

УДК 57.085.23

**ВЛИЯНИЕ МЕТИЛ L-МЕТИОНИНА, NAD^+ , НЕКОТОРЫХ БЛОКАТОРОВ
КАТИОННЫХ КАНАЛОВ И КИНАЗЫ G НА АКТИВАЦИЮ НЕЙРОННЫХ
СЕТЕЙ ИОНОМ АММОНИЯ.**

Кононов А.В.¹, Галимова М.Х.², Дынник В.В.^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики
клетки РАН, 142290, Пущино, Институтская 3, РФ

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической
и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Пущино, Институтская 3, РФ
e-mail: Dynnik@rambler.ru ;Тел: 8-9251506655, 8-(4967)739477

Реферат

Цель работы- исследовать влияние: метил L-метионина (витамин U), кофермента NAD^+ и некоторых модуляторов катионных каналов на гиперактивацию нейронных сетей, вызываемую ионом аммония (NH_4^+). Эксперименты были выполнены на нейроглиальных культурах клеток гиппокампа крыс (12-18 DIV), с использованием флюоресцентной микроскопии и регистрации уровня Ca^{++} в нейронах и астроцитах. Показано, что витамин U (3-10 mM) и ZD 7288 (20-30 μM) -ингибитор, активируемых гиперполяризацией циклонуклеотид- зависимых катионных (HCN)-каналов,- вызывают полное подавление активности нейронных сетей, активированных 6-8 mM NH_4Cl . Эффект витамина U сохраняется в присутствии pertussis toxin (ингибитора $\text{G}_{i,0}$ –белков) и блокатора ГАМК-рецепторов бикикуллина, что свидетельствует о механизме его действия, отличном от действия других метиламинов (например бетаина). Эффект ZD указывает на возможную активацию HCN-каналов посредством NH_4^+ , приводящую (наряду с другими факторами) к гиперактивации нейронных сетей. NAD^+ (1-3 mM), активирующий группу калиевых каналов, гиперполяризует нейроны и подавляет спонтанную активность сети. Последующие добавки NH_4Cl вызывают, медленный рост базового уровня Ca^{++} и амплитуды Ca^{++} колебаний в группе клеток, включающей 30% нейронов сети. Восстановление гиперактивности в этой группе клеток происходит в течение 260-280 сек и сопровождается быстрой активацией оставшейся части нейронов сети (70 %)- после

достижения всеми клетками некоторого порогового уровня Ca^{++} (Ca_t^{++}). В присутствии ингибитора медленных Ca^{++} -зависимых калиевых (SK) каналов апамина (apamin), временной сдвиг между группами исчезает и восстановление активности сети происходит через 120-130 сек, после достижения всеми клетками уровня Ca_t^{++} . При преинкубации культур с 8- bromo-cyclo GMP, активатором протеин киназы G, временной сдвиг между группами клеток (при введении NH_4^+) сохраняется. Высокая активность сети достигается через 80-90 сек и быстро исчезает. При этом более 60% клеток сети переходит в состояние с высоким уровнем Ca^{++} . Все эти данные указывают на возможное вовлечение HCN и некоторых Na^+ и Ca^{++} -каналов, а также Ca^{++} -зависимых калиевых каналов в активирующий эффект NH_4^+ и на важную роль киназы G в этом процессе. Блокада или активация метаботропных глутаматных рецепторов 1 типа (mGLUR 1,5) и ингибирование липидкиназы (PI3K) не влияют на эффект NH_4^+ . Полученные результаты могут позволить выявить механизмы токсического действия NH_4^+ на клетки мозга и разработать новые методы фармакологической коррекции гипераммонемии.

Ключевые слова: нейронные сети, ион аммония, витамин U, катионные каналы, киназа G, гипераммонемия.

**IMPACT OF METHYL L-METHIONINE , COENZYME NAD⁺, CERTAIN
BLOCKERS OF CATION CHANNELS AND KINASE G ON HYPERACTIVATION OF
NEURONAL NETWORKS BY AMMONIUM IONS.**

Kononov A.V.¹, Galimova² M.H., Dynnik V.V.^{1,2}

¹Federal State Budget Organization of Science ,Institute of Cell Biophysics RAS, 142290,
Pushchino, Russia, Institutskaya 3

²Federal State Budget Organization of Science, Institute of Theoretical and Experimental
Biophysics, Russian Academy of Sciences, 142290, Pushchino, Russia, Institutskaya 3

e-mail: Dynnik@rambler.ru ;Tel: 8-9251506655, 8-(4967)739477

Summary

The purpose of the experiments was to investigate the effects of: methyl L-methionine (vitamin U), coenzyme NAD⁺ and certain cation channel modulators on hyperactivation of neural networks by ammonium ions (NH₄⁺). The experiments were performed on neuroglial cultures of rat hippocampal cells (12-18 DIV), using fluorescent microscopy and the registration of cellular Ca⁺⁺ in the neurons and astrocytes. It has been shown, that vitamin U (1-3 mM) and ZD 4456 (20-30 μM), blocker of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide dependent cation (HCN) -channels, - both may completely suppress the activity of neural networks accelerated by 6-8 mM NH₄Cl. The effect of vitamin U persists in the presence of pertussis toxin (G_{i0} – proteins inhibitor) and bicuculline (blocker of GABA_A receptors). This reveals that vitamin U action is different from the action of other methylamines (betaine, etc). The effect of ZD 4456 may indicate on possible activation of HCN-channels by NH₄⁺, that apparently may contribute to hyperactivation of neuronal networks. NAD⁺ (1-3 mM), activating various potassium channels, hyperpolarizes the neurons and inhibits spontaneous network activity. Subsequent addition of NH₄Cl causes slow rise of baseline (resting) level of Ca⁺⁺ and of the amplitudes Ca⁺⁺-oscillations in one group of neurons in the network (30% of all cells). Full restoration of hyperactivity in this group is observed within 260 – 280 s and is followed by fast recovery of the activity in the rest of the network (70% of cells), after attaining by these cells of Ca⁺⁺ threshold level (Ca_t⁺⁺). Time shift between both groups of cells disappears in the presence of slow Ca⁺⁺-dependent potassium channels (SK) blocker apamin. Restoration of network hyperactivity is

observed within 120-130 s, after attaining by all cells of Ca_i^{++} . In the presence of protein kinase G activator 8-bromo-cGMP, the time shift produced by ammonia is preserved. Network activity is restored within 80- 90 s, but all groups of cells quickly stop firing and about 60% of these cells are moving into the state with high Ca^{++} level. All these results may indicate on possible implication of HCN- -channels, some Na^+ and Ca^{++} -channels and Ca^{++} -dependent K^+ channels in the effects produced by NH_4^+ . Blockade or activation of metabotropic glutamate receptor type 1 (mGLUR1,5) and inhibition of lipid kinase (PI3K) does not affect the effect of ammonium ions. The results obtained may allow to find out the mechanisms of toxic action of NH_4^+ and develop new methods of pharmacological correction of hyperammonemia.

Keywords: neural networks, ammonium ion, vitamin U, HCN and SK- channels, protein kinase G, hyperammonemia.

Введение

Системная гипераммонемия, возникающая при острой или хронической недостаточности печени, является ключевым элементом развития дисфункции мозга – различных форм острой или хронической печеночной энцефалопатии (ПЭ) [1].

Токсичность иона аммония (NH_4^+) впервые была обнаружена М. Ненски, И.П. Павловым и И. Залески в 1896 г. в экспериментах, выполненных на собаках при шунтировании печеночного кровотока [2]. Механизмы токсического действия NH_4^+ на клетки мозга, печени, сосудов и других органов и тканей остаются до настоящего времени недостаточно изученными. Дисфункция и набухание астроцитов, вызываемые адаптивным накоплением «токсических осмолитов» (глутамина, аланина и лактата), а также развитие окислительного и нитрозативного стресса считаются ключевыми причинами, вызывающими отек мозга и гибель организма при острых формах ПЭ [3, 4]. Исследования токсического действия NH_4^+ на нейронные сети стали проводиться только в последние годы [5, 6].

Ранее на нейрональных культурах, с использованием методов флуоресцентной микроскопии и регистрации клеточных потенциалов (метод Пэтч-клямпа), нами было показано, что избыток NH_4^+ (5-8 мМ NH_4Cl) вызывает гипервозбуждение нейронных сетей, характеризующееся генерацией пачек импульсов с деполяризацией мембраны

нейронов на 20-30 mV в фазе плато потенциала действия. Этому режиму соответствует возникновение высокоамплитудных Ca^{++} -колебаний, с высоким средним за период уровнем Ca^{++} в каждой клетке [6].

Было установлено, что различные вещества, относящиеся к классам метиламинов и бигуанидинов, способны эффективно подавлять гиперактивацию нейронных сетей NH_4Cl , активируя тормозные рецепторы нейронов [6]. Поэтому одной из задач данной работы является выявление эффективности действия на нейронные сети хорошо известного метиламина – витамина U. Также было показано, что кофермент NAD^+ , агонист пуринорецепторов (P2Y_{11}) [7] и регулятор ряда калиевых каналов [8],- способен временно подавлять такую гиперактивацию нейронных сетей при действии NH_4Cl , разделяя синхронно осциллирующую сеть на несколько групп нейронов с различными типами ответов [9].

Хорошо известно, что имея близкий к K^+ ионный радиус, NH_4^+ способен проходить через различные катионные каналы. Известно также, что ион аммония (по не выясненному до сих пор механизму) способен активировать НМДА-зависимые катионные каналы, приводя к накоплению Ca^{++} , развитию окислительного и нитрозативного стресса и дисфункции клеток мозга [13, 14]. Поэтому выявление таких каналов, возможных мишеней действия иона аммония, является одной из основных задач настоящей работы.

Материалы и методы.

Нейроглиальные культуры клеток гиппокампа получали из новорожденных (P1–3) линейных крыс породы Спрэг Долли, как это описано ранее [6, 9]. Эксперименты проводили на культурах в возрасте 10–18 дней (10–18 DIV). Окрашивание клеток и концентрацию ионов кальция в цитоплазме $[\text{Ca}^{2+}]_i$ оценивали с помощью двухволнового зонда Fura-2, как это описано ранее [6]. Для окраски клеток гиппокампа использовали эфир Fura-2 AM в конечной концентрации 4 мкМ в растворе Хенкса, содержащем (в mM): 156 NaCl, 3 KCl, 1 MgSO_4 , 1.25 KH_2PO_4 , 2 CaCl_2 , 10 глюкозы и 10 HEPES, pH 7.4. Для регистрации уровня кальция в цитоплазме клеток использовали систему анализа изображений Cell Observer (Carl Zeiss, Германия), на базе инвертированного микроскопа Axiovert 200M, оснащенного монохромной CCD-камерой AxioCam HSm и системой высокоскоростной смены возбуждающих светофильтров Ludl MAC5000. Добавление реагентов и отмывку проводили путем замены среды в десятикратном объеме с помощью

системы, обеспечивающей перфузию со скоростью 15 мл/мин. Измерения проводили при 28°C. Серии изображений получали с интервалом в 1 с. Время получения одного двухканального кадра не превышало 400 мс. Для выявления нейронов в эксперименте была предусмотрена кратковременная (20 с) тестовая добавка 35 мМ KCl. Амплитуду кальциевых ответов одиночных клеток определяли, как отношение сигналов флуоресценции Fura-2 при возбуждении 340 и 380 нм. Для построения графиков и статистической обработки использовали Origin 8.5.

Материалы. Апамин (apamin) и бикикуллин (bicuculline) были приобретены у компании Tocris Bioscience (Великобритания); сбалансированный солевой раствор Хенкса, нейробазальная среда, В-27, фетальная бычья сыворотка – производства Gibco, гентамицин – Дальхимфарм (Россия); 0,1% полиэтиленимин; L-methionine methyl hydrochloride (витамин U), кофермент NAD⁺, L-глутамин, L-глутамат, L-аргинин и бетаин (Sigma-Aldrich, США); KCl (Химмед, Россия); Fura-2AM (Invitrogen, США). Все исследования на животных были проведены в соответствии с требованиями законодательства и были одобрены Комитетами по этике работы с животными ИТЭБ РАН и ИБК РАН.

Результаты и обсуждение

Ион аммония, добавленный в виде соли NH₄Cl в среду инкубации нейроглиальных клеток в концентрации 5 мМ и выше, вызывает быструю гиперактивацию нейронных сетей. При меньших концентрациях аммония необходима длительная инкубация культур с этим токсином. Такие режиму импульсной активности нейронов сети характеризуются высокоамплитудными Ca⁺⁺-колебаниями во всех нейронах сети и медленным ростом Ca⁺⁺ до некоторого стационарного среднего уровня или хаотическими Ca⁺⁺-колебаниями в астроцитах [6]. Таким образом, регистрируя изменения Ca⁺⁺, можно оценивать состояние сети и выделять группы клеток с различными типами активности.

Влияние метил L-метил-метионина на активность нейронных сетей.

На рис.1А представлено поведение репрезентативной клетки (одного из 123 нейронов в сети), характеризующей общее состояние сети. Добавка 200 нМ L- глутамата не приводит к активации молчащей сети. Последующее введение бикикуллина, блокатора ГАМК_A-рецепторов, приводит к известному дисингибированию сети и резкому увеличению амплитуды Ca⁺⁺-колебаний. Добавки NH₄Cl, даже на этом фоне, приводят к

дальнейшему увеличению частоты Ca^{++} -колебаний и росту базового уровня Ca^{++} в клетках. Витамин U подавляет генерацию таких колебаний в сети. Реакция тестируемой клетки на добавленный KCl показывает, что эта клетка является нейроном. Этот эксперимент был проведен при преинкубации клеток с ингибитором $G_{i/o}$ белков pertussis toxin, что позволяет исключить влияние витамина U на внутриклеточные системы, активируемые этими белками. В режиме, представленном на рис. 1Б (1 из 96 клеток), добавке метил L-метионина предшествовало введение другого метиламина-бетаина. Видно, что в присутствии блокатора ГАМК-рецепторов бикикуллина, ингибирование сети бетаином отсутствует, тогда как действие метил L-метионина сохраняется. Ранее было показано, что бетаин способен эффективно подавлять активацию нейронных сетей ионом аммония, вызывая ГАМК-подобный эффект [6].

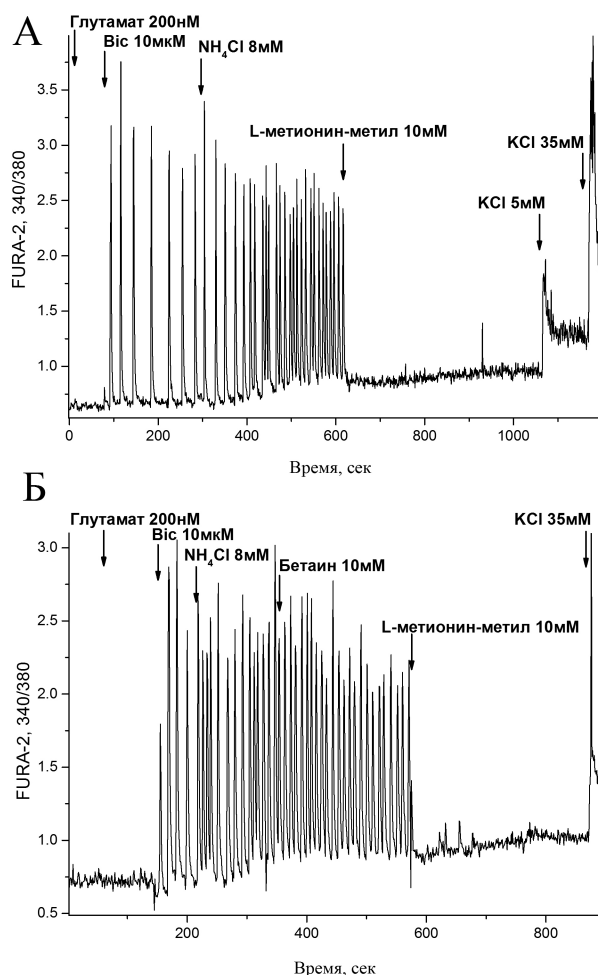


Рис.1 Влияние метил L-метионина на активность нейронных сетей.

В экспериментах, представленных на рис. А и В использована культура нейроглиальных клеток 12 DIV, содержащие 123 и 96 нейронов, соответственно. Представлены Ca^{++} -ответы репрезентативных клеток с типичными (одинаковыми для всех клеток сети) ответами на аппликацию L-глутамата (L-Glutamate), бикикуллина (Bic), NH₄Cl, бетаина (Betaine) и метил L-метионина (L-methionine methyl hydrochloride). Прямыми линиями отмечены интервалы времени введения данных веществ. Концентрации указаны

на рисунках. Культура клеток до начала эксперимента инкубировалась в течение 20 мин с ингибитором $G_{i/o}$ белков Pertussis toxin (1 мкг/мл).

Таким образом, можно заключить, что ингибирование активности нейронных сетей витамином U может быть связано с другими механизмами, например с его влиянием на тормозные метаботропные рецепторы, включая рецепторы мускаринового типа, K^+ -каналы и др.

Участие активируемых гиперполяризацией циклонуклеотид-зависимых катионных (HCN)-каналов в активации нейронных сетей аммонием.

Известно, что блокатор HCN-каналов ZD7288 в больших концентрациях способен вызывать частичное ингибирование НМДА и АМПА/каинатных рецепторов ионотропных Na^+ / Ca^{++} -каналов [10]. В эксперименте, представленном на рис.2, нами выбрана концентрация ZD 7288, которая не приводит к заметному ингибированию этих рецепторов. Представлен ответ одной репрезентативной клетки сети (1 из 114 нейронов). Активация молчащей нейронной сети L- глутаматом сохраняется, хотя имеет место уменьшение амплитуды и увеличение частоты Ca^{++} -колебаний в присутствии ZD 7288. Последующие добавки NH_4Cl , вызывают кратковременную гиперактивацию клеток в сети, которая быстро сменяется повышением и медленным ростом Ca^{++} в клетке. Известно, что играющие важную роль в регуляции межимпульсных интервалов, HCN-каналы неселективны и обладают проводимостью к катионам разных типов [11]. Поэтому, на основании полученных данных, можно предполагать важную роль активации этих каналов ионом аммония NH_4^+ в возникновении наблюдающихся режимов гиперактивации нейронных сетей.

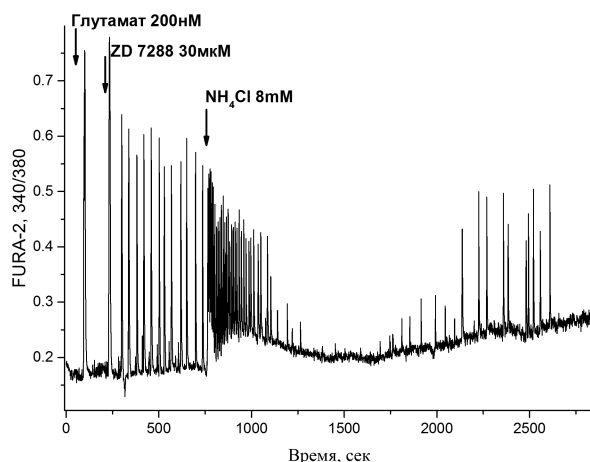


Рис.2 Участие HCN-каналов в активации нейронных сетей аммонием.

В эксперименте использована культура нейроглиальных клеток 14 DIV, содержащая 114 нейронов. Представлен ответ репрезентативной клетки с типичным ответом (активацией и затуханием колебаний и ростом базового

уровня Ca^{++}) на аппликацию L-глутамата, блокатора HNC-каналов ZD 7288 и NH_4Cl . Остальные обозначения, как на рис.1.

Влияние NAD^+ на активацию нейронных сетей аммонием.

Кофермент NAD^+ выполняет разнообразные функции в клетках разных типов: участвует в метаболических процессах окисления различных субстратов, обеспечивая перенос водорода; является субстратом группы ферментов сиртуинов –ацетилаз, участвующих в регуляции активности ключевых белков метаболических систем и ядерных гистонов [12]; является субстратом ADP-рибозил циклазы (CD 38), обеспечивающей синтез цикло-ADP-рибозы, коагониста рианодинного рецептора внутриклеточных Ca^{++} -депо ретикулума; является агонистом пуринаргических рецепторов (P_2Y_{11}) [7] и регулятором калиевых каналов разных типов [8].

Ранее было показано, что NAD^+ может вызывать расслабление колец аорты крыс, предсокращенных фенилэфрином [15], по-видимому, вызывая активацию K-каналов и гиперполяризацию гладкомышечных клеток. В отсутствие NAD^+ , расслабляющий эффект никотинамида, продукта и ингибитора реакции синтеза цикло-ADP-рибозы (CD 38), был выражен значительно сильнее и также приводил к полному расслаблению препаратов, независимо от функционального состояния системы синтеза NO [15]. В экспериментах на нейроглиальных культурах добавки NAD^+ после активации сетей аммонием, приводили к диссоциации сетей на несколько групп нейронов с частичным или полным временным подавлением синхронной активности всех клеток сети [9]. В то же время аппликация 1-5 mM никотинамида к нейронным сетям, активированным аммонием, не оказывает радикального влияния на состояние сети, что может свидетельствовать о преимущественном действии NAD^+ на K-каналы.

Суммируя эти данные можно предположить, что подавление активности нейронных сетей NAD^+ связано главным образом с активацией потенциал и Na^+ -зависимых K^+ -каналов нейронов, обеспечивающих гиперполяризацию этих клеток. На рис. 3А и 3В представлен эксперимент, выполненный на одной нейроглиальной культуре. В этой культуре NAD^+ вызывает полное подавление активности всех клеток сети, активированной введением 200 nM L-глутамата. Последующая добавка NH_4Cl приводит к диссоциации сети на две группы нейронов. В первой группе (23 клетки из 87 клеток сети; рис. 3Б) сразу же индуцируются Ca^{++} -колебания, амплитуда которых и базовый

уровень Ca^{++} увеличиваются до некоторой стационарной (пороговой) величины Ca_t^{++} , в течение 260 - 280 сек. Во второй группе нейронов (64 из 87 клеток) в этот период времени наблюдается только рост уровня Ca^{++} до порогового значения Ca_t^{++} , после достижения которого происходит быстрая активация этой группы нейронов и восстановление активности всей сети. Исключить также влияние первой группы нейронов на быстрое восстановление импульсаций во второй группе невозможно, поскольку Ca^{++} - колебания максимальной амплитуды в обеих группах достигаются одновременно.

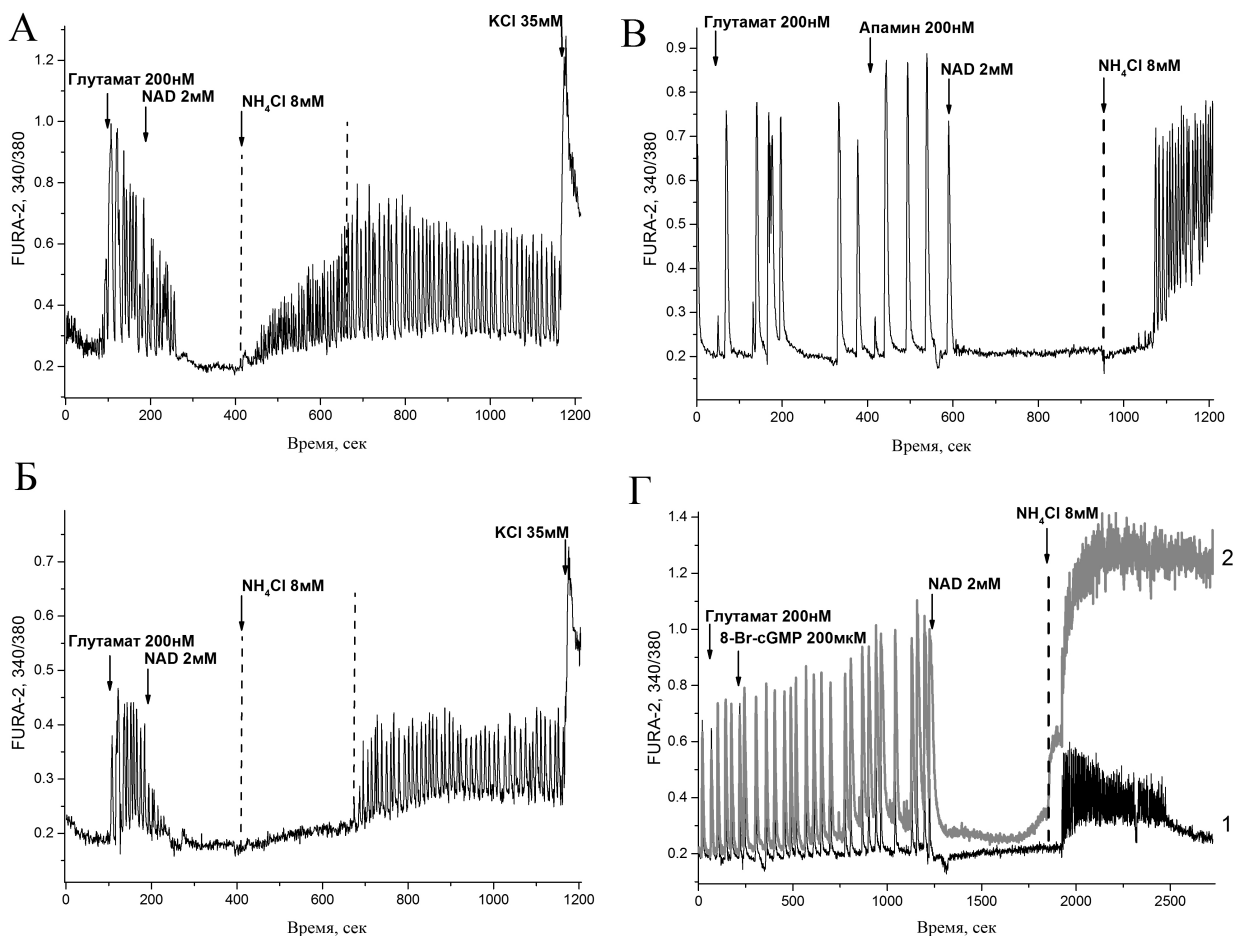


Рис. 3 Влияние NAD^+ и возможное участие медленных Ca^{++} -зависимых калиевых каналов (SK) и киназы G (PKG) в активации нейронных сетей аммонием.

В экспериментах использованы культуры нейроглиальных клеток 14-16 DIV, содержащие 87 (А, В), 116 (Б) и 103 (Г) нейронов, соответственно. На рис. А и В представлены ответы двух репрезентативных клеток, характеризующих две группы нейронов с разным типом ответов на добавку NH_4Cl в одной нейроглиальной культуре, включающей 87 клеток. Первая группа содержит 23 из 87 клеток (рис.А), а вторая- 64 клетки из 87 (рис.В). На

рис.Б представлены ответы одной репрезентативной клетки, характерные для всех клеток сети. Культура клеток преинкубирована с блокатором медленных Ca^{++} -зависимых калиевых каналов (SK-каналов) апамином (Aramin). На рис. Г представлены ответы двух репрезентативных клеток, характеризующих наличие двух групп нейронов в сети с разным кальциевым ответом на аппликацию NH_4Cl (Группа 1-40% клеток, а Группа 2-60% клеток сети). Культура клеток (96 нейронов) преинкубирована с 8-bromo-cyclo GMP – аналогом cGMP и активатором протеинкиназы G (PKG). Группы 1 и 2 включают 40% и 60% клеток сети, соответственно. Остальные обозначения, как на рис.1.

Возможное участие медленных Ca^{++} -зависимых калиевых каналов (SK) в регуляции активности сети. В присутствии 200-300 нМ апамина (aramin), ингибитора медленных Ca^{++} -зависимых K^+ -каналов (SK), временной сдвиг между группами клеток исчезает и быстрое восстановление активности сети наблюдается только через 120-130 сек, после достижения всеми клетками сети порогового уровня Ca_i^{++} (рис. 3В), что указывает на участие ряда Ca^{++} -каналов и SK-каналов в восстановлении импульсной активности нейронов первой группы. Это также может означать, что экспрессия таких каналов в нейронах первой группы выражена значительно сильнее, чем в нейронах второй группы. В отсутствие добавленного NAD^+ , последовательные добавки апамина (в сумме до 3 мкМ) приводят к уменьшению гиперактивации сети избытком NH_4Cl , уменьшая частоту генерации Ca^{++} -колебаний и оставляя без изменения базовый уровень Ca^{++} и амплитуду колебаний. Учитывая неселективность NCH-каналов, их активацию в условиях гиперполяризации, вызываемой NAD^+ , низкую проводимость НМДА и АМПА/каинат-зависимых каналов в условиях гиперполяризации, можно предположить, что рост Ca^{++} , наблюдающийся после введения NH_4Cl , - обусловлен в первую очередь активацией NCH-каналов и последующим включением SK-каналов и других Ca^{++} -зависимых каналов.

Участие протеин киназы G (PKG) в регуляции активности сети. Известно, что сигнальная цепочка NO/cGMP/PKG, играет важную роль в регуляции импульсной активности нейронов, элементы которой (и в первую очередь PKG) участвуют в регуляции активности ряда каналов и транспортных систем, включая HCN, калиевые каналы и др. [11, 16]. Считается, что дисрегуляция этой цепочки в условиях гипераммонемии (при избыточной активации НМДА-рецепторов), приводит к развитию окислительно-нитрозативного стресса [4, 13, 14, 17]. Из данных представленных на Рис.3 Д видно, что

преинкубация кокультур клеток нейронов и астроцитов с активатором PKG 8-bromo-cyclo GMP, не приводит к сильным изменениям спонтанной периодической активности сети, вызванной L-глутаматом. Добавленный NAD^+ полностью подавляет активность сети в этих условиях. Последующая аппликация NH_4Cl вызывает быструю гиперактивацию всей сети в течение 80-100 сек при сохранении разделения нейронов на групп с быстрым и задержанным кальциевым ответом на NH_4Cl . Однако, в отличие от устойчивого гиперактивного состояния сети (Рис. 3А, В), избыточная активация PKG приводит к быстрому затуханию периодической активности сети с переходом части нейронов сети (Группа 2 - 56 клеток из 96 клеток сети) в устойчивые состояния с высоким уровнем Ca^{++} , что может приводить к последующей гибели таких клеток.

*О вовлечении метаботропных глутаматных рецепторов I типа (*mGLUR 1,5*) и липидкиназы (*PI3K*) в активацию сети аммонием.* В Таблице 1 приведены сводные данные о влиянии на периодическую активность нейронной сети, вызываемую L-глутаматом и NH_4Cl , антагониста (LY367385) и агониста (DHPG) рецепторов *mGLUR 1,5* и ингибитора PI3K (LY294002). Представлен также эффект комбинированного действия LY367385 и LY294002. Эти результаты свидетельствуют о том, что рецепторов *mGLUR 1,5* и PI3K не вовлечены в активацию сети ионом аммония.

Таблица 1. Влияние некоторых агонистов и активаторов, антагонистов и ингибиторов на гиперактивацию нейронных сетей аммонием.

Агонисты или антагонисты	Изменение периода Ca^{++} -колебаний, индуцированных L-глутаматом (200 нМ)	Влияние на активацию нейронной сети ионом аммония (NH_4Cl -8 mM)	Примечания
Агонист <i>mGLUR I</i> * DHPG, 10 мкМ	Уменьшение периода и увеличение амплитуды колебаний	Не влияет	Выделяется группа нейронов с высоким средним за период уровнем Ca_i^{++}
Антагонист <i>mGLUR I</i> LY367385, 50мкМ	Увеличивает периода колебаний	Не влияет	
Ингибитор <i>PI3K</i> ** LY294002, 10 мкМ	Увеличивает периода колебаний	Не влияет	
LY367385 + LY294002	Увеличивает периода колебаний	Не влияет	

Активатор PKG *** 8-bromo-cyclo GMP, 20 мкМ	Увеличивает период и амплитуды колебаний	Влияет	Сеть разделяется на группы нейронов с затухающими колебаниями и высокими низкими величинами Ca_i^{++} .
*– Метаботропные глутиматные рецепторы 1 типа- <i>mGLUR I</i> , ** – липидкиназа фосфоинозитол-3-фосфата – <i>PI3K</i> , *** – протеин киназа G – PKG.			

Выводы

1. Эффективное подавление витамином U гиперактивации нейронных сетей, вызываемой ионом аммония показывает, что фармакологическая коррекция токсических эффектов NH_4^+ (гипераммонемии) может быть осуществлена без использования блокаторов различных каналов, ингибиторов транспортных систем или ферментов, как это предлагается в ряде исследований [1, 3, 4, 14, 16-20].
2. Активация НМДА – зависимых катионных каналов ионом аммония рассматривается, как один из ключевых элементов, приводящих к дисфункции мозга в условиях гипераммонемии [13, 14, 17]. Эксперименты, проведенные с использованием кофермента NAD^+ и ингибиторов HCN- и SK- каналов и активатора PKG, свидетельствуют об участии этих каналов в механизмах гиперактивации нейронных сетей ионом аммония, что может позволить в дальнейших исследованиях выявить точные механизмы токсического действия аммония на клетки мозга.

Работа была выполнена при поддержке РФФИ (Грант №[14-04-01597](#)).

Авторы выражают свою искреннюю благодарность проф. Зинченко В.П. за любезно предоставленную возможность использования приборов и оборудования, поддержку и интерес к работе.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. [Braissant O.](#), [McLin V.A.](#), [Cudalbu C.](#) Ammonia toxicity to the brain // *J Inherit .Metab. Dis.*, 2013, vol. 36, pp. 595–612.
2. Nencki M., Pawlow J.P., Zaleski J. Ueber den Ammoniakgehalt des Blutes und der Organe. Die Harnstoffbildung bei den Säugetieren // *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* , 1896, vol. 37, pp. 26–51.
3. [Shawcross D.L.](#), [Davies N.A.](#), [Williams R.](#), [Jalan R.](#). Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis // [J Hepatol.](#) , 2004, vol. 40(2), pp.247-54.
4. Häussinger D., Görg B. Interaction of oxidative stress, astrocyte swelling and cerebral ammonia toxicity// *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 2010, vol.13, pp. 87– 92.
5. Schwarz C.S., Ferrea S., Quasthoff K. et al. Ammonium chloride influences in vitro-neuronal network activity// *Exp. Neurol.* ,2012, vol. 235 (1), pp. 368–373.
6. Dynnik V.V., Kononov A.V., Sergeev A.I, Zinchenko V.P. To break or to brake neuronal network accelerated by ammonium ions? // *PLoS ONE*, 2015, vol. 28, N10(7), pp. 1-30. e0134145, DOI: 10.1371/journal.pone.0134145
7. [Moreschi I.](#), Bruzzone S., Nicholas R.A et al. Extracellular NAD⁺ is an agonist of the human P2Y₁₁ purinergic receptor in human granulocytes. // *J. Biol. Chem.*, 2006, vol. 281(42), pp. 31419-29.
8. Kilfoil P.J., Tipparaju S.M., Barski O.A. et al. Regulation of ion channels by pyridine nucleotides. // *Circ. Res.* , 2013, vol. 112 (4), pp.721–741.
9. Zinchenko V.P., Turovsky E.A., Turovskaya M.V. et al. NAD dissociates neural networks into subpopulations of neurons by inhibiting the network synchronous hyperactivity evoked by ammonium Ions. // *Biocemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and cell biology*, 2016, vol. 10(3), pp. 21-30.
10. [Wu X.](#), [Liao L.](#), Liu X et al. Is ZD7288 a selective blocker of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel currents? // *Channels (Austin)*, 2012, vol. 6(6), pp. 438-42.
11. He C., Chen F., Li B., Hu Z. Neurophysiology of HCN channels: from cellular functions to multiple regulations. // *Prog Neurobiol.* , 2014, vol 112, pp.1-23.
12. [Houtkooper R.H.](#), [Pirinen E.](#), [Auwerx J.](#) Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan.// [Nat Rev Mol Cell Biol.](#) ,2012, vol 13(4), pp. 225-38.

- 13 . Kosenko E., Kaminsky Y., Grau E. [et al.](#) Brain ATP depletion induced by acute ammonia intoxication in rats is mediated by activation of the NMDA receptor and Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase. // J Neurochem., 1994, vol.63, pp. 2172–8.

14. Cauli O., Gonzalez-Usano A., Cabrera-Pastor A., Gimenez-Garzo C., Lopez-Larrubia P., Ruiz-Sauri A. et al. Blocking NMDA receptors delays death in rats with acute liver failure by dual protective mechanisms in kidney and brain.// Neuromolecular Med., 2014, vol. 16, pp. 360–75.

15. Andreeva L.A., Grishina E.V., Sergeev A.I. et al. EMERGENCE OF ACETYLCHOLINE RESISTANCE AND LOSS OF RHYTHMIC ACTIVITY ASSOCIATED WITH THE DEVELOPMENT OF HYPERTENSION, OBESITY, AND TYPE 2 DIABETES// Biocemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and cell biology, 2016, vol. 10(3), pp. 1-10.

16. Fiscus R.R. Involvement of cyclic GMP and protein kinase G in the regulation of apoptosis and survival in neural cells. //Neurosignals, 2002, vol. 11(4), pp. 175-90.

17. [Gonzalez-Usano A.](#), [Cauli O.](#), [Agusti A.](#), [Felipo V.](#) Hyperammonemia alters the modulation by different neurosteroids of the glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway through NMDA-GABAA - or sigma receptors in cerebellum in vivo.// [J Neurochem.](#), 2013, vol. 125, pp. 133–43.

18. [Brusilow](#) S.W., Koehler R.C., Traystman R.J., Cooper A.J. Astrocyte glutamine synthetase: importance in hyperammonemic syndromes and potential target for therapy.// Neurotherapeutics, 2010, vol. 7, pp. 452–70.

19. [Bosoi C.R.](#), [Zwingmann C.](#), [Marin H.](#) et al. Increased brain lactate is central to the development of brain edema in rats with chronic liver disease.// [J Hepatol.](#), 2014, vol. 60, pp. 554–60.

20. Rangroo Thrane V., Thrane A.S., Wang F. et al. Ammonia triggers neuronal disinhibition and seizures by impairing astrocyte potassium buffering. // Nat Med., 2013, vol. 19, pp. 1643–8.