таких клеточных механизмов, как активация аденилатциклазы, гидролизующей АТФ с образованием цАМФ, и фосфодиэстеразы (PDE), понижающей концентрацию цАМФ в цитозоле. Обнаружено одиннадцать изоформ этого фермента. Так, PDE4 специфически гидролизует цАМФ и широко экспрессируется во многих типах клеток и тканях, включая нервные клетки.

В 1970-х годах была разработана концепция «циклической нуклеотидной системы» как мощного инструмента, расширяющего возможности для исследования лекарств. Эта система помимо цАМФ включает аденилатциклазы и фосфодиэстеразы. При этом большое внимание было сосредоточено на цАМФ-PDE и цГМФ-PDE, которые рассматривались как мишени для разработки новых лекарств, в частности, для улучшения когнитивных функций. Были разработаны специфические ингибиторы PDE4 для многих заболеваний, среди которых болезнь Альцгеймера, когнитивные нарушения, болезнь Паркинсона, депрессия и шизофрения [12]. По мнению авторов, профилактика и лечение этих заболеваний требует понимания изменений механизмов внутриклеточной передачи сигналов, связанных с нарушением регуляции изофермента PDE, а также других компонентов сигнальной системы цАМФ.

Показано, что PDE вовлекается в процесс нарушения регуляции внутриклеточной сигнальной системы цАМФ при шизофрении. В этом сигнальном пути участвует DISC1 – белок, кодируемый одноименным геном. Предполагается, что функциональные изменения во взаимодей-

ствии между DISC1 и PDE4 будут влиять на катаболизм митохондриального цАМФ с сопутствующим физиологическим и психиатрическим исходом. Объединяющая связь между шизофренией и биполярным аффективным расстройством, а также между DISC1 и PDE4 может происходить на когнитивном уровне обучения и памяти и на молекулярном уровне передачи сигналов цАМФ [13]. Не случайно PDE4 является неотъемлемым компонентом механизмов действия различных классов антидепрессантов [12].

В регуляции уровня цАМФ в клетках помимо PDE участвует второй механизм – активность аденилатциклазы. У млекопитающих клонировано и охарактеризовано по крайней мере девять близко родственных изоформ аденилатциклазы, каждая из которых кодируется разными генами на разных хромосомах.

Отдельные изоформы аденилатциклазы предложены в качестве инструментов для исследования специфических механизмов, вовлекающихся в реакции клеток различного типа на их стимуляцию. Например, аденилатциклаза I предложена как детектор для исследования механизмов стимуляции с участием  $\alpha s$  субъединицы G-белка и кальций/кальмодулина, а аденилатциклаза II – для исследования механизмов стимуляции, в которые вовлекаются  $\alpha s$  субъединица и  $\beta\gamma$ -димер G-белка или PKC; аденилатциклаза V или аденилатциклаза VI были предложены в качестве детекторов для ингибирования, в механизме которого принимает участие кальций (или NO для аденилатциклазы VI) [15].

В настоящее время внимание к себе стала привлекать аденилатциклаза III (ACIII). Впервые ее обнаружили в обонятельном нейроэпителии, где она локализуется в обонятельных жгутиках сенсорных нейронов и является важным компонентом механизма обонятельной трансдукции. Однако помимо основного компонента в механизме обонятельной трансдукции ACIII играет незаменимую роль в постнатальном созревании обонятельных сенсорных нейронов (ОН) и поддержании ультраструктуры обонятельных жгутиков у мышей в течение всего взрослого периода [16].

Вместе с тем ACIII экспрессируется и в других типах клеток, локализуясь в так называемых первичных ресничках, и играет там важную роль. Так, длина этих ресничек строго контролируется, поскольку укорочение их вызывает такие тяжкие последствия, как полицистоз почек или гидроцефалия. Регуляторную роль в нормальном цилиогенезе выполняет ACIII-цАМФ-сигнальный путь [17]. Он обнаруживается в первичных ресничках в фибробластах, синовиоцитах, астроцитах, а также в плазматической мембране первичных ресничек почти всех нейронов в мозге взрослых мышей

и может использоваться в качестве их маркера [18].

Известно, что от астроцитов в субвентрикулярной зоне первичная ресничка вытягивается в полость желудочка, заполненную спинномозговой жидкостью, и служит механизмом, с помощью которого эти ненейронные клетки определяют химический состав окружающей их среды. Тот факт, что некоторые астроциты экспрессируют АСШ-положительные реснички, указывает на то, что в них цАМФ участвует в качестве вторичного мессенджера для воздействия на клеточные процессы. Эти данные обеспечиваются дополнительным механизмом, который может влиять на роль астроцитов в регуляции синаптической передачи в нервной системе [18].

АСШ локализуется также в ресничках клеток сосудистого сплетения в мозге. Сосудистые сплетения – это структуры, обнаруженные в боковых, третьем и четвертом желудочках головного мозга; их основные функции – производство и гомеостазис спинномозговой жидкости. Некоторые клетки сосудистого сплетения имеют небольшие пучки подвижных ресничек, другие же клетки – единственную первичную ресничку. Разрушение этих ресничек связано с повышенным содержанием хлора в спинномозговой жидкости в сочетании с гидроцефалией. Интересно, что повышенный уровень хлоридов в спинномозговой жидкости сочетается с повышенной внутриклеточной концентрацией цАМФ в эпителии сосудистого сплетения. Таким образом, нарушение регуляции АСШ-опосредованной передачи сигналов цАМФ в эпителиальных клетках может быть причиной возникновения гидроцефалии [19].

Активность аденилатциклазы в первичных ресничках нейронов центральной нервной системы (ЦНС) может иметь решающее значение для некоторых форм обучения и памяти. АСШ является ключевым медиатором передачи сигналов цАМФ в первичных ресничках мозга. Поскольку она экспрессируется в первичных ресничках нейронов гиппокампа, исследовали АСШ<sup>-/-</sup> мышей на наличие нескольких форм обучения и памяти показали, что АСШ<sup>-/-</sup> у мышей наблюдается нарушение обучаемости и памяти на временное диссоциативное пассивное избегание. Так как АСШ экспрессируется исключительно в первичных ресничках, это означает, что сигналы цАМФ, которые генерируются внутри первичных ресничек, способствуют некоторым формам обучения и памяти, включая потерю контекстуальной обусловленности страха [4].

У мышей с генетическим нокаутом аденилатциклазы АСШ в обонятельном эпителии уменьшается продукция цАМФ, что приводит к депрессии и вызывает тревогу. Эти состояния связаны с подавлением дофаминергической системы и экс-

прессии GluN2B-субъединицы NMDA-рецепторов в гиппокампе [5]. Таким образом, нарушения в ЦНС, связанные с функционированием дофаминергической и глутаматергической системами являются результатом отсутствия или потери АСШ в обонятельном эпителии. АСШ в основном обонятельном эпителии играет жизненно важную роль в патофизиологии депрессии и тревожного состояния.

АСШ в первичных ресничках нейронов регулирует морфологию дендритов, подтверждая тот факт, что потеря АСШ ведет к атрофии нейронов. Общегеномное ассоциативное исследование у людей недавно выявило причастность аденилатциклазы III к большому депрессивному расстройству в результате потери синапсов и соответственно изменения нейрональной активности в лимбической и корковой областях. Более того, уровень экспрессии АСШ в крови считается биомаркером депрессии у людей. Исследование на мышцах продемонстрировало, что потеря АСШ у них приводит к снижению нейрональной активности, изменению режима сна и поведению, подобному депрессии, предоставляя убедительные доказательства, подтверждающие, что АСШ является геном-кандидатом [20]. Это исследование также предполагает новую стратегию борьбы с депрессией, направленную на внутриклеточную сигнальную систему цАМФ, в частности, в ресничках нейронов.

Значительное снижение экспрессии АСШ обнаружено в обонятельном сенсорном эпителии у больных шизофренией [21].

Признание проблем, связанных с нарушением регуляции системы цАМФ при шизофрении, послужило поводом для разработки кандидатных молекулярных подходов в определении причин, лежащих в основе патологии развития при шизофрении [22]. Существует множество доказательств того, что, по крайней мере, когнитивные и негативные симптомы шизофрении являются результатом дисфункции глутаматергической системы. Литературные данные свидетельствуют о дефиците функции NMDA-рецепторов при шизофрении, что является одной из основных причин этого заболевания [23].

NMDA-рецепторы на нейронах гиппокампа и церебрального кортикального слоя участвуют в процессах обучения и памяти, вовлекая в этот процесс цАМФ-зависимую PDE4 [4]. Вместе с тем показано, что активация NMDA-рецепторов вызывает повышение концентрации цАМФ в области CA1 гиппокампа посредством активации аденилатциклазы, что свидетельствует о том, что метаболизм циклического АМФ играет важную роль в индукции зависимой от NMDA-рецепторов долговременной потенциации в области CA1 гиппокампа [22]. Поэтому ослабление функции

NMDA-рецепторов при шизофрении может инициировать нарушение регуляции системы цАМФ в нейронах ЦНС через снижение активности АСШ и служить одним из молекулярных механизмов, лежащих в основе этого заболевания [23].

Следует отметить, что важную информацию о функционировании этого фермента в нейронах ЦНС в норме и при дисфункции NMDA-рецепторов может дать изучение активности АСШ в ОСН, поскольку появляется все больше свидетельств того, что обонятельная дисфункция является эндофенотипом шизофрении, таким образом, биологические основы обонятельной дисфункции могут дать ключ к патофизиологическим механизмам, влияющим на нейроны в различных областях мозга [27]. Учитывая многие известные клеточные и молекулярные сходства в нейрогенезе, дифференцировке и созревании между обонятельным эпителием и центральной нервной системы, исследование регуляции внутриклеточной цАМФ сигнализации в ОСН полезно для понимания аномального развития нервной системы при шизофрении [28].

Однако, как видно из выше изложенного, ферментативная активность АСШ определялась либо посредством биохимического анализа в изолированных и суспендированных мембранных препаратах обонятельных жгутиков [29], либо при оценке уровня ее экспрессии в обонятельном эпителии у пациентов с шизофренией, либо по концентрации цАМФ в тромбоцитах и обонятельной слизи у этих пациентов. Нам не удалось обнаружить данные, полученные при прямой стимуляции АСШ в норме и при патологии.

Поэтому в данной работе мы попытались ответить на вопрос, изменяется ли активность самой АСШ без влияния на нее сопряженного с ней G-белка при шизофрении.

Для этого мы исследовали прямую стимуляцию АСШ, минуя ее рецептор-сопряженную активацию, в изолированных обонятельных сенсорных нейронах ОСН крыс линии Вистар в контроле и в модели шизофрении, индуцируемой введением (+)-МК-801.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали изолированные обонятельные сенсорные нейроны крыс линии Вистар, полученных из ЦКП «Биоколлекция» Института физиологии РАН. Как известно, ОСН представляют модель клеток, полученных из обонятельного эпителия, в качестве модельной системы для изучения молекулярных механизмов, участвующих в шизофрении и других нервно-психических расстройствах. Недавние исследования патофизиологии шизофрении с использованием этой модели позволили

получить представление о связанных с шизофренией изменениях в развитии нервной системы, реакции на стресс и путях регуляции экспрессии генов [30].

Обонятельные клетки в первичной культуре являются функционально зрелыми, экспрессирующими рецепторные и внутриклеточные механизмы не только для обонятельной трансдукции (в частности, АСШ), но и для нейромедиаторных путей, участвующих в психоневрологических расстройствах, таких как биполярная депрессия или шизофрения [24].

Животных, предварительно анестезированные с применением эфира, подвергали цервикальной дислокации. Препарирование обонятельных завитков I–IV проводили на льду при постоянном орошении аэрированным буферным раствором следующего состава: 150 мМ NaCl, 20 мМ HEPES, 5 мМ D-глюкозы, 5 мМ KCl, pH 7.4. Изолированные фрагменты обонятельного эпителия с подлежащей соединительной тканью инкубировали в буферном растворе с добавлением 1% фракции V бычьего альбумина и 1 мг/мл коллагеназы типа IV в течение 15 мин при 37°C. Раствор декантировали и ткань дополнительно дважды промывали буферным раствором без добавок.

Суспензию диссоциированных клеток готовили путем тритурирования с использованием полированных в пламени горелки стеклянных пипеток в буферном растворе (145 мМ NaCl, 20 мМ HEPES, 5 мМ D-глюкозы, 5 мМ KCl, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4) с добавлением 1% (w/v) фракции V бычьего альбумина для обеспечения более равномерного окрашивания препарата, поскольку липофильные флуоресцентные красители склонны к образованию эмульсии в водных растворах. Полученную суспензию смешивали с 1 мМ стоковым раствором флуоресцентного красителя Фура-2-ацетоксиметилового эфира (Fura-2 AM) в безводном диметилсульфоксиде до конечной концентрации 5 мкМ. Суспензию помещали на предварительно обработанные поли-1-лизином стекла и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Остатки неосажденной суспензии однократно отмывали от стекол буферным раствором.

Активность АСШ в ОСН в ответ на стимуляцию оценивали посредством прижизненной флуоресцентной микроскопии по изменению интенсивности свечения Fura-2 AM, характеризующей изменение содержания ионов кальция в цитозоле ОСН. Для этого препарат помещали в открытую камеру объемом 500 мкл на предметный столик микроскопа МИКМЕД-2 (ЛОМО, Россия), оснащенного камерой, дихроичным зеркалом и светофильтрами для выделения полосы возбуждения люминесценции 380 нм и эмиссии 510 нм. Регистрацию сигнала проводили с помощью программы VirtualDub 2.1.

Для прямой стимуляции АСПИ применяли форсколин. Его высокие концентрации обнаруживаются исключительно в нейронах, что позволяет отделить в ходе анализа нейрональную фракцию от всех прочих клеток в смешанной первичной культуре из обонятельного нейроэпителлия. Помимо форсколина применение ацетоксиметилловых эфиров дополнительно позволяет выявить нейрональные клетки в смеси других типов клеток, так как он относительно селективно метаболизируется в них. Чтобы получить реакцию на стимуляцию только АСПИ, исключив активность PDE, применяли смесь из 15 мкМ форсколина, специфического активатора аденилатциклаза, и 100 мкМ 3-изобутил-1-метилксантина (IBMX) — эффективного блокатора  $Ca^{2+}$ /кальмодулин-зависимой PDE в обонятельных нейронах [31]. Таким образом, наблюдаемые изменения концентрации внутриклеточного кальция будут обусловлены накоплением цАМФ и последующей активацией циклонуклеотид-зависимых  $Ca^{2+}$ -каналов.

Роль механизмов регуляции аденилатциклазной системы оценивалась с помощью LY294002 и кальмидазолия хлорида — ингибиторов соответственно фосфоинозитид-3-киназы и кальмодулина. Применяемые в опыте концентрации подбавляли эмпирически.

Эксперименты проводили на модели шизофрении, индуцируемой введением (+)-МК-801. (+)-МК-801 представляет собой антагонист NMDA-рецептора, который является основой для глутаматной модели шизофрении, а индуцируемая им социальная изоляция крыс является признанной моделью негативных симптомов шизофрении [32].

Протокол введения препарата основывался на литературных данных, в которых была продемонстрирована способность (+)-МК-801 индуцировать персистирующие изменения в поведении и развитии нервной системы при системном введении в ранний постнатальный период. Инъекции производились с частотой один раз в сутки подкожно в дозировке 0.5 мг на килограмм в течение первой недели жизни. В качестве контрольной группы выступали животные из того же помета, получавшие 0.9% раствор NaCl равного объема [33].

Обработку полученных изображений и квантификация уровней флуоресценции проводили с помощью программы FIJI (NIH, США). Для этого каждую отдельную клетку отмечали как ROI (region of interest). Для каждого отдельного ROI измеряли средний уровень интенсивности сигнала и выражали его в единицах, представляющих собой отношение интенсивности в данный момент времени к усредненной интенсивности сигнала в отсутствие стимуляции. Для статистиче-

ской обработки данных применяли статистический пакет STATISTICA Base. Статистическую значимость полученных данных оценивали с помощью дисперсионного анализа.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Визуальные наблюдения за крысами, которым вводили (+)-МК-801, выявили характерные для шизофрении негативные симптомы. В частности, животные были социально изолированы. В отличие от контрольной группы крысы, получавшие препарат, проводили значительное количество времени на удалении от матери и при принудительном отделении от общей группы не возвращались назад. Таким образом, эти результаты дают основание для заключения о том, что изменения во внутриклеточной сигнализации, которые мы ожидаем получить в ОСН от животных в модели шизофрении в нашей работе, позволят говорить о клеточных и молекулярных механизмах, которые лежат по крайней мере в основе негативной симптоматики.

Активность АСПИ оценивали по изменению интенсивности флуоресценции Fuga-2 в ответ на стимуляцию. Уменьшение сигнала свидетельствовало о нарастании концентрации внутриклеточного кальция. Результаты наших исследований выявили, что под действием смеси форсколина (15 мкМ) и 3- IBMX (100 мкМ) во всех случаях наблюдалось уменьшение флуоресценции в клетках контрольной группы на  $18.5 \pm 3.6\%$  ( $n = 48$ ;  $p = 0.05$ ), а у экспериментальных животных — на  $16.4 \pm 4.1\%$  ( $n = 54$ ;  $p = 0.05$ ). Следовательно, при активации АСПИ совместно с ингибированием PDE концентрация цитозольного кальция в ОСН увеличивалась как в контрольной, так и в экспериментальной группе животных. Как видно, в экспериментальной группе реакция на стимуляцию АСПИ форсколином, увеличивающим ее активность, статистически значимо была меньше, чем в контроле. Вероятно, это обусловлено ослаблением активации фермента в нейронах в группе животных с измененной функцией NMDA-рецепторов.

Известно, что кальмодулин (CaM) модулирует активность ряда компонентов пути обонятельной трансдукции. Показано, что обонятельные жгутики содержат кальмодулин. Поэтому мы предположили, что изменения в системе внутриклеточной сигнализации могут частично объяснить различия в реакциях на стимуляцию АСПИ в обеих группах.

Для этого выполняли преингибирование кальмодулина в течение 15 мин с помощью кальмидазолия хлорида (100 мкМ), с последующей стимуляцией смесью форсколина (15 мкМ) и IBMX (100 мкМ). Оказалось, что, как и в предыдущей

серии, интенсивность флуоресценции под действием стимулирующей АСП смеси падала, свидетельствуя о накоплении  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле ОСН. Однако на фоне ингибирования СаМ амплитуда сигнала в обеих группах была выше, чем при сохранении его активности. Так, в контрольной группе она достигала  $21.14 \pm 3.7\%$  ( $n = 61$ ;  $p = 0.05$ ), а в экспериментальной —  $17.9 \pm 4.1\%$  ( $n = 45$ ;  $p = 0.05$ ).

Следовательно, меньшая реакция обонятельных сенсорных нейронов на смесь раздражителей в первой серии экспериментов обусловлена, вероятно, ингибирующим действием СаМ, которое распространяется и на клетки животных, инъецированных (+)-МК-801.

Другим ферментом, опосредующим ингибирование пути обонятельной трансдукции, является фосфоинозитид-3-киназа. Мы предположили, что она может модулировать активность аденилатциклазы III в ОСН. Для проверки нашего предположения мы перед стимулированием в течение 15 мин предварительно ингибировали клетки в LY294002 (100 мкМ). Реакцию на стимул регистрировали от 43 клеток контрольных и 49 клеток экспериментальных животных. Результаты анализа показали, что на фоне ингибирования фосфоинозитид-3-киназы интенсивность флуоресценции под действием стимуляции смесью раздражителей статистически значимо не изменялась в обеих группах по сравнению с той, которая регистрировалась в отсутствие ингибитора. Таким образом, фосфоинозитид-3-киназа не влияла на активность сигнального пути цАМФ в обонятельных сенсорных нейронах как в контрольных, так в опытных образцах.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Введение антагонистов NMDA-рецепторов грызунам является одной из наиболее продуктивных моделей шизофрении, используемой на доклиническом этапе разработки препаратов. Ее характерной чертой является высокое сходство нейробиологических изменений с таковыми у больных и наличие в спектре эффектов так называемых «негативных симптомов», составляющих облигатные диагностические критерии для шизофрении. Наиболее полно они проявляются в случае хронического и субхронического введения и не угасают в течение длительного времени после прекращения действия препарата [1]. Первая неделя жизни крыс является критическим периодом в развитии обонятельного эпителия и синаптических связей с нейронами обонятельной луковицы. Исходя из предположения, что (+)-МК-801 может нарушать процесс развития обонятельной системы, препарат вводили именно в данный период.

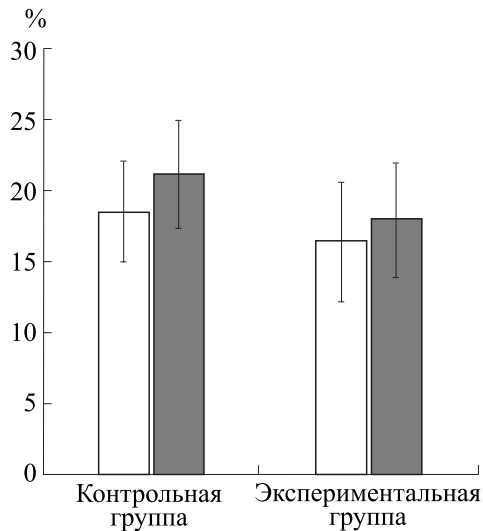
Результаты анализа полученных данных показали, что при прямой стимуляции АСП форсколином повышается концентрация ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в ОСН обеих групп. Как известно, активированная АСП осуществляет гидролиз АТФ, продуцируя цАМФ. В условиях ингибирования PDE концентрация цАМФ в цитозоле увеличивается еще больше. Рост содержания цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  при этом достигается за счет его входа через циклонуклеотид-зависимые (CNG)  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы, экспрессируемые в обонятельных жгутиках разных животных, включая крыс [28].

Однако, как следует из наших результатов, реакция ОСН на смесь форсколина и IBMX была значимо меньше в обонятельных сенсорных нейронах от крыс, инъецированных антагонистом NMDA-рецепторов. В этих клетках меньше аккумулировалось кальция под действием смеси раздражителей в результате, вероятно, инактивации  $\text{Ca}^{2+}$ -тока. Можно предположить, что подавление любой из ступеней каскада передачи сигнала может способствовать этому процессу. Мы в наших опытах стимулировали напрямую АСП, минуя мембранные рецепторы.

Следовательно, более слабую флуоресценцию, наблюдаемую нами в ОСН, стимулируемых смесью форсколина и IBMX у опытных животных, можно объяснить ослабленной активацией АСП при шизофрении, инициируемой введением МК-801. Наше предположение согласуется с данными, полученными на ОСН у пациентов с шизофренией. В них падала активность сопряженного с АСП G-белка и значительно уменьшалась экспрессия АСП, приводя к небольшой продукции цАМФ [28].

Вероятно, аномальная активность АСП в нашей работе является результатом подавленной функции NMDA-рецепторов, которые активирует АСП в нейронах ЦНС и обонятельных сенсорных нейронах у крыс, получавших инъекции (+)-МК-801. Такое предположение основывается на том, что NMDA-рецепторы экспрессируются не только в нейронах ЦНС, но и в ОСН [21]. А при шизофрении, как известно, функция NMDA-рецепторов ослаблена, что является одной из основных причин этого заболевания [36]. Поэтому разрегуляция внутриклеточной сигнальной системы цАМФ в нейрональной ткани, наблюдаемая при шизофрении, вероятно, объясняется недостаточной активацией АСП посредством NMDA-рецепторов, вызывая уменьшение потока  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоль через CNG-каналы и снижение возбудимости ОСН, которую наблюдают у пациентов с шизофренией.

Однако следует отметить, что в общий кальциевый ток вносят вклад ионы, входящие через NMDA-рецепторы, проницаемые для  $\text{Ca}^{2+}$ . Вы-



Изменение флуоресценции обонятельных нейронов под действием стимула в контрольной и экспериментальной группах: светлые столбики – ИБМХ + форсколин, темные столбики – ИБМХ + форсколин + кальмидазолия хлорид.

ше было сказано, что под действием (+)-МК-801 уменьшается вероятность их открытых состояний и, как следствие, их проницаемость для  $\text{Ca}^{2+}$ . Возможно, и этот фактор обуславливает более слабый флуоресцентный сигнал ОСН в ответ на стимуляцию, а значит, меньшую концентрацию внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в ОСН крыс, инъектированных (+)-МК-801. И в этом случае уменьшение входящего тока кальция в нейроны будет вносить вклад в изменение возбудимости ОСН.

Полученные нами данные позволяют предположить, что подавление функции NMDA-рецепторов при шизофрении вызывает подавление активности нейронов ЦНС по двум механизмам, приводящим к падению концентрации цитозольного кальция: с одной стороны – через разрегуляцию системы цАМФ, а с другой – благодаря ослаблению собственной функции NMDA-рецепторов.

Известно, что в регуляции активности АСIII, не зависимой от сопряженного с ней G-белка, в обонятельных рецепторных нейронах и нейронах ЦНС участвует кальмодулин, который активирует аденилатциклазу III [29]. В  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-зависимую активацию АСIII вовлекаются также NMDA-рецепторы.

Чтобы проверить роль CaM в регуляции клеточного ответа на стимуляцию форсколином и ИБМХ, ОСН предварительно ингибировали кальмидазолием. Мы ожидали, что ингибирование CaM, снижая активность Ca/CaM-зависимой АСIII, будет уменьшать реакцию ОСН на стиму-

ляцию. Однако результаты выявили противоположную реакцию на смесь форсколина с ИБМХ как в контрольной, так и в опытной группе животных. Анализ наших результатов выявил достоверное увеличение реакции на стимул в обеих группах по сравнению с той, которая наблюдалась при сохранении активности CaM (см. рисунок).

Увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле может обуславливаться не только активацией АСIII, но и ингибированием PDE. Как указано выше, в своих экспериментах стимуляцию АСIII форсколином мы осуществляли вместе с ИБМХ – ингибитором Ca/CaM-зависимой PDE, особенно эффективным в ОСН [30].  $\text{Ca}^{2+}$  может активировать  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-зависимую PDE, тем самым снижая локальную концентрацию cAMP. Однако на  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимое ингибирование этой PDE не влияют ингибиторы кальмодулина [39]. Следовательно, снижая активность АСIII, мы сохраняем влияние ИБМХ на PDE. Казалось бы, на фоне ингибирования  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-зависимой PDE в отсутствие синтеза цАМФ посредством АСIII трудно ожидать высокой продукции цАМФ, активирующей CNG-зависимые каналы и, вследствие этого, более высокий флуоресцентный сигнал на стимуляцию ОСН. Но полученные результаты расходятся с нашими ожиданиями.

В ОСН кальмодулин активирует также 3',5'-циклонуклеотид-зависимые фосфодиэстеразы [31]. Возможно, ингибирование кальмодулина в наших опытах снижает активность цАМФ-зависимой PDE, вызывая повышение содержания цАМФ в цитозоле. Показано, что из всех изоформ цАМФ гидролизуют только PDE4, PDE7 и PDE8, причем PDE4, которая вовлекается в регуляцию цАМФ при шизофрении, распространена в большинстве клеток, включая обонятельные нейроны [32]. Вместе с Ca/CaM-зависимой PDE они повышают концентрацию кальция выше исходной, что мы наблюдаем в наших опытах.

NMDA-рецепторы являются каналами, чьи физиологические свойства также регулируются внутриклеточным  $\text{Ca}^{2+}$ , способным ингибировать активность NMDA-рецепторного канала. В  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой регуляции NMDA-рецептора также участвует CaM, связывание с которым вызывает четырехкратное снижение вероятности открытия канала. Этот  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-зависимый механизм играет важную роль в защите от эксайтотоксической смерти клеток [33].

$\text{Ca}^{2+}$ /CaM ингибирует NMDA-рецепторные каналы, вызывая снижение концентрации цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ . При ингибировании CaM его блокирующее действие на NMDA-рецепторы пре-

кращается, вызывая ток  $\text{Ca}^{2+}$  через этот канал и повышение цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  в ответ на активацию АСП, что мы и видим в наших опытах. Но такой механизм работает при нормальном функционировании NMDA-рецепторов. В группе животных, инъецированных (+)-МК-801, этот рецептор заблокирован. Следовательно, можно было ожидать уменьшения реакции на стимуляцию ОСН. Однако мы зарегистрировали ее увеличение при ингибировании СаМ. Вероятно, в нервных клетках, принадлежащих группе крыс с моделью шизофрении, Са/СаМ-зависимая PDE вместе с цАМФ-зависимой PDE при их ингибировании повышают концентрацию кальция выше исходной.

Таким образом, можно предположить, что при шизофрении поддерживается более низкая концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в нервных клетках, чем у здоровых людей, в результате более низкой активности АСП, регулируемой NMDA-рецепторами, и совместной активности фосфодиэстераз, снижающих концентрацию цАМФ, продуцируемой посредством АСП, в результате чего падает  $\text{Ca}^{2+}$ -ток, снижая нейрональную активность.

Результаты, полученные в данной работе, дают основания полагать, что в модели шизофрении, индуцируемой введением (+)-МК-801, ингибирующего NMDA-рецепторы в нейронах ЦНС, а также в ОСН, снижается активность внутриклеточной сигнальной системы трансдукции, сопряженной с активностью аденилатциклаз. Суммарное снижение содержания кальция в цитозоле нейрональных клеток, обусловленное как ингибированием NMDA-рецепторов, так и ослаблением активности аденилатциклаз будет вызывать снижение нейрональной активности, подобную той, которую наблюдали у мышей с потерей АСП [34]. Это, в свою очередь, снизит эффективность синаптической передачи, синаптической пластичности, образование синапсов, в которых глутаматные NMDA-рецепторы/каналы играют важную роль [35].

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с применением животных проведены в соответствии с локальными этическими стандартами, принятыми в ИФ РАН и согласованными с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (СЕД №123).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. E.-J. Choi, Zh. Xia, and D. R. Storm, *Biochemistry* **31**, 6492 (1992).
2. J. Bradley, D. Reuter, and S. Frings, *Science* **294**, 2176 (2001).
3. J. Bradley, W. Bönigk, K.-W. Yau, and S. Frings, *Nat. Neurosci.* **7** (7), 705 (2004).
4. J. Hanoune and N. Defer, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**, 145 (2001).
5. Z. Wang, T. Phan, and D. R. Storm, *J. Neurosci.* **31** (15), 5557 (2011).
6. X. Liu, Y. Zhou, S. Li, et al., *J. Affective Disorders* **268**, 28 (2020).
7. B. I. Turetsky and P. J. Moberg, *Am J Psychiatry* **166** (2), 226 (2009).
8. Kyosseva S. *Int Rev Neurobiol* **59**, 201 (2004).
9. A. J. Funk, R. E. McCullumsmith, V. Haroutunian, and J. H. Meador-Woodruff, *Neuropsychopharmacology* **37**, 896 (2012).
10. N. Ma, T. Abel, and P. J. Hernandez, *Learn. Mem.* **16**, 367 (2009).
11. D. Tardito, G. B. Tura, L. Bocchio, et al., *Neuropsychopharmacology* **23** (2), 217 (2000).
12. T. Keravis and C. Lugnier *Brit. J. Pharmacol.* **165**, 1288 (2012).
13. J. K. Millar, B. S. Pickard, S. Mackie, et al., *Science* **310**, 1187 (2005).
14. A. R. Kuzel, M. Lodhi, and M. Rahim, *Cureus* **9** (11), e1878 (2007).
15. Z. Zhang, D. Yang, et al., *Front. Cell. Neurosci.* **11** (1) (2017).
16. Y. Ou, Y. Ruan, M. Cheng, et al., *Exp. Res.* **15**, 2802 (2009).
17. M. C. Antal, K. Beanardais, B. Samama, et al., *PLoS One* **12** (1), e0170756 (2017). DOI: 10.1371/journal.pone.0170756
18. G. A. Bishop, N. F. Berbar, J. Lewis, et al., *J. Comp. Neurol.* **505**, 562 (2007).
19. X. Chen, J. Luo, Y. Leng, et al., *Biol. Psychiatry* **80** (11), 836 (2006).
20. K. E. Borgmann-Winter, H.-Y. Wang, R. Ray, et al., *Schizophrenia Bull.* **42** (2) 377 (2016).
21. C. S. Weickert and D.R. Weinberger, *Schizophrenia Bull.* **24** (2), 303 (1998).
22. L. S. Pilowsky, R. A. Bressan, J. M. Stone, et al., *Mol. Psychiatry* **11**, 118 (2006).
23. D. Chetkovich and J. D. Sweatt, *J. Neurochem.* **61**, 1933 (1999).
24. K. E. Borgmann-Winter, N. E. Rawson, H.-Y. Wang, et al., *Neuroscience* **158** (2), 642 (2009).
25. S. E. Arnold, L. Y. Han, P. J. Moberg, et al., *Arch. Gen. Psychiatry* **58**, 829 (2001).
26. R. R. H. Anholt and A. M. Rivers, *Biochemistry*, **29** (17), 4049 (1990).



27. J. C. Neill, S. Barnes, S. Cook, et al., *Pharmacology & Therapeutics* **128**, 419 (2010).
28. S. C. Shirley, C. J. Robinson, K. Dickinson, et al., *Biochem. J.* **240**, 605 (1986).
29. R. H. Kramer and S. A. Siegelbaum, *Neuron* **9**, 897 (1992).
30. C. B. Klee, T. H. Crouch, and P. G. Richman, *Ann. Rev. Biochem.* **49**, 489 (1980).
31. M. Conti, D. Mika, and W. J. Richter, *Gen. Physiol.* **143** (1), 29 (2003).
32. M. D. Ehlers, S. Zhang, J.P. Bernhardt, R. L. Huganir, *Cell* **84**, 745 (1996).
33. J. Lavoie, A. Sawa, K. Ishizuka, *Curr. Opin. Psychiatry* **30** (3), 176 (2007).
34. I. B. Levitan, *Neuron* **22**, 645 (1999).

## **Dysregulation of the cAMP System in Olfactory Neurons in a Model of Schizophrenia Induced by Administration of (+)-MK-801 to Rats**

**E.V. Bigdai and A.A. Sinegubov**

*Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, nab. Makarova 6, St. Petersburg, 199034 Russia*

One of the key features of schizophrenia are neurodevelopmental abnormalities. Those can be reproduced in rodent model of schizophrenia by perinatal exposure to NMDA-receptor antagonists. Here we show that in this model (+)-MK-801 induces functional abnormalities in well-known neurogenic niche – olfactory neuroepithelium. Olfactory sensory neurons of model animals had lower activity of adenylyl cyclase associated with differences in calmodulin-dependent regulation of canonical olfactory signaling.

*Keywords: sense of smell, schizophrenia, neurogenesis, NMDA*