

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 αs субъединицы G-белка и кальций/кальмодулина, а аденилатциклаза II – для исследования механизмов стимуляции, в которые вовлекаются αs 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 (ОСН) 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^{-/-} мышей на наличие нескольких форм обучения и памяти показали, что АСШ^{-/-} 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 АСП 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 АСП 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 АСП 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 АСП в норме и при патологии.

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

Для этого мы исследовали прямую стимуляцию АСП, 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, АСП), 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 CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 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 АСП 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 Fura-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 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.

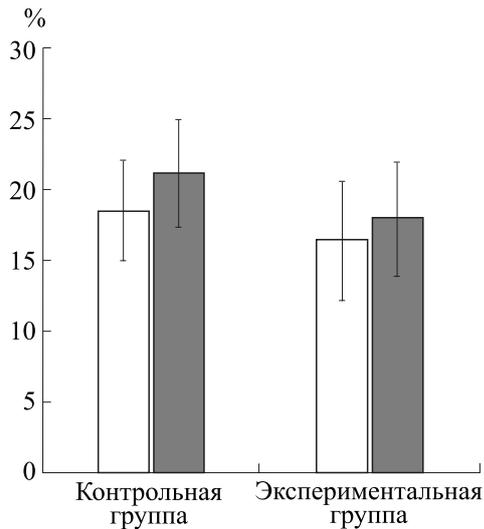
Результаты анализа полученных данных показали, что при прямой стимуляции АСП форсколином повышается концентрация ионов Ca^{2+} в ОСН обеих групп. Как известно, активированная АСП осуществляет гидролиз АТФ, продуцируя цАМФ. В условиях ингибирования PDE концентрация цАМФ в цитозоле увеличивается еще больше. Рост содержания цитозольного Ca^{2+} при этом достигается за счет его входа через циклонуклеотид-зависимые (CNG) 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 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 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 Ca^{2+} . Вы-



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

ше было сказано, что под действием (+)-МК-801 уменьшается вероятность их открытых состояний и, как следствие, их проницаемость для Ca^{2+} . Возможно, и этот фактор обуславливает более слабый флуоресцентный сигнал ОСН в ответ на стимуляцию, а значит, меньшую концентрацию внутриклеточного 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 Ca^{2+} /CaM-зависимую активацию АСIII вовлекаются также NMDA-рецепторы.

Чтобы проверить роль CaM в регуляции клеточного ответа на стимуляцию форсколином и IBMx, 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 IBMx 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 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 IBMx – ингибитором Ca/CaM-зависимой PDE, особенно эффективным в ОСН [30]. Ca^{2+} может активировать Ca^{2+} /CaM-зависимую PDE, тем самым снижая локальную концентрацию cAMP. Однако на Ca^{2+} -зависимое ингибирование этой PDE не влияют ингибиторы кальмодулина [39]. Следовательно, снижая активность АСIII, мы сохраняем влияние IBMx на PDE. Казалось бы, на фоне ингибирования 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 Ca^{2+} , способным ингибировать активность NMDA-рецепторного канала. В Ca^{2+} -зависимой регуляции NMDA-рецептора также участвует CaM, связывание с которым вызывает четырехкратное снижение вероятности открытия канала. Этот Ca^{2+} /CaM-зависимый механизм играет важную роль в защите от эксайтотоксической смерти клеток [33].

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

кращается, вызывая ток Ca^{2+} через этот канал и повышение цитозольного 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 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 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