
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**GluN3A-СУБЪЕДИНИЦА ОБРАЗУЕТ GluN3A-NMDAR И ВОЗБУЖДАЮЩИЙ
ГЛИЦИНОВЫЙ РЕЦЕПТОР В ОБОНЯТЕЛЬНЫХ СЕНСОРНЫХ НЕЙРОНАХ
ВЗРОСЛЫХ КРЫС ЛИНИИ ВИСТАР**

© 2025 г. Е. В. Бигдай¹ *, А. А. Зуйкова¹, А. М. Бармасова¹, А. А. Разинова¹,
А. В. Поздняков¹, Д. О. Иванов¹

¹Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: bigday50@mail.ru

Поступила в редакцию 12.01.2025 г.

После доработки 24.03.2025 г.

Принята к публикации 25.03.2025 г.

В статье представлены экспериментальные данные, полученные на изолированных обонятельных сенсорных нейронах (ОСН) взрослых крыс линии Вистар. Цель исследования состояла в том, чтобы посредством прижизненной флуоресцентной конфокальной микроскопии с применением фармакологического анализа показать, локализуется ли GluN3A-субъединица в ОСН взрослых животных. Анализ полученных результатов выявил наличие в ОСН взрослых крыс субъединицы GluN3A в составе возбуждающего глицинового рецептора и GluN3A-содержащего N-метил-D-аспаратного рецептора (GluN3A-NMDAR). Помимо них, в ОСН локализуются типичный NMDAR и не-NMDAR. Все эти рецепторы могут располагаться как в одной и той же, так и в разных рецепторных клетках, в чем проявляется гетерогенность ОСН в обонятельном эпителии.

Ключевые слова: N-метил-D-аспаратный рецептор, GluN3A-субъединица, обонятельные сенсорные нейроны, глицин, глутамат

DOI: 10.31857/S0869813925050096, **EDN:** TNFGDO

ВВЕДЕНИЕ

Исследование чувствительного к N-метил-D-аспартату (NMDA) подкласса глутаматных рецепторов привлекает пристальное внимание нейробиологов, поскольку играет важную роль в патогенезе многочисленных неврологических и психических заболеваний [1–8].

Члены семейства рецепторов NMDA (NMDAR) обладают характерными особенностями. Канонические NMDAR представляют собой гетеротетрамерные комплексы с двумя обязательными глицин-связывающими GluN1-субъединицами и двумя глутамат-связывающими GluN2-субъединицами. Комплексы, включающие в свой состав различные подтипы GluN1 и GluN2, образуют функционально различные подтипы NMDAR, наделяя их специфическими свойствами, помимо общих функциональных характеристик [5, 9–13]. Одним из важных свойств канонического (или классического)

NMDAR является необходимостью для его активации скоординированного взаимодействия глицина (Gly) и глутамата (Glu) с сайтами связывания на субъединицах GluN1 и GluN2 соответственно [2, 14–16].

NMDAR отличается от других типов лиганд-зависимых ионотропных рецепторов наличием блока магнием в состоянии покоя и снятием этого блока при деполяризации [2, 5]. Кроме того, NMDAR обладают примерно в 3–4 раза более высокой проницаемостью для Ca^{2+} , что является ключевым фактором, способствующим различным формам синаптической пластичности, регуляции генов, быстрому высвобождению медиатора [6].

Однако при нарушении нормального функционирования NMDAR развиваются различные патологические состояния. Одним из механизмов патогенеза шизофрении считается ослабление функции NMDAR с последующим снижением концентрации цАМФ, что является маркером для диагностики этого психического заболевания [17]. В противоположность недостаточной активации гиперактивация NMDAR, ведущая к избыточному содержанию ионов кальция в цитозоле, способствует развитию патологических состояний, обусловленных эксайтотоксичностью [13]. Вместе с тем появляются данные, что активация NMDAR может оказывать не только повреждающее, но и протекторное действие на нейрональные клетки. В частности, NMDAR участвуют в поддержании жизнеспособности незрелых нейронов *in vitro*, в основе которого лежит усиление экспрессии ряда нейротрофических факторов, ингибирующих апоптоз [2].

Таким образом, этот класс рецепторов глутамата участвует во множестве физиологических и связанных с болезнями процессах в головном мозге.

В 1995 г. был клонирован третий класс субъединиц NMDAR: GluN3A и GluN3B, и их природа и участие в нейрональных и глиальных рецепторах стали областью активных исследований. Присутствие GluN3 в NMDAR наделяет его новыми функциональными свойствами: в 5 раз снижает проницаемость канала для Ca^{2+} и ослабляет чувствительность к блоку Mg^{2+} . Следовательно, сочетаясь с субъединицами GluN1 и GluN2, GluN3 формирует функционально совершенно новый набор NMDAR [18–22].

GluN3-содержащие NMDAR бывают двух разных подтипов, образуя тригетеромерные GluN1/GluN2/GluN3 и дигетеромерные GluN1/GluN3 комплексы. GluN3A в них представляет собой модуляторную субъединицу, обладающую уникальными свойствами [2, 5, 11, 23]. Eriksson с соавт. электрофизиологическим методом установили, что рецепторы, образующие комплекс из субъединиц GluN1, GluN3A и GluN3B, экспрессированные в клетках эмбриональной почки человека (HEK 293), активировались глицином, но не стимулировались глутаматом или каиновой кислотой и были устойчивы к блокаде магнием. Это означает, что коэкспрессия субъединиц GluN1, GluN3A и GluN3B в клетках HEK 293 формирует активируемые глицином рецепторы с новыми функциональными и фармакологическими свойствами [24, 25].

На ооцитах *Xenopus* было показано, что связывания глицина в качестве агониста только с GluN3-субъединицей достаточно, чтобы активировать дигетеромерные рецепторы GluN1/GluN3. Они активируются исключительно глицином, обладая сайтами связывания как на GluN1-, так и на GluN3-субъединицах [5, 22]. Но S1 и S2 (водорастворимые лиганд-связывающие домены) у GluN3A-субъединицы имеют очень высокое сродство к глицину с кажущейся константой диссоциации (K_d) 40 нМ, что в 650 раз меньше, чем K_d для GluN1, и чрезвычайно малое сродство к глутамату (K_d 9.6 мМ). В то же время GluN1 не активируется глутаматом даже при концентрации 300 мМ [19, 21, 26]. Поскольку ионные каналы с такими электрофизиологическими характеристиками были идентифицированы и в культурах коры головного мозга крыс, то было выдвинуто предположение, что GluN3/GluN1-содержащие NMDAR присутствуют в нейронах *in vivo* [5, 11, 27].

Способностью активироваться глицином обладают также орфанные GluD-рецепторы, состоящие из гомотетрамеров субъединиц GluD1 и GluD2. Эта особенность

роднит их с рецепторами GluN1/GluN3A, которые также, относясь к глутаматергической системе, реагируют на предъявление глицина. Важно отметить, что рецепторы GluN1/GluN3A десенситизируются при концентрации глицина 10 мкМ, тогда как GluD-рецепторы достаточно активны при его концентрации в 1 мМ. Однако этот тип рецепторов изучен недостаточно, и не показана его экспрессия в обонятельных сенсорных нейронах [28].

До сих пор считалось общепринятым предположение, что экспрессия GluN3A меняется в процессе развития, будучи очень низкой на эмбриональных стадиях и во взрослом возрасте у грызунов. Поэтому исследование GluN3A у взрослых особенно в обонятельной сенсорной системе изучалось менее активно [11, 12, 15, 27, 29].

Вместе с тем окрашивание выявило несколько специфических областей мозга, где экспрессия GluN3A оставалась высокой и во взрослом возрасте. Высокая степень экспрессии GluN3A представлена в центральном отделе слуховой системы, в зрительных кортикальных синапсах, а также в ядре латерального обонятельного тракта зрелого мозга грызунов [30, 31].

Помимо грызунов, высокие уровни мРНК и белка GluN3A обнаружены во многих областях мозга взрослых макаков. Экспрессия GluN3A сохранялась во взрослом возрасте во всем мозге приматов [11, 22, 30]. В нативных нейронах взрослого мозга была продемонстрирована экспрессия функциональных GluN3A-содержащих NMDAR. Кроме того, были выявлены дигетеромерные комплексы GluN1/GluN3A, представляющие собой совершенно новые типы ионотропных рецепторов (возбуждающие глициновые рецепторы), расширяющие палитру функций в ЦНС типично тормозного нейромедиатора глицина.

Обширная экспрессия GluN3A на уровне mRNA и белка выявлена также в ЦНС взрослого человека [24]. Широко распространенное распределение GluN3A-субъединицы в ЦНС человека указывает на то, что она играет важную роль в реализации различных функций.

Функциональная роль NMDAR, содержащих GluN3A-субъединицу, активно изучается. Показано, что эта субъединица влияет на плотность дендритных шипиков, созревание синапсов. Она участвует в архитектурной организации важных областей мозга как в функциональном, так и в морфологическом плане, определяя моторные и когнитивные функции [5]. GluN3A-субъединица включается в процесс консолидации памяти и выживания клеток, а также в механизмы патогенеза некоторых неврологических заболеваний [19].

GluN3A-субъединица вовлекается в патогенез болезни Хантингтона, при которой у пациентов уровни белка GluN3A повышены в стриатуме. Эта субъединица участвует в развитии психических расстройств, в частности биполярного расстройства и шизофрении. GluN3A, как полагают, регулирует активность нейронов неокортекса и таким образом способна модулировать ряд корково-подкорковых путей [32]. NMDAR, содержащим GluN3A, придается высокая патофизиологическая значимость, особенно в условиях гипоксии или ишемии или перивентрикулярной лейкомаляции [12, 33]. В целом можно сделать вывод, что субъединицы GluN3, в частности GluN3A, становятся потенциальными ключевыми игроками в регуляции (пато)физиологической функции мозга.

Учитывая слабую проницаемость для кальция GluN3A, было высказано предположение, что эта субъединица действует как нейропротекторный модулятор [22]. Более низкая проницаемость для Ca^{2+} GluN3A-NMDA рецепторных каналов способствует защите от эксайтотоксического повреждения. Поэтому полагают, что регуляция экспрессии GluN3A-субъединицы может быть одним из механизмов нейрозащитной функции от избыточного накопления Ca^{2+} в нейронах [18]. Это свидетельствует о том, что GluN3-субъединицы могут быть важными модуляторами функции рецепторов NMDA.

Как отмечалось выше, GluN3A-субъединица в зависимости от возраста локализуется в разных отделах мозга приматов и человека [24]. Такое широкое представительство этой субъединицы в ЦНС в постнатальном развитии связывают с ролью, которую она может играть в установлении ранних корковых цепей посредством модуляции притока Ca^{2+} [18, 34].

Экспрессия GluN3A выявлена в нейронах различных отделов ЦНС. Однако необходимо отметить, что по сравнению с другими частями мозга взрослого человека особенно высокие концентрации мРНК GluN3A выявлены в обонятельной системе. Она представлена на разных уровнях обонятельного анализатора, включая обонятельную луковицу и ОСН. Относительно более высокие уровни мРНК GluN3A в обонятельной системе по сравнению с другими частями мозга взрослого человека указывают на важную роль GluN3A-субъединицы в обонянии не только у новорожденных, но и у взрослых. Отсутствие GluN3A у нокаутных мышей вызывало anosmia у животных в результате нарушения передачи обонятельного стимула. Полагают, что эта субъединица участвует в процессе нейрогенеза в обонятельном эпителии, и потеря или ослабление ее экспрессии в ОСН изменяет нейрогенез, замедляя созревание нейронов. Избыток незрелых рецепторных клеток в обонятельном эпителии влечет за собой потерю способности к восприятию специфического запаха или потерю обоняния. Anosmia, в свою очередь, является причиной снижения обонятельной памяти и когнитивной функции [35].

Таким образом, можно заключить, что экспрессия GluN3A-субъединицы NMDAR сохраняется у взрослых млекопитающих. Эта субъединица охватывает различные области ЦНС, занимая значительную часть в обонятельной сенсорной системе, локализуясь как в обонятельной луковице, так и в ОСН. Вместе с тем нам не удалось обнаружить данных о наличии в них функциональной GluN3A-субъединицы. Поэтому целью работы было посредством фармакологического анализа показать, присутствует ли функциональная GluN3A-субъединица в ОСН взрослых крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили изолированные ОСН, выделенные из обонятельного эпителия крысы [36], поскольку ОСН используются в качестве модельной системы для изучения молекулярных механизмов патогенеза различных нервно-психических и нейродегенеративных расстройств. Это объясняется тем, что обонятельный нейроэпителий представляет собой периферическую легкодоступную нервную ткань [37–39].

ОСН получали от 11 взрослых крыс-самцов линии Вистар массой тела 150–200 г. Для сохранения химической чистоты исследуемых тканей применялся метод цервикальной дислокации с последующей декапитацией [40]. После этого извлекались хрящевые завитки, покрытые обонятельной выстилкой. Их помещали в раствор коллагеназы (Sigma) для энзиматической диссоциации клеток обонятельного эпителия. Этот раствор готовили в концентрации 20 мкМ в безмагневом растворе Рингера для тепловых (рабочем растворе) следующего состава (мМ): NaCl 145, HEPES 20, глюкоза 5, KCl 5, CaCl_2 3; pH 7.4, комнатная температура. Препараты выдерживали в растворе коллагеназы в течение 10 мин, который затем замещался рабочим раствором. Для получения суспензии раствор с клетками тритурировали и помещали на покровные стекла, покрытые поли-L-лизин (Sigma) (0.1 мг/мл). Затем стекла на 40 мин помещали в термостат при температуре 36 °C. После этого клетки инкубировали в растворе Fura-2 AM (5 мкМ) и содержали в термостате при тех же условиях. Затем препарат отмывали от Fura-2 AM рабочим раствором.

Для анализа динамики внутриклеточного Ca^{2+} в ОСН в ответ на действие фармакологических агентов применялся метод прижизненной флуоресцентной микроскопии. Стекла с адгезированными на них клетками размещались на предметном

столике лазерного сканирующего инвертированного конфокального микроскопа Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия). Параметры для возбуждения флуоресценции устанавливались автоматически. Флуоресценцию возбуждали аргоновым лазером ($\lambda_{\text{возб}} = 405 \text{ нм}$), эмиссию регистрировали на длине волны 520 нм в реальном времени со скоростью 1 кадр/0.78 с, применяя объектив $\times 40$ с воздушной иммерсией. Это позволило различать и анализировать интенсивность флуоресценции отдельных клеток. При возбуждении флуоресценции на длине волны 405 нм, т.е. на краю кривой поглощения Fura-2 AM, регистрируется практически исключительно флуоресценция свободной формы Fura-2. Поэтому увеличение содержания внутриклеточного кальция ассоциируется с падением флуоресцентного сигнала. Реакция ОСН на фармакологические агенты оценивалась по изменению интенсивности флуоресценции под воздействием глицина, NMDA, MgSO_4 и глутамата. Уменьшение интенсивности свечения свидетельствовало о повышении концентрации цитозольного Ca^{2+} .

Из общего пула клеток выбирались только ОСН, идентифицируемые по нескольким критериям. Во-первых, по характерному диаметру для ОСН (около 10 мкм), при этом опорные клетки (диаметр порядка 25 мкм) не исследовались. Во-вторых, некоторые ОСН, которые в дальнейшем исследовались, приобретали грушевидную форму с апикальным дендритом. В-третьих, обонятельные клетки составляют около 75–80% всех клеток обонятельного эпителия, в отличие от базальных (около 3–10%), поэтому вероятность обнаружить именно ОСН заметно выше, нежели базальную клетку [41].

Мы предположили, что в ОСН присутствует функциональная GluN3A -субъединица. Для доказательства этого предположения применялся фармакологический анализ. Протокол наших исследований был аналогичен исследованиям с использованием электрофизиологических методов на нейронах CA1 поля гиппокампа и таламуса [19]. Одним из фармакологических агентов служил глицин в концентрации 3 мкМ (“Лен-Реактив”), поскольку при большем содержании он десенситизирует глициновый рецептор состава GluN1/GluN3A [19]. Изменение флуоресценции, опосредованное Gly, отражало наличие GluN3A -субъединицы в мембране ОСН.

Другим фармакологическим агентом являлся NMDA (100 мкМ) (Sigma). Рецептор, содержащий субъединицу GluN3A , нечувствителен к NMDA, поэтому отсутствие влияния NMDA на Gly-индуцируемые токи может свидетельствовать о наличии функциональной GluN3A -субъединицы в ОСН [19].

Известно, что рецепторы, содержащие субъединицу GluN3A , нечувствительны к внеклеточным ионам магния [19]. Чтобы в этом убедиться, мы действовали MgSO_4 (1 мМ) в присутствии глицина. Если в результате магний не будет модулировать реакцию ОСН на глицин, это будет свидетельствовать о наличии субъединицы GluN3A .

Мы предположили, что в ОСН присутствуют не-NMDAR, такие как кальций-проницаемые AMPA- и каинатные рецепторы, реагирующие на глутамат. Для проверки нашего предположения ОСН стимулировали 100 мкМ глутамата (“ЛенРеактив”) в присутствии глицина и NMDA. Изменение интенсивности свечения клеток в таких условиях свидетельствовало о наличии в мембране ОСН не-NMDAR.

Изменение динамики внутриклеточного кальция в ответ на фармакологические агенты регистрировали следующим образом: сначала в течение 1 мин записывали фоновую интенсивность флуоресценции исследуемых клеток, находящихся в 100 мкл рабочего раствора. После этого на них по очереди апплицировали по 10 мкл каждого фармакологического агента. Стоит отметить, что каждый следующий стимул предъявлялся на фоне действия предыдущего, не отмывая его из рабочего раствора. Первым стимулом являлся глицин, к которому через 2 мин добавляли NMDA или Mg^{2+} . Реакцию на них записывали в течение 2 мин, после чего в течение 2 мин предъявляли глутамат или NMDA и регистрировали реакцию на них.

Исследование проводилось в двух сериях экспериментов: в первой предъявлялись глицин, магний и NMDA, во второй – глицин, NMDA и глутамат. По изменению

интенсивности флуоресценции в ответ на применяемые препараты определялась чувствительность клеток, по которой можно было судить о наличии NR3A-субъединицы и не-NMDAR в мембранах ОСН взрослых крыс.

Статистический анализ полученных результатов проводился с использованием программ MS Excel и SPSS Statistics. Для идентификации реакции каждой клетки на действие отдельного стимула отбирались данные до и после применения препарата, формируя таким образом две группы данных для сравнения. Проверка выполнения нормального закона распределения в полученных выборках проводилась с применением критерия Шапиро–Уилка на уровне значимости $p > 0.05$. Поскольку нормальное распределение выполнялось не во всех выборках, для идентификации изменения интенсивности флуоресценции применялся как t -критерий Стьюдента, так и U -критерий Манна–Уитни. Значимыми считались реакции при $p < 0.05$.

После отбора только значимых реакций клеток на применяемые фармакологические агенты определялась амплитуда реакции в процентах как отношение разности средней интенсивности свечения до и после воздействия (ΔF) к интенсивности флуоресценции (F) до воздействия. Распределение полученных данных проверялось с помощью критерия Колмогорова–Смирнова на нормальность. Так как полученные результаты подчинялись нормальному закону распределения, для описания процента реакции использовались среднесыборочное значение и 95%-ный доверительный интервал.

Для графического представления полученных данных ниже приведены примеры реакций отдельных клеток, где для лучшего представления результатов данные фильтровались от шумов и выделялась скользящая средняя с использованием программы Excel. Усредненные статистически обработанные результаты по всему пулу клеток представлены в виде столбиковых диаграмм с доверительными интервалами.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе методом фармакологического анализа исследовались функциональные особенности GluN3A-субъединицы в изолированных ОСН взрослых крыс.

В ходе экспериментов было проанализировано 653 клетки. Увеличение концентрации кальция на действие глицина проявлялось только в 20% из них. На рис. 1а представлен пример реакции клетки на него. Эта клетка реагировала на глицин снижением интенсивности флуоресценции, обусловленным повышением концентрации кальция в цитозоле. Амплитуда индуцируемого им изменения флуоресценции достигала $5.2 \pm 0.4\%$. Аппликация магния на ОСН, чувствительные к глицину, в 57% случаев не вызывала значимого изменения реакции, вызванной глицином. Этот результат может свидетельствовать о том, что магний не блокировал активируемый глицином входящий поток Ca^{2+} в ОСН (рис. 1а). Это указывает на слабую чувствительность глицин-вызванных реакций к Mg^{2+} , что свойственно рецепторам, содержащим GluN3A-субъединицу [19].

Характерным фармакологическим свойством рецепторов, в составе которых есть GluN3A-субъединица, является их невосприимчивость к NMDA [1]. Из анализа полученных результатов следовало, что в 65% рецепторных нейронов, реагирующих на глицин и нечувствительных к Mg^{2+} , NMDA не потенцировало токи, вызванные глицином. Интенсивность свечения не изменялась в ответ на стимуляцию NMDA (рис. 1б). Это означает, что данная группа клеток была невосприимчива к раздражителю.

В совокупности полученные результаты согласуются с фармакологической характеристикой GluN3A-субъединицы, полученной на нейронах ЦНС [19]. Это дает основание предполагать, что в ОСН взрослых крыс линии Вистар присутствует GluN3A-субъединица.

Вместе с тем в 35% случаев рецепторные нейроны, восприимчивые к глицину и резистентные к блоку магнием, реагировали на стимуляцию NMDA. Как видно

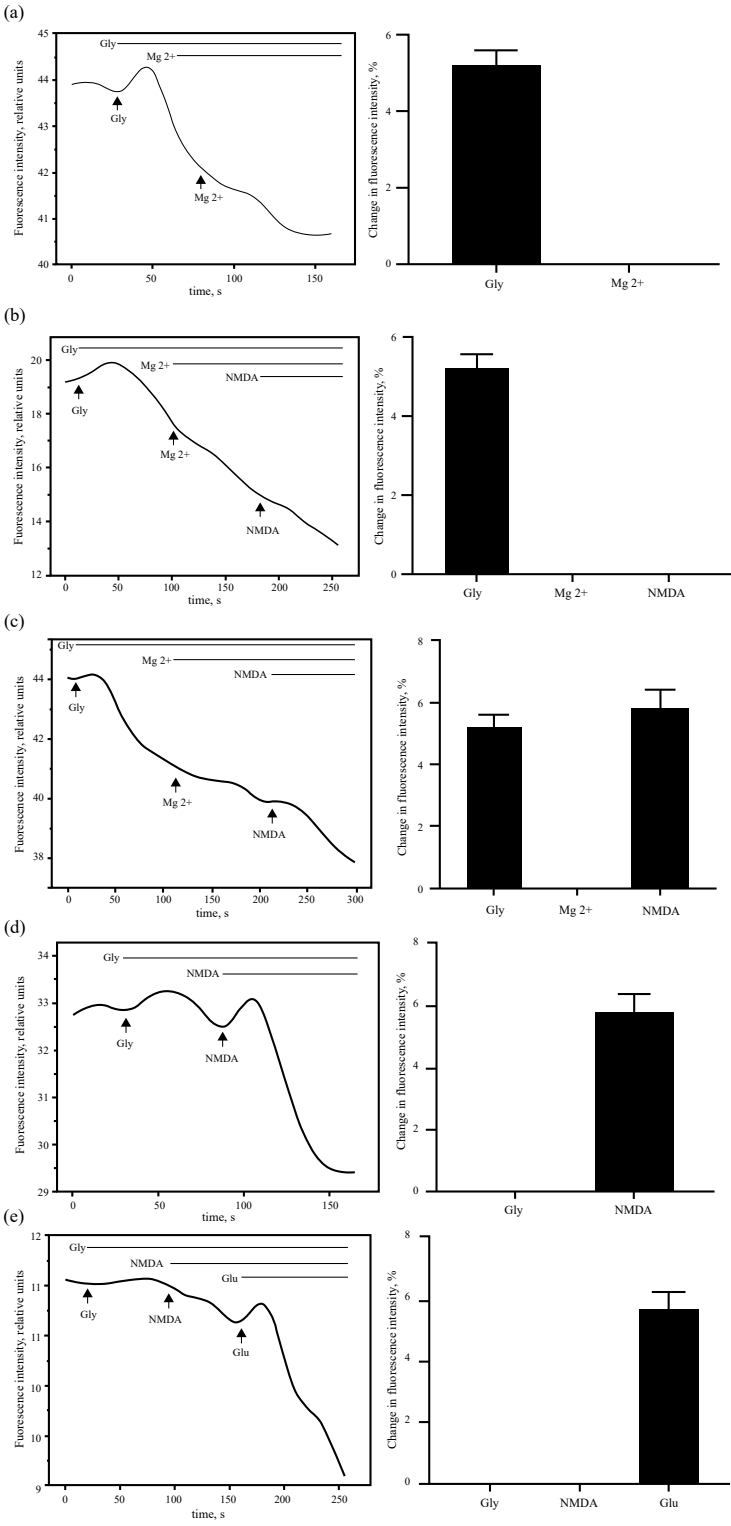


Рис. 1. Примеры реакций отдельных ОСН на применяемые стимулы, а также столбиковые диаграммы с доверительным интервалом для иллюстрации реакций популяции ОСН. (а) – Влияние 3 мкМ раствора глицина, 1 мМ раствора $MgSO_4$ на изменение интенсивности кальциевой флуоресценции в ОСН взрослых крыс (стрелка указывает начало стимуляции) ($n = 46$). (b) – Влияние 3 мкМ раствора глицина, 1 мМ раствора $MgSO_4$ и 100 мкМ раствора NMDA на флуоресцентный сигнал в ОСН крыс ($n = 30$). (с) – Влияние 3 мкМ раствора глицина, 1 мМ раствора $MgSO_4$ и 100 мкМ раствора NMDA на флуоресцентный сигнал в ОСН крыс ($n = 16$). (d) – Влияние 3 мкМ раствора глицина и 100 мкМ раствора NMDA на флуоресцентный сигнал в ОСН крыс ($n = 37$). (е) – Влияние 3 мкМ раствора глицина, 100 мкМ раствора NMDA и 100 мкМ раствора глутамата на флуоресцентный сигнал в ОСН крыс ($n = 29$).

на рис. 1с, под действием этого агониста интенсивность флуоресценции снижалась в результате увеличения уровня Ca^{2+} в клетке. Данный рост обусловлен входящим потоком Ca^{2+} в цитозоль, который инициируется NMDA. При этом величина реакции составляла $5.8 \pm 0.6\%$. Следовательно, рецепторные клетки одновременно реагировали на глицин и были невосприимчивы к блоку магнием, что свидетельствует о наличии GluN3A-субъединицы в рецепторе, связывающемся с глицином. Однако их реакция на NMDA означает, что в мембране этих клеток локализуется GluN3A-субъединица, образуя рецептор, чувствительный к глицину и NMDA.

При анализе полученных результатов оказалось, что в 80% из числа протестированных ОСН повышения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в ответ на действие глицина не наблюдалось. Вместе с тем в 16% из числа нечувствительных к глицину клеток интенсивность флуоресценции под действием NMDA на фоне глицина снижалась. Амплитуда реакции достигала $5.8 \pm 0.6\%$ (рис. 1d). Ослабление свечения вызвано повышением концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле обонятельных нейронов, вход которого осуществлялся, вероятно, через каналы NMDAR, активируемые NMDA в присутствии коагониста глицина. Полученный результат может свидетельствовать о наличии канонического NMDAR в мембране ОСН.

Однако, как видно на рис. 1е, стимуляция клеток глутаматом в присутствии глицина и NMDA снижала интенсивность свечения в результате повышения концентрации внутриклеточного кальция. Этот результат говорит о том, что глутамат в данных клетках мог индуцировать поток ионов кальция через канал, образованный не-NMDAR.

Таким образом, все полученные в работе данные можно интерпретировать в качестве доказательства того, что среди ОСН имеются клетки, содержащие субъединицу, фармакологические свойства которой характерны для GluN3A. Кроме того, часть рецепторных нейронов содержала субъединицы с особенностями, отличными от специфических свойств GluN3A.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В наших экспериментах было показано, что реакции части ОСН на глицин, магний и NMDA оказались аналогичными реакциям нейронов ЦНС, экспрессирующих функциональную GluN3A-субъединицу [19]. Это означает, что в ОСН взрослых крыс, так же как и в нейронах ЦНС, локализуется функциональная GluN3A-субъединица.

Наши результаты продемонстрировали наличие клеток, чувствительных к глицину и резистентных к NMDA, что, по литературным данным [42–44], свидетельствует о локализации возбуждающего глицинового рецептора (GlyR) в рецепторных нейронах взрослых крыс. Среди них оказались сенсорные нейроны, реагировавшие на глутамат. Это согласуется с данными, в которых в мембране ОСН выявлено высокое содержание субъединицы каинатных рецепторов KA2 [45, 46]. Следовательно, GlyR и не-NMDAR могут одновременно локализоваться в одной и той же обонятельной клетке.

Известно, что субъединица GluN3A образует гетеротримерный рецептор (GluN3A-NMDAR) из субъединиц GluN1/GluN2/GluN3A [47]. Его фармакологическими свойствами являются чувствительность к глицину и к NMDA и резистентность к блоку магнием [12, 27, 48], поэтому такие клетки реагируют на аппликацию глицина и NMDA и не отвечают на действие магния, что нами было обнаружено на ОЧН. Следовательно, в мембране ОЧН взрослых крыс может функционировать GluN3A-NMDAR (рис. 1с).

Как показали эксперименты, ОЧН, содержащие гетеротримерный NMDAR, реагировали также на действие глутамата. Поскольку активные центры на GluN3A-NMDA-рецепторе заняты, с глутаматом могли связываться, вероятно, только не-NMDAR. Это дает основание утверждать, что в ОЧН есть пул клеток, в мембране которых одновременно локализуются рецепторы GluN3A-NMDA и не-NMDA. Исходя из вышесказанного, можно сделать вывод, что не-NMDAR могут функционировать одновременно как с глициновым, так и с GluN3A-NMDA-рецептором.

Среди рецепторных нейронов, исследуемых в работе, встречались глицин-нечувствительные ОЧН. Этот факт дает основание говорить о том, что в них нет функциональной GluN3A-субъединицы. В то же время некоторые из них реагировали на NMDA в присутствии глицина. Как видно, в активацию NMDA-зависимой реакции вовлекаются два лиганда: NMDA в качестве агониста и глицин – коагониста, что характерно для канонического NMDAR. Таким образом, в обонятельном эпителии млекопитающих встречаются ОЧН с каноническими NMDAR.

Следует отметить, что реакция на NMDA проявлялась в присутствии ионов магния в среде, которые могли блокировать канал NMDAR, когда клетки находятся в состоянии покоя (рис. 1с). Следовательно, нейрональный ответ на NMDA возможен благодаря снятию Mg^{2+} блока с NMDAR в результате мембранной деполяризации. В покое, т.е. без влияния каких-либо раздражителей, мембрана ОЧН деполяризована в результате активации циклонуклеотид-зависимых, механочувствительных ионных каналов и потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов L-типа [49, 50].

Вместе с тем канонический NMDAR мог совместно экспрессироваться с не-NMDAR. На это указывают результаты, в которых обнаруживались ОЧН, резистентные к глицину, но реагирующие на NMDA и глутамат. В некоторых ОЧН локализовались только не-NMDAR, активируемые глутаматом. Можно предположить, что ими являются кальций-проницаемые каинатные рецепторы, которые идентифицированы в обонятельной булаве и апикальной части обонятельных клеток [45].

Однако те клетки, которые не реагировали ни на глицин, ни на NMDA, ни на глутамат, вероятно, не имели рецепторов, взаимодействующих с этими лигандами, либо чувствительность к ним у этих клеток оказалась низкой, что не позволило нам выявить их реакции посредством флуоресцентного анализа.

Обобщая полученные результаты, можно заключить, что посредством фармакологического анализа удалось зарегистрировать реакции ОЧН, характерные для нейронов, содержащих GluN3A-субъединицу. Это означает, что в обонятельном эпителии взрослых крыс локализуется функциональная GluN3A-субъединица, образуя возбуждающий глициновый рецептор (GluN1/GluN3A) или гетеротримерный GluN3A-NMDAR (GluN1/GluN2/GluN3A). Вместе с тем в мембранах обонятельных клеток обнаружены канонический NMDAR (GluN1/GluN2) и не-NMDAR (возможно, рецептор к α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолепропионовой кислоте или рецепторы к каинату). Таким образом, ОЧН гетерогенны: в их мембране локализуются возбуждающие глициновые рецепторы, гетеротримерные NMDAR, канонические NMDAR и не-NMDAR. Наши исследования показали, что разные типы рецепторов могут принадлежать различным ОЧН или могут локализоваться в одной и той же клетке (рис. 2).

Таким образом, как и в ЦНС [1], в обонятельном нейроэпителии по региональному расположению, по составу субъединиц и по их физиологической роли NMDAR гетерогенны.

Следует отметить, что роль, которую играют GluN3A-содержащие рецепторы в мембране ОСН взрослых крыс, пока не ясна. Ее можно предположить, опираясь на выводы, полученные на нейронах ЦНС.

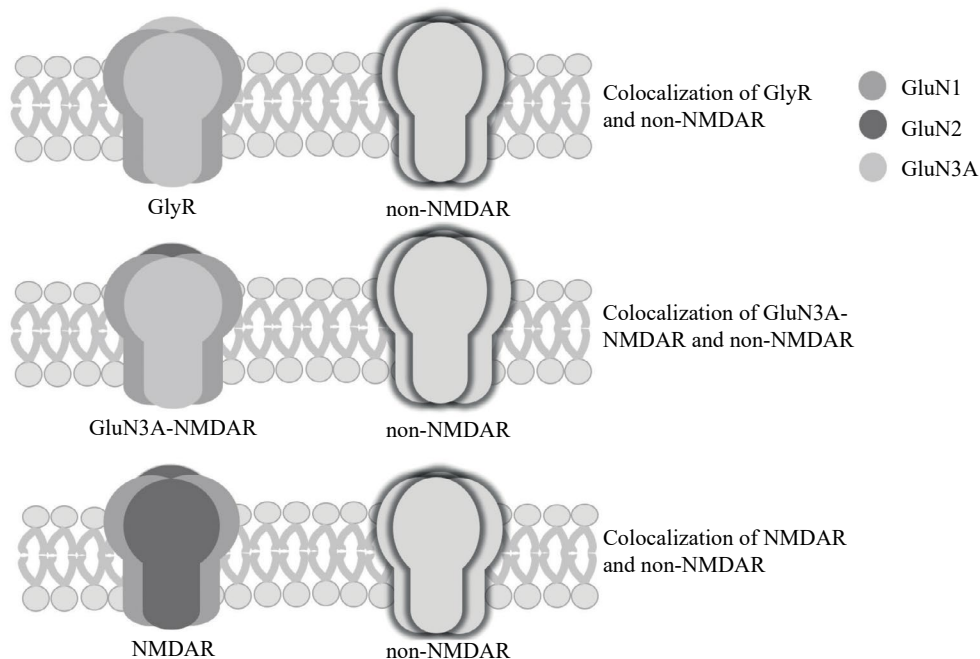


Рис. 2. Гетерогенное распределение NMDAR и не-NMDAR в обонятельных сенсорных нейронах взрослых крыс линии Вистар.

Можно предположить, что она выполняет нейрозащитную функцию, поскольку снижает проницаемость каналов для ионов кальция. Это имеет важное значение для функционирования обонятельных клеток. Обонятельные рецепторные нейроны действительно подвергаются различным воздействиям, которые могут губительно действовать на ОСН. Как известно, их апикальные участки погружены в обонятельную слизь, куда Боуменными железами и опорными клетками секретируются различные нейромедиаторы, а также глицин и глутамат [30, 45]. При различных заболеваниях их уровни в обонятельной слизи чрезмерно увеличивают внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} [45]. Существуют и другие механизмы повышения уровня кальция в цитозоле [45, 51–53]. Помимо этих путей, в механизм входа Ca^{2+} вовлекается обонятельная трансдукция с участием циклонуклеотид-зависимых и механочувствительных каналов [50].

Таким образом, при определенных условиях ОСН могут подвергаться кальциевой эксайтотоксичной перегрузке, нуждаясь в нейропротекции. Это обусловлено восприимчивостью митохондрий к перегрузке Ca^{2+} , которая резко увеличивается в процессе старения нервных клеток [54]. Поэтому, вероятно, быстрее погибают старые ОСН, тогда как в мембране зрелых рецепторных нейронов взрослых крыс локализуется GluN3A-субъединица. Наличие GluN3A в функциональных NMDAR приводит в результате

к более низким токам от целой клетки и может поэтому приводить к более низкой чувствительности к глутамат-опосредованной эксайтотоксичности. В основе меньшей проводимости в физиологических условиях лежит GluN3A-субъединица, снижающая проницаемость для Ca^{2+} почти на 90% [55, 56]. Следовательно, в механизмах нейропротекции молодых и зрелых ОСН взрослых крыс может участвовать GluN3A-субъединица, создавая условия для гибели старых.

GluN3A-субъединица NMDAR снабжена уникальным карбоксильным доменом, который отличается от других субъединиц NMDAR, благодаря чему она способна образовывать сигнальный комплекс протеинфосфатазы 2A (PPA2) с NMDAR. PPA2, как известно, экспрессируется повсеместно, включая ОСН, и играет важную роль во многих клеточных процессах, начиная инициацией репликации ДНК и заканчивая ростом и дифференцировкой клеток и апоптозом [10]. Возможно, GluN3A-субъединица с участием PPA2 и в ОСН включается в механизм апоптоза старых рецепторных клеток. Следовательно, GluN3A способна вовлекаться в механизм как нейрозащиты, так и гибели обонятельных рецепторных нейронов, вероятно, в зависимости от их зрелости. Тем более, что обнаружено возможное взаимодействие GluN3A и белков, связанных с апоптозом [24].

Процессу апоптоза могут подвергаться старые обонятельные клетки, в мембране которых сосредоточены NMDAR и кальций-проницаемые не-NMDAR, поскольку они способны реагировать на глутамат с участием как NMDAR, так и не-NMDAR, увеличивая риск эксайтотоксичности [56]. Полагают, что благодаря нейротоксичности глутамата устраняются нежелательные нейроны в процессе развития [57]. Вероятно, этот механизм включается в гибель состарившихся ОСН, защищая зрелые молодые ОСН.

Для защиты нейронов от токсического эффекта высоких концентраций возбуждающих аминокислот необходима модуляция работы ионотропных глутаматных рецепторов. В ОСН на протяжении жизни действует механизм, защищающий их от вредного воздействия окружающей среды. Эту роль выполняет присутствующий в них глутатион (GSH). Повышенный уровень GSH в нейронах обонятельных рецепторов обеспечивает защиту как рецепторных клеток, так и более центральных структур от ксенобиотических и окислительных повреждений [58]. Однако важна роль и других защитных факторов, в том числе GluN3A-субъединицы, участвующих в нейрогенезе ОСН.

Наши результаты показали, что в ОСН взрослых крыс присутствует функциональная GluN3A-субъединица в составе возбуждающего глицинового рецептора или гетеротримерного NMDAR, а также канонический NMDAR и не-NMDAR. Исходя из наших предположений, GluN3A-субъединица в обонятельных нейронах может играть нейрозащитную функцию и регулировать нейрогенез.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Выражаем благодарность Институту физиологии им. И.П. Павлова РАН за возможность проведения исследования на лазерном сканирующем инвертированном конфокальном микроскопе Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия) из Центра коллективного пользования Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея статьи (Е. В. Б.), написание статьи (Е. В. Б.), выполнение экспериментальной части работы (А. А. З.), обработка результатов (А. А. З., А. А. Р.), редактирование и подготовка финальной версии обзора (Е. В. Б., А. М. Б., А. А. Р., А. А. З., А. В. П., Д. О. И.).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа финансировалась за счет средств бюджета Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты на животных проводились в соответствии с Европейской директивой 2010/63. Протоколы исследований с использованием животных были одобрены локальным этическим комитетом по биоэтике при Санкт-Петербургском государственном педиатрическом медицинском университете, протокол № 46/08 от 20.11.2024 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mohn AR, Gainetdinov RR, Caron MG, Koller BH (1999) Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell* 98(4): 427–436. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81972-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81972-8)
2. Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R (2010) Glutamate receptor ion channels: Structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* 62(3): 405–496. <https://doi.org/10.1124/pr.109.002451>
3. Benarroch EE (2011) NMDA receptors: Recent insights and clinical correlations. *Neurology* 76(20): 1750–1757. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31821b7cc9>
4. Marsman A, van den Heuvel MP, Klomp DW, Kahn RS, Luijten PR, Hulshoff Pol HE (2013) Glutamate in schizophrenia: A focused review and meta-analysis of ¹H-MRS studies. *Schizophr Bull* 39(1): 120–129. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbr069>
5. Grand T, Abi Gerges S, David M, Diana MA, Paoletti P (2018) Unmasking GluN1/GluN3A excitatory glycine NMDA receptors. *Nat Commun* 9(1): 4769. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07236-4>
6. Joo J-Y, Kim B-W, Lee J-S, Park J-Y, Kim S, Yun Y-J, Lee S-H, Lee S-H, Rhim H, Son H (2007) Activation of NMDA receptors increases proliferation and differentiation of hippocampal neural progenitor cells. *J Cell Sci* 120(8): 1358–1370. <https://doi.org/10.1242/jcs.002154>
7. Nisar S, Bhat AA, Masoodi T, Hashem S, Akhtar S, Ali TA, Amjad S, Chawla S, Bagga P, Frenneaux MP, Reddy R, Fakhro K, Haris M (2022) Genetics of glutamate and its receptors in autism spectrum disorder. *Mol Psychiatry* 27(5): 2380–2392. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01506-w>
8. Chen T-S, Huang T-H, Lai M-C, Huang C-W (2023) The Role of Glutamate Receptors in Epilepsy. *Biomedicines* 11: 783. <https://doi.org/10.3390/biomedicines1103078>
9. Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH (1992) Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256(5060): 1217–1221. <https://doi.org/10.1126/science.256.5060.1217>
10. Chan SF, Sucher NJ (2001) An NMDA receptor signaling complex with protein phosphatase 2A. *J Neurosci* 21(20): 7985–7992. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-20-07985.2001>
11. Mueller HT, Meador-Woodruff JH (2005) Distribution of the NMDA receptor GLUN3A subunit in the adult pig-tail macaque brain. *J Chem Neuroanat* 29(3): 157–172. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2004.11.002>
12. Pérez-Otaño I, Larsen RS, Wesseling JF (2016) Emerging roles of GluN3-containing NMDA receptors in the CNS. *Nat Rev Neurosci* 17(10): 623–635. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.92>

13. *Wyllie DJA, Bowie D* (2022) Ionotropic glutamate receptors: Structure, function and dysfunction. *J Physiol* 600(2): 175–179.
<https://doi.org/10.1113/JP282389>
14. *Wang LY, MacDonald JF* (1995) Modulation by magnesium of the affinity of NMDA receptors for glycine in murine hippocampal neurones. *J Physiol* 486 (Pt 1): 83–95.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1995.sp020792>
15. *Henson MA, Roberts AC, Salimi K, Vadlamudi S, Hamer RM, Gilmore JH, Jaraskog LF, Philpot BD* (2008) Developmental regulation of the NMDA receptor subunits, GLUN3A and GLUN1, in human prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 18(11): 2560–2573.
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhn017>
16. *Yovanno RA, Chou TH, Brantley SJ, Furukawa H, Lau AY* (2022) Excitatory and inhibitory D-serine binding to the NMDA receptor. *Elife* 11: e77645.
<https://doi.org/10.7554/eLife.77645>
17. *Fan X, Jin WY, Wang YT* (2014) The NMDA receptor complex: A multifunctional machine at the glutamatergic synapse. *Front Cell Neurosci* 8: 160.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00160>
18. *Perez-Otano I, Schulteis CT, Contractor A, Lipton SA, Trimmer JS, Sucher NJ, Heinemann SF* (2001) Assembly with the GLUN1 subunit is required for surface expression of GLUN3A-containing NMDA receptors. *J Neurosci* 21(4): 1228–1237.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-04-01228.2001>
19. *Chatterton JE, Awobuluyi M, Premkumar LS, Takahashi H, Talantova M, Shin Y, Cui J, Tu S, Sevarino KA, Nakanishi N, Tong G, Lipton SA, Zhang D* (2002) Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* 415(6873): 793–798.
<https://doi.org/10.1038/nature715>
20. *Sucher NJ, Akbarian S, Chi CL, Leclerc CL, Awobuluyi M, Deitcher DL, Wu MK, Yuan JP, Jones EG, Lipton SA* (1995) Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain. *J Neurosci* 15(10): 6509–6520.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-10-06509.1995>
21. *Banke TG, Traynelis SF* (2003) Activation of GLUN1/GLUN2B NMDA receptors. *Nat Neurosci* 6(2): 144–152.
<https://doi.org/10.1038/nn1000>
22. *Cavara NA, Hollmann M* (2008) Shuffling the deck anew: How NR3 tweaks NMDA receptor function. *Mol Neurobiol* 38(1): 16–26.
<https://doi.org/10.1007/s12035-008-8029-9>
23. *McClymont DW, Harris J, Mellor IR* (2012) Open-channel blockade is less effective on GluN3B than GluN3A subunit-containing NMDA receptors. *Eur J Pharmacol* 686(1–3): 22–31.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.04.036>
24. *Eriksson M, Nilsson A, Samuelsson H, Samuelsson EB, Mo L, Akesson E, Benedikz E, Sundström E* (2007) On the role of GLUN3A in human NMDA receptors. *Physiol Behav* 92(1–2): 54–59.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.05.026>
25. *Eriksson M, Nilsson A, Froelich-Fabre S, Akesson E, Dunker J, Seiger A, Folkesson R, Benedikz E, Sundström E* (2002) Cloning and expression of the human N-methyl-D-aspartate receptor subunit GLUN3A. *Neurosci Lett* 321(3): 177–181.
[https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(01\)02524-1](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(01)02524-1)
26. *Nilsson A, Duan J, Mo-Boquist LL, Benedikz E, Sundström E* (2007) Characterisation of the human NMDA receptor subunit GLUN3A glycine binding site. *Neuropharmacology* 52(4): 1151–1159.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.12.002>
27. *Nilsson A, Eriksson M, Muly EC, Akesson E, Samuelsson EB, Bogdanovic N, Benedikz E, Sundström E* (2007) Analysis of GLUN3A receptor subunits in human native NMDA receptors. *Brain Res* 1186: 102–112.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.09.008>
28. *Stroebel D, Mony L, Paoletti P* (2021) Glycine agonism in ionotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* 193: 108631.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108631>
29. *Yuan T, Bellone C* (2013) Glutamatergic receptors at developing synapses: The role of GluN3A-containing NMDA receptors and GluA2-lacking AMPA receptors. *Eur J Pharmacol* 719(1–3): 107–111.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.04.056>

30. Давыдова ОН, Болдырев АА (2007) Глутаматные рецепторы в клетках нервной и иммунной систем. *Анналы клин экспер неврол* 1(4): 28–34. [Davydova ON, Boldyrev AA (2007) Glutamate receptors in cells of the nervous and immune systems. *Ann Clin Exp Neurol* 1(4): 28–34. (In Russ)].
31. Luo T, Wu WH, Chen BS (2011) NMDA receptor signaling: Death or survival? *Front Biol (Beijing)* 6(6): 468–476.
<https://doi.org/10.1007/s11515-011-1187-6>
32. Mueller HT, Meador-Woodruff JH (2004) GLUN3A NMDA receptor subunit mRNA expression in schizophrenia, depression and bipolar disorder. *Schizophr Res* 71(2–3): 361–370.
<https://doi.org/10.1016/j.schres.2004.02.016>
33. Crawley O, Conde-Dusman MJ, Pérez-Otaño I (2022) GluN3A NMDA receptor subunits: More enigmatic than ever? *J Physiol* 600(2): 261–276.
<https://doi.org/10.1113/JP280879>
34. Wada A, Takahashi H, Lipton SA, Chen HS (2006) GLUN3A modulates the outer vestibule of the “NMDA” receptor channel. *J Neurosci* 26(51): 13156–13166.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2552-06.2006>
35. Lee JH, Wei L, Deveau TC, Gu X, Yu SP (2016) Expression of the NMDA receptor subunit GluN3A (GLUN3A) in the olfactory system and its regulatory role on olfaction in the adult mouse. *Brain Struct Funct* 221(6): 3259–3273.
<https://doi.org/10.1007/s00429-015-1099-3>
36. Бронштейн АА (1977) Обонятельные рецепторы позвоночных: монография. Л. Наука. [Bronstein AA (1977) Olfactory receptors of vertebrates: monograph. L. Nauka. (In Russ)].
37. Borgmann-Winter KE, Rawson NE, Wang HY, Wang H, Macdonald ML, Ozdener MH, Yee KK, Gomez G, Xu J, Bryant B, Adamek G, Mirza N, Pribitkin E, Hahn CG (2009) Human olfactory epithelial cells generated in vitro express diverse neuronal characteristics. *Neuroscience* 158(2): 642–653.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.09.059>
38. Lavoie J, Sawa A, Ishizuka K (2017) Application of olfactory tissue and its neural progenitors to schizophrenia and psychiatric research. *Curr Opin Psychiatry* 30(3): 176–183.
<https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000327>
39. Sattler R, Ayukawa Y, Coddington L, Sawa A, Block D, Chipkin R, Rothstein JD (2011) Human nasal olfactory epithelium as a dynamic marker for CNS therapy development. *Exp Neurol* 232(2): 203–211.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.09.002>
40. Рыбникова АВ, Макарова МН (2015) Методы эвтаназии лабораторных животных в соответствии с Европейской директивой 2010/63. *Международн вестн ветер* 2: 96. [Rybnikova AV, Makarova MN (2015) Methods of euthanasia of laboratory animals in accordance with the European Directive 2010/63. *Int J Veter Med* 2: 96. (In Russ)].
41. Carr VM, Farbman AI (1993) The dynamics of cell death in the olfactory epithelium. *Exp Neurol* 124(2): 308–314.
<https://doi.org/10.1006/exnr.1993.1201>
42. Awobuluyi M, Yang J, Ye Y, Chatterton JE, Godzik A, Lipton SA, Zhang D (2007) Subunit-specific roles of glycine-binding domains in activation of GLUN1/NR3 N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Pharmacol* 71(1): 112–122.
<https://doi.org/10.1124/mol.106.030700>
43. Villmann C, Becker CM (2007) On the hypes and falls in neuroprotection: Targeting the NMDA receptor. *Neuroscientist* 13(6): 594–615.
<https://doi.org/10.1177/1073858406296259>
44. Tong G, Takahashi H, Tu S, Shin Y, Talantova M, Zago W, Xia P, Nie Z, Goetz T, Zhang D, Lipton SA, Nakanishi N (2008) Modulation of NMDA receptor properties and synaptic transmission by the GLUN3A subunit in mouse hippocampal and cerebrocortical neurons. *J Neurophysiol* 99(1): 122–132.
<https://doi.org/10.1152/jn.01044.2006>
45. Бигдай ЕВ, Самойлов ВО (2022) Влияние нейротрансмиттеров на функционирование обонятельных сенсорных нейронов. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 108(6): 699–711. [Bigday EV, Samoilov VO (2022) The effect of neurotransmitters on the functioning of olfactory sensory neurons. *Russ J Physiol* 108(6): 699–711. (In Russ)].
<https://doi.org/10.31857/S0869813922060012>

46. *Thukral V, Chikaraishi D, Hunter DD, Wang JK* (1997) Expression of non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptor subunits in the olfactory epithelium. *Neuroscience* 79(2): 411–424.
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(96\)00699-9](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(96)00699-9)
47. *Sproul A, Steele SL, Thai TL, Yu S, Klein JD, Sands JM, Bell PD* (2011) N-methyl-D-aspartate receptor subunit GluN3A expression and function in principal cells of the collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 301(1): F44–F54.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00666.2010>
48. *Smothers CT, Woodward JJ* (2007) Pharmacological characterization of glycine-activated currents in HEK 293 cells expressing N-methyl-D-aspartate GLUN1 and NR3 subunits. *J Pharmacol Exp Ther* 322(2): 739–748.
<https://doi.org/10.1124/jpet.107.123836>
49. *Pun RY, Kleene SJ* (2003) Contribution of cyclic-nucleotide-gated channels to the resting conductance of olfactory receptor neurons. *Biophys J* 84(5): 3425–3435.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)70064-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)70064-2)
50. *Bigdaj EV, Fufachev DK, Petrov PR, Samojlov VO* (2017) Mechanisms of electromechanical and electrochemical coupling in olfactory cilia of the frog (*Rana temporaria*). *Biophysics* 62(2): 240–246.
<https://doi.org/10.1134/S0006350917020051>
51. *Andreeva N, Khodorov B, Stelmashook E, Cragoe E Jr, Victorov I* (1991) Inhibition of Na⁺/Ca²⁺ exchange enhances delayed neuronal death elicited by glutamate in cerebellar granule cell cultures. *Brain Res* 548(1–2): 322–325.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91141-m](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91141-m)
52. *Gomez G, Lischka FW, Haskins ME, Rawson NE* (2005) Evidence for multiple calcium response mechanisms in mammalian olfactory receptor neurons. *Chem Senses* 30(4): 317–326.
<https://doi.org/10.1093/chemse/bji026>
53. *Castillo K, Delgado R, Bacigalupo J* (2007) Plasma membrane Ca²⁺-ATPase in the cilia of olfactory receptor neurons: possible role in Ca²⁺ clearance. *Eur J Neurosci* 26(9): 2524–2531.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05863.x>
54. *Khodorov B* (2004) Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurones. *Prog Biophys Mol Biol* 86(2): 279–351.
<https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2003.10.002>
55. *Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Das S, Cui J, Talantova MV, Wong HK, Gong X, Chan SF, Zhang D, Nakanishi N, Sucher NJ, Lipton SA* (2002) Characterization and comparison of the GLUN3A subunit of the NMDA receptor in recombinant systems and primary cortical neurons. *J Neurophysiol* 87(4): 2052–2063.
<https://doi.org/10.1152/jn.00531.2001>
56. *Henson MA, Roberts AC, Pérez-Otaño I, Philpot BD* (2010) Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions. *Prog Neurobiol* 91(1): 23–37.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.01.004>
57. *Choi DW* (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1(8): 623–634.
[https://doi.org/10.1016/0896-6273\(88\)90162-6](https://doi.org/10.1016/0896-6273(88)90162-6)
58. *Kirstein CL, Coopersmith R, Bridges RJ, Leon M* (1991) Glutathione levels in olfactory and non-olfactory neural structures of rats. *Brain Res* 543(2): 341–346.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)90047-y](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)90047-y)

The GluN3A Subunit Forms GluN3A-NMDAR and the Excitatory Glycine Receptor in the Olfactory Sensory Neurons of Adult Wistar Rats

**E. V. Bigdaj^{a,*}, A. A. Zuykova^a, A. M. Barmasova^a, A. A. Razinova^a, A. V. Pozdnyakov^a,
and D. O. Ivanov^a**

*^aSt. Petersburg State Pediatric University Ministry of Health of the Russian Federation,
St. Petersburg, Russia*

**e-mail: bigday50@mail.ru*

The article presents experimental data obtained on isolated olfactory sensory neurons (OSN) of adult Wistar rats. The aim of the study was to show by in vivo fluorescent confocal microscopy using pharmacological analysis whether the GluN3A-subunit is localized in the olfactory sensory neurons of adult animals. Analysis of the results have revealed the presence of GluN3A-subunit in the OSN of adult rats as part of the excitatory glycine receptor and GluN3A containing N-methyl-D-aspartate receptor (GluN3A-NMDAR). In addition to them, the typical NMDAR and non-NMDAR are localized in the OSN. All these receptors can be located both in the same and in different receptor cells, which manifests the heterogeneity of the OSN in the olfactory epithelium.

Keywords: N-methyl-D-aspartate receptor, GluN3A-subunit, olfactory sensory neurons, glycine, glutamate