

674

Министерство Образования и науки РФ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования

«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ФИЗИОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Направление: академический бакалавриат

06.03.01 – биология


ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ АММОНИЯ НА ВЫХОДЯЩИЕ КАЛИЕВЫЕ ТОКИ

И Ca-ОСЦИЛЛЯЦИИ В КУЛЬТУРЕ GN3 КЛЕТОК КРЫСЫ

Работа завершена:

“20” июня 2018г.



(В.О. Атолагбе)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

д.б.н., профессор

“20” июня 2018г.



(Г.Ф. Ситдикова)

Заведующая кафедрой,

д.б.н., профессор

“20” июня 2018г.



(Г.Ф. Ситдикова)

Казань – 2018

## СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b>	<b>4</b>
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	<b>5</b>
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	<b>7</b>
1.1 Аммиак	7
1.1.1 Источники мозгового аммиака	8
1.1.2 Транспорт аммиака	10
1.1.3 Церебральная детоксикация аммиака	11
1.2 Физиологические эффекты	14
1.2.1 Энергетический обмен	17
1.2.2 Влияние на мембранный потенциал	18
1.2.3 Энцефалопатии	19
1.3 Кальций-активируемые калиевые каналы большой проводимости	23
1.3.1 Структура каналов	25
1.3.2 Аммиак и <i>ВК</i> -каналы	27
1.4 Кальциевые осцилляции	27
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b>	<b>29</b>
<b>2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b>	<b>29</b>
2.1 Объект исследования	29
2.1.2 Растворы	31
2.2 Электрофизиология	31

2.3	Метод флуоресцентной микроскопии	31
<b>3.</b>	<b>РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</b>	<b>35</b>
3.1	Дозозависимое влияние ионов аммония на интегральные выходящие $K^+$ -токи в <i>GH3</i> клетках.	35
3.2	Роль $Ca$ -активируемых $K$ -каналов с использованием блокатора тетраэтиламмония (ТЭА).	40
3.3	Влияние ионов аммония на активность $Ca^{2+}$ -активируемых $K^+$ -каналов при аппликации с наружной стороны мембраны.	42 <sub>[ЯВ1]</sub>
3.4	Влияние аммония на кальциевые осцилляции с использованием флуоресцентного маркера Fluo-4 AM.	44
	<b>ВЫВОДЫ</b>	<b>48</b>
	<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ</b>	<b>49</b>

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АМР	Аденозин-3-монофосфат
ПД	Потенциал действия
АТФ	Аденозинтрифосфат
ПАГ	Фосфат-активируемая глутаминаза
ЦНС	Центральная нервная система
ГАМК	Гамма-аминомасляная кислота
ЦСЖ	Цереброспинальная жидкость
ТЭА	Тетраэтиламмоний
ЭТЦ	Дыхательная цепь переноса электронов
GS	Глутаминсинтетаза
NAD	Никотинамидадениндинуклеотид
МАРК	Митоген-активируемая протеинкиназа
PDH	Пируватдегидрогеназа
ROS	Активные формы кислорода
TCA	Трикарбоновая кислота

## ВВЕДЕНИЕ

В физиологических условиях аммиак ежедневно образуется при метаболизме белков и тканей организма. Аммиак — это метаболит, который главным образом продуцируется в кишечнике во время переваривания белка и дезаминирования. Небольшая доля повторно используется для биосинтеза белка, нуклеотидов и других основных соединений, остальное - отходы с нейротоксическими свойствами, и они должны быть эффективно удалены из организма [V.Walker, 2014; Cooper *et al.*, 1987]. Аммиак включается в мочевины в печени и выводится с мочой. Цикл мочевины в печени регулирует концентрацию аммиака в системном кровообращении, поддерживая уровень аммиака в крови в низком диапазоне (50-100 мкМ) [C.R. Bosoi *et al.*, 2008].

В случае печеночной недостаточности уровень аммиака в крови увеличивается, и он пассивно диффундирует через гематоэнцефалический барьер в головной мозг, где концентрации могут достигнуть значений до 1-5 мМ, оказывая заметное нейротоксическое действие. У людей с тяжелой гипераммонемической энцефалопатией, симптомы появляются в течение нескольких дней и стремительно развиваются. У новорожденных неврологические нарушения прогрессируют от летаргии и рвоты, незаинтересованности в окружающей среде, дезориентации и сонливости к судорогам, коме и смерти. Иногда развитие гипераммонемической энцефалопатии происходит быстрее - с эпизодами, подобными инсультам [V.Walker 2014].

Особое внимание уделяется кальция-зависимым калиевым каналам (*BK*), поскольку они обычно экспрессируются в соме, в терминалях аксона и в дендритах. Было показано, что каналы *BK* играют значительную роль в нейрональной возбудимости, а также связаны с аутизмом и умственной отсталостью [Higgins JJ, 2008, Bachmann C. 2002], которые также наблюдаются при гипераммонемической энцефалопатии.

Токсичность аммиака была интенсивно исследована *in vitro*, а также *in vivo* на широком диапазоне моделей животных. Многие исследования продемонстрировали, что аммиак выступает в качестве основного вещества, участвующего в спектре нейропсихиатрических и неврологических симптомов, связанных с печеночной недостаточностью [Seiler 1993; Cooper & Plum 1987, Seiler 2002; V.V. Dynnik *et al.*, 2015]. Несмотря на явные свидетельства того, что аммиак обуславливает разнообразные эффекты на организм, непосредственный механизм влияния аммиака на *BK*-токи в гипераммонемическом мозге пока остается не выявленным.

Целью работы был анализ влияния и механизмов действия аммиака на активность  $Ca^{2+}$ -активируемых  $K^+$ -каналов большой проводимости (*BK*) каналов.

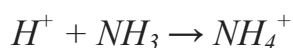
В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать дозозависимое влияние ионов аммония на интегральные выходящие  $K^+$ -токи.
2. Исследовать роль  $Ca^{2+}$ -активируемых калиевых каналов с использованием блокатора тетраэтиламмония (ТЭА).
3. Влияние ионов аммония на активность  $Ca^{2+}$ -активируемых  $K^+$ -каналов при аппликации с наружной стороны мембраны.
4. Выявить влияние аммония на кальциевые осцилляции с использованием флуоресцентного маркера *Fluo-4 AM*.

# 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

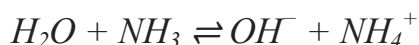
## 1.1 Аммиак

Аммиак — это соединение азота и водорода с формулой  $NH_3$ . Аммиак представляет собой бесцветный газ с характерным резким запахом. Одним из наиболее характерных свойств аммиака является его основность. Аммиак считается слабым основанием. Когда аммиак (рН 7,4) апплицируется на культивируемые клетки (например, астроциты),  $NH_3$  (<2%) быстро диффундирует через плазматическую мембрану и устанавливает равновесие внутри клетки путем комбинирования с цитозольным  $H^+$  с образованием  $NH_4^+$ :



Следовательно, внутриклеточный рН увеличивается, что приводит к внутриклеточному подщелачиванию.

Когда аммиак растворяется в воде, незначительное количество аммиака превращается в ионы аммония:



Аммиак в водных растворах является уникальной молекулой в том смысле, что он может действовать как слабое основание ( $NH_3$ ) или как слабая кислота ( $NH_4^+$ ), существующие в зависящем от рН равновесии, определяемом уравнением Хендерсона-Хассельбаха:

$$\log_{10} [NH_3/NH_4^+] = pH - pKa$$

При 37 °С рКа аммиака составляет 9,15 [Bromberg et al. 1960]. Поэтому в нормальных физиологических условиях (рН 7,4) более 98% аммиака присутствует в ионной форме ( $NH_4^+$ ). Обе формы влияют на рН, электролитическое, кислотно-основное и ионное равновесие. Термин «аммиак» будет относиться к двум химическим видам ( $NH_4^+$  и  $NH_3$ ), а при обращении к определенной молекулярной форме будут использоваться « $NH_4^+$ » или « $NH_3$ ».

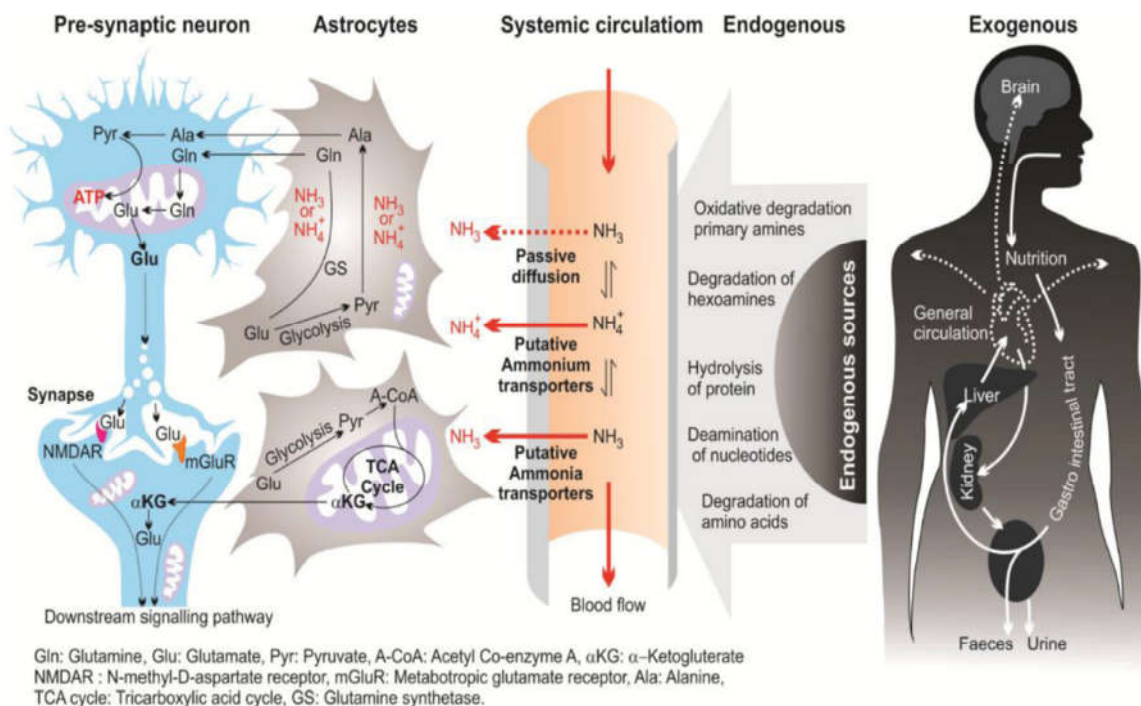
Все живые организмы производят аммиак в качестве побочного продукта клеточного метаболизма. При высоких концентрациях аммиак является токсичным и оказывает на функционирование клетки негативное влияние, которое может включать в себя нарушение клеточного энергетического метаболизма, митохондриальную дисфункцию, модуляцию воспалительных реакций и нейротрансмиссию в нейронах.

### **1.1.1 Источники мозгового аммиака**

В мозге млекопитающих аммиак производится в основном путем метаболизма предполагаемых нейротрансмиттеров глутамата и аспартата и моноаминов. В мозге аммиак синтезируется двумя основными путями: из эндогенных источников и из экзогенных источников [O'Donnell, 1997].

Эндогенные источники мозгового аммиака включают: гидролиз белков; деградации аминокислот (например, глутамина, аспарагина и глицина) и деградации гексаминов; деаминирование аминопуринов, аминопиримидинов и окислительное дезаминирование первичных аминов. Помимо дисфункции печени, повышение концентраций аммиака также может быть результатом дефицита метаболизма головного мозга или процессов детоксикации, вызванных значительным снижением активности синтеза глутамина. [Suarez *et al.*, 2002]. Другим источником аммиака в головном мозге является аденозин-3-монофосфатная (AMP) дезаминаза, которая регулирует обмен пуриновых нуклеотидов и превращает AMP в монофосфат инозина и аммиак. Более того, моноаминоксидаза (MAO) может быть вовлечена в меньшей степени в процесс производства аммиака в результате деградации нейромедиаторов и немедиаторных моноаминов.





**Рисунок 1.** Источники аммиака в организме

Из экзогенных источников (в желудочно-кишечном тракте) также производится большое количество аммиака, что является следствием бактериальной деградации мочевины и дезаминирования аминокислот [Marcaggi and Coles, 2001]. Нарушение цикла мочевины и недостаточное образование мочевины, врожденные заболевания метаболизма, бактериальная инфекция в кишечнике являются основными причинами накопления аммиака в головном мозге. В период заболевания или печеночной недостаточности аммиак плохо удаляется из организма (из-за нарушения мочеиспускания от гепатоцеллюлярной дисфункции и портальной системы) и высвобождается в системную циркуляцию, взаимодействуя со всеми органами [Rovira et al., 2008]. Глутаминаза, фермент, который вырабатывает глутамат и аммиак из глутамина и который содержится в кишечнике, почках и головном мозге (нейронах), также

<sup>1</sup> Рисунок взят из статьи «Ammonia as a Potential Neurotoxic Factor in Alzheimer's Disease» A. Adlimoghaddam, et al. 2016.

играет определяющую роль в развитии гипераммонемии.

Заболевания, вызывающие гипераммонемии, включают острую недостаточность печени (*ALF*), хронические заболевания печени (*CLD*) и портально-системное шунтирование [Felipo and Butterworth 2002]. Гипераммонемия также развивается у детей с врожденными нарушениями цикла мочевины и имеет тенденцию протекать с более высокими концентрациями аммиака в крови (до 5 мМ) по сравнению с приобретенными причинами (такими как *ALF* и *CLD*), которые обычно приводят к уровню гипераммонемии 0,2-1 мМ [Butterworth 2002; Lichter-Konecki *et al.*, 2008]. Аммиак выделяется посредством гидролиза глутамина в проксимальных почечных трубчатых клетках.

### 1.1.2 Транспорт аммиака

Аммиак в виде газа ( $NH_3$ ) является слабым основанием, незаряженным и липидорастворимым и, следовательно, способным проникать в мозг посредством диффузии. И наоборот, ионная форма аммиака ( $NH_4^+$ ) является слабой кислотой, водорастворимой и поэтому не может диффундировать через биологические мембраны; однако из-за своей ионной природы она может проникать через эпителий по электрохимическому градиенту через парацеллюлярный путь, основанный на ионной проницаемости плотных соединений и через различные транспортные каналы [Bosoi & Rose 2009]. Обычно считается, что аммиак попадает в клетки главным образом за счет диффузии  $NH_3$ , который затем ионизируется до  $NH_4^+$ . Интересно, что гидратированный  $NH_4^+$  имеет очень сходные ионные свойства с теми же свойствами  $K^+$  с аналогичным ионным радиусом 1,45 Å и аналогичным коэффициентом диффузии. Эти параллельные свойства позволяют  $NH_4^+$  конкурировать с  $K^+$  на мембранных ионных каналах, таких как внутренние выпрямляющие и потенциалзависимые калиевые каналы [Knepper *et al.*, 1989].

Эта конкуренция влияет на возбудимость нейронов и мембранный потенциал в нейронах млекопитающих.

Кроме того, было продемонстрировано, что  $NH_4^+$  пересекает клеточные мембраны, заменяя  $K^+$  на АТФаз-транспортеры  $Na^+/K^+$  (*NKA*) и  $H^+/K^+$  [Moser 1987]. Кроме того,  $NH_4^+/Cl^-$  и  $Na^+/K^+/Cl^-$  котранспортеры также продемонстрировали перенос  $NH_4^+$  [Aickin *et al.*, 1982]. Другие белки, переносящие аммиак в организме человека включают белки резуса (*Rh*): *RhAG*, *RhBG* и *RhCG* [Bakouh *et al.*, 2006], Аквапорины (*AQP*) [Saparov *et al.*, 2007],  $K^+$ -каналы. Перенос через мембрану осуществляется с помощью различных процессов [Adlimoghaddam A, *et al.*, 2016].

### 1.1.3 метаболизм аммиака в центральной нервной системе

В головном мозге гомеостаз аммиака тесно регулируется и связан с рециркуляцией основных возбуждающих и ингибирующих нейромедиаторов глутамата и  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (ГАМК) [Paulsen *et al.*, 1987; Bak *et al.* 2006]. Из ранних исследований, подтвержденных исследованиями [ $^{13}N$ ] аммиака, известно, что почти весь (приблизительно 98%) аммиак, поступающий в мозг из крови и цереброспинальной жидкости (*ЦСЖ*), включается в амидную группу глутамина и, следовательно, метаболизируется глутамин синтетазом (*GS*). Это происходит очень быстро (через 3 секунды у крыс). Предварительная обработка крыс ингибитором *GS* *L*-метионин-*S*, *R*-сульфоксимином (*MSO*) значительно снижает это объединение. Активность *GS* увеличивается при гипераммонемии, а производство глутамина возрастает, но есть ограничение на эту способность [J. Cooper & F. Plum, 1987]. Менее 2% аммиака включено в глутамат глутаматдегидрогеназой (*GDH*). Синтез глутамина происходит по большей части в астроцитах, в которых в основном находится *GS*, и в небольшой степени - в нейронах. Так как астроциты образуют синцитий с их синаптическими нервными окончаниями, покрывая мозговые капилляры, и их

выступами, прилегающими к желудочковой эпендиме и нейронам, они выгодно расположены для обработки аммиака. Интересно, что *GS* в астроцитах имеет более высокое сродство к аммиаку, чем глутамат, что указывает на то, что удаление аммиака может быть более важным, чем удаление основного возбуждающего нейромедиатора [Waniewski 1992]. Некоторые из полученных глутаминов диффундируют или секретируются в ЦСЖ, а концентрации глутамина в цереброспинальной жидкости значительно выше, чем концентрации других аминокислот. Нет никаких доказательств того, что значительные количества экспортируются непосредственно в кровоток. Около 80% глутамина обычно используется для пополнения нейротрансмиттеров, *L*-глутамата и ГАМК [D.L. Rothman *et al.*, 2001]. Было высказано предположение, что это происходит с помощью глутамат-глутамина и ГАМК-глутамин-глутамат челноков, и эти концепции в настоящее время широко признаны.

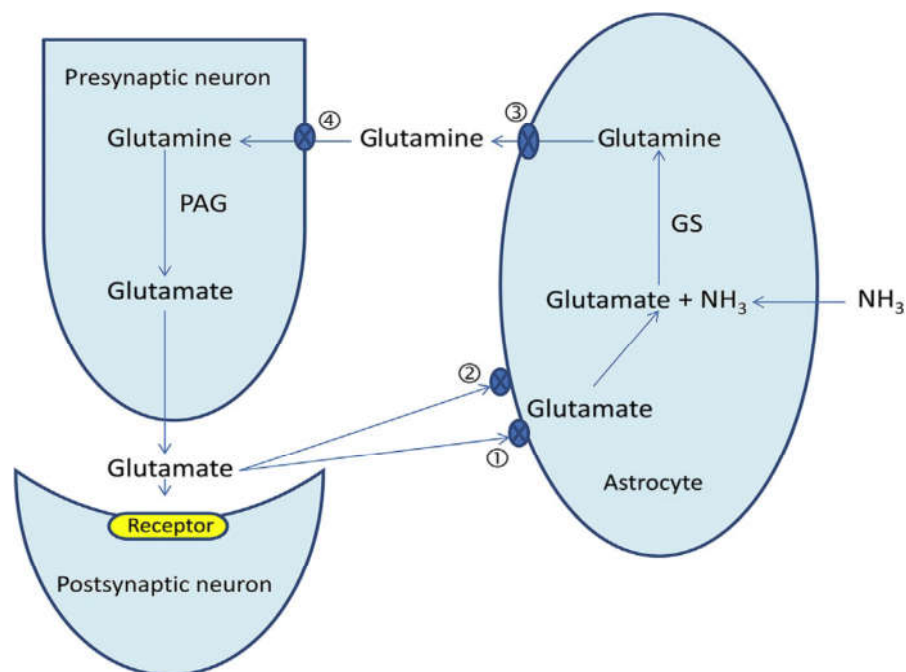


Рисунок [ЯВВ2] 2 Цикл глутамата/глутамина между глутаматергическими нейронами и астроцитами. GS, глутаминсинтетаза; ПАГ, фосфат-активированная глутаминаза, ①GLAST, глутамат-аспартат-транспортер, SLC1A3 (EAAT1, переносчик 1 возбуждающих аминокислот); ②GLT1, транспортер 1 глутамат, SLC1A1 (EAAT2, транспортер 2 возбуждающей аминокислоты); ③SNAT3 и/или SNAT5, переносчик 3/5 с натриевой связью нейтральных аминокислот, ④SNAT1, и/или SNAT2, и/или SNAT7, переносчик 1/2/7 с натриевой связью нейтральных аминокислоты [V. Walker, 2014].

Таким образом, аммиак, входящий в астроциты, сочетается с глутаматом *GS* с образованием глутамина. Это соединение переносится с натрием во внеклеточное пространство одним или несколькими связанными с натрием переносчиками аминокислот (*SNAT*), которые экспрессируются в астроцитах ( $Na^+$  - аминокислотные котранспортеры *SNAT1* и 2 [*SLC38A1* и 2] и  $Na^+$  - аминокислотные котранспортеры -  $H^+$  антипортеры *SNAT3* и 5 [*SLC38A3* и 5]). Глутамин затем импортируется в глутаматергические нейроны одним или несколькими нейрональными *SNAT* (*SNAT1*, 2 и 7 [*SLC38A7*]) [S. Sreedharan *et al.*, 2011] и гидролизуется ПАГ до глутамата и аммиака. Поскольку нейрональный ПАГ ингибируется его продуктами (отрицательная обратная связь), таким образом контролируется производство глутамата. После высвобождения в синаптические щели глутамат, не связанный с постсинаптическими рецепторами, переносится с натрием и водородом в астроциты с помощью переносчиков глутамата-аспартата *GLAST* (транспортёр 1 возбуждающий аминокислоты [*EAAT1*], *SLC1A3*) и переносчик глутамата *EAAT2* (*SLC1A2*), в обмен на калий. Это может быть использовано *GS* для образования глутамина [S.W. Brusilow *et al.*, 2010; A.J.L. Cooper, F. Plum, 1987].

Хотя большая часть глутамата повторно используется, 10-30% рециркулирующего глутамата / глутамина теряется за счет катаболизма в основных условиях. Чтобы сохранить цикл и поддерживать запасы нейронов, существует постоянная потребность во вновь продуцированном глутамате. Для этого требуется 2-оксоглутарат и источник азота. 2-оксоглутарат отбирается из цикла ТСА, который затем пополняется оксалоацетатом или, в гораздо меньшей степени, другими субстратами, такими как сукцинат. Преобразование этих промежуточных соединений в 2-оксоглутарат через цикл ТСА также требует ацетил-*CoA*, продуцируемого путем окислительного метаболизма пирувата или ацетоацетата. Основной анаплеротической реакцией в мозге является карбоксилирование пирувата до оксалоацетата пируваткарбоксилазой.

Поскольку этот фермент экспрессируется в астроцитах и олигодендроцитах, но не в нейронах [В. Х. Робинсон, 2001; R. Murgin 2009], глутаматергические (и ГАБАэргические) нейроны сильно зависят от астроцитов при получении глутамата. Однако они обладают ограниченной способностью к анаплерозному карбоксилированию пирувата, которое может быть опосредовано фолиевым ферментом. Используя высокочувствительный  $^{13}C$ NMR, Duarte *et al.* недавно продемонстрировали существенные темпы карбоксилирования анаплеротического пирувата и активности цикла *TCA* в астроцитах крыс, что свидетельствует о высокоглиальном окислительном метаболизме [Б. Lanz, 2011]. В других исследованиях  $^{13}C$ NMR чистая формация глутамата, глутамина и ГАМК составляла 20% от оборота цикла *TCA* у людей, и было подсчитано, что до 30% глутамина, переносимого на нейроны, может быть получено из анаплероза в астроцитах. Трансаминирование из аспартата и аминокислот с разветвленной цепью может обеспечить амино-N глутамата. Из недавних исследований на модели мыши аспартат является основным донором -N- для синтеза глутамата. Важность анаплероза для нормальной функции мозга продемонстрирована у пациентов с унаследованным дефицитом пируваткарбоксилазы [С. Zwingmann, 2007; J.M. McDonald, 1979].

## 1.2 Физиологические эффекты гипераммонемии

У животных с моделированной печеночной недостаточностью развивается гипераммонемия и печеночные энцефалопатии, которые связаны с массивом биохимических, физиологических и молекулярных изменений (рис. 3). В физиологических условиях с *pH* крови 7.4, более 98% аммиака находится в форме  $NH_4^+$ , а остальная часть проявляется как  $NH_3$ . Обе формы влияют на *pH*, электролитическое, кислотно-основное и ионное равновесие. Обе формы аммиака оказывают токсическое действие, потенциально нарушая *pH*-баланс цитоплазмы и жидкостей организма. Аммиак изменяет как внутриклеточный,

так и внеклеточный  $pH$  и может вызвать внутриклеточное подкисление, а также ощелачивание – в зависимости от концентрации аммония,  $pH$  и скорости переноса  $NH_3$  и  $NH_4^+$  через клеточную мембрану. Аммиак-индуцированные изменения  $pH$ , мембранного потенциала, а также изменения в клеточном метаболизме отрицательно влияют на функцию клеток, воздействуя на пути передачи сигналов, активность многих ферментов, процессы фосфорилирования белка и состояние других различных ионных каналов и транспортеров [Norenberg 1998, Cudalbu 2013].

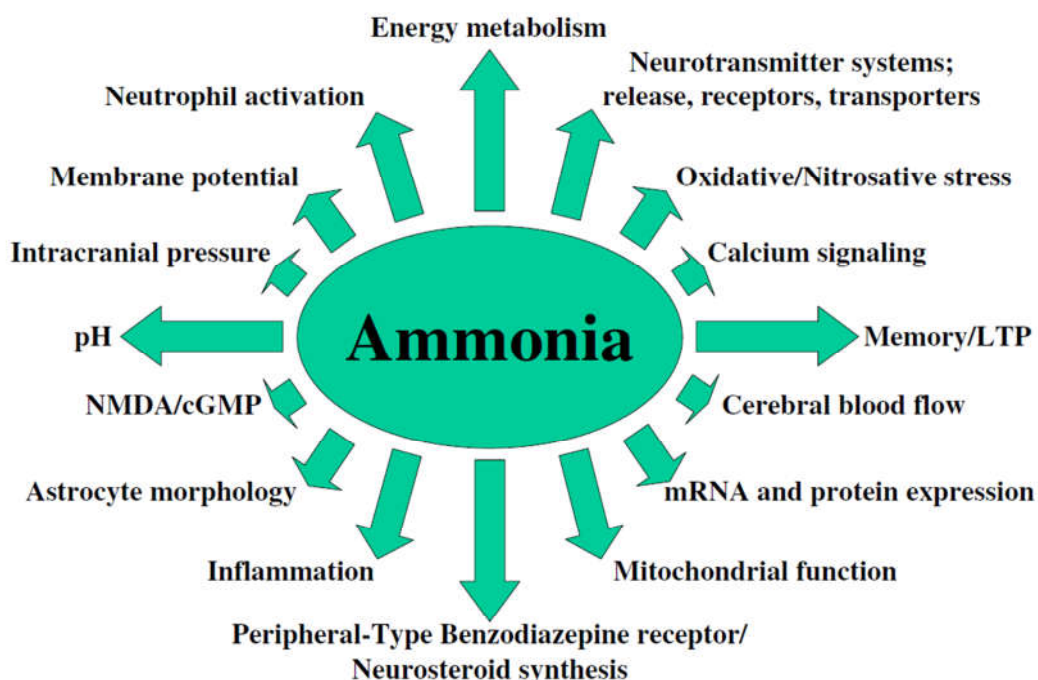


Рис 3. **Церебральные** Физиологические эффекты, вызванные токсическим действием аммиака [Bosoi & Rose, 2008].

Кроме того, ионы аммония ингибируют важные ферменты, участвующие в белковом метаболизме, такие как альфа-кетоглутаратдегидрогеназа и изоцитратдегидрогеназа, что в конечном итоге приводит к образованию свободных радикалов [Cooper and Plum, 1987] и к избыточному выделению оксида азота ( $NO$ ) путем стимуляции цитралин- $NO$ -цикла [Bachmann *et al.*,

2004; Zielinska *et al.*, 2011]. Изменение интенсивности синтеза *NO* и уровня окислительного стресса может привести к индукции перехода митохондриальной проницаемости (*MPT*) (Halestrap *et al.*, 1997; Kowaltowski *et al.*, 2001), изменению проницаемости *BBB* (на некоторых моделях болезней) [Rangroo Thrane *et al.*, 2012; Skowronska & Albrecht 2012, Braissant *et al.*, 2013] и активации *MAPK* [Cagnon and Braissant 2009].

В клеточных линиях микроглии и астроглиомы аммиак влияет на основные функциональные активности, такие как фагоцитоз и эндоцитоз. Кроме того, аммиак модифицирует секрецию цитокинов и повышает активность лизосомальных гидролаз [Atanassov *et al.*, 1994, 1995]. Было показано, что в мозге крысы высокие концентрации аммиака взаимодействуют с митохондриями и ингибируют комплексы *I-IV* ЭТЦ [Veauvy *et al.*, 2002]. Кроме того, нейротоксичность опосредуется прямым ингибирующим действием аммиака на астроцитарные транспортеры *EAAT-1 (GLAST)* и *EAAT-2 (GLT-1)*, которые ответственны за удаление глутамата из нейронального синапса. Повышение концентрации аммиака постепенно приводит к нарушению психического статуса (когнитивное, пространственное обучение и дисфункции памяти). Показано, что воздействие высоких концентраций аммиака на срезы гиппокампа крысы повреждает *NMDA*-рецепторы, что впоследствии ухудшает память или условное обучение у животных [Aguilar *et al.*, 2000]. Другие возможные механизмы дефицита обучения, вызванного высокими уровнями аммиака, скорее всего, связаны с угнетением пути нейронального глутамата-оксида азота (*NO*) -циклического *GMP*. Интересно, что уменьшение образования *NO* коррелировало с умственной дисфункцией у пациентов с деменцией и с Заболеванием Альцгеймера, но не у пациентов с сосудистой деменцией [Kosenko *et al.*, 2014]. Кроме того, было высказано предположение, что хроническое воздействие аммиака влияет на когнитивную функцию через



метаболизм нейростероидов. Аммиак ухудшает синтез нейростероидов, которые, как считается, участвуют в ухудшении памяти.

### **1.2.1 Энергетический обмен**

Хотя и было высказано предположение, что митохондриальная регуляция обычно обусловлена генетически, на активность митохондрий могут влиять такие факторы, как аммиак. Несколько исследований показывают, что воздействие аммиака подвергает риску различные части клеточного биоэнергетического снабжения. Например, активность нескольких ЭТЦ-ферментов, митохондриальной цитохром-с-оксидазы, глутатионпероксидазы и супероксидазы-дисмутазы значительно снижена в мозге, обработанном аммиаком [Kosenko *et al.*, 2004, 2007; Qureshi *et al.*, 1998, Esteves *et al.*, 2009]. Кроме того, активность супероксидазы, *ROS* и поли (ADP-рибоза) полимеразы увеличивалась в митохондриях головного мозга при стрессовом состоянии, вызванном гипераммонимией [Kosenko *et al.*, 2003, 2004; Moreira *et al.*, 2008].

Аммиак является продуктом, а также важным субстратом для по меньшей мере 16-ти различных ферментативных реакций в головном мозге [Cooper and Plum 1987]. Повышенные концентрации аммиака в мозге приводят к изменениям метаболизма, влияющим на регуляторную активность важных ферментов, таких как глутаминаза, глутаминсинтетаза и глутаматдегидрогеназа, эти прямые эффекты повышенных концентраций аммиака на мозг приведут к каскаду вторичных эффектов и энцефалопатии.

Глюкоза является основным источником энергии в мозге, а дисфункция метаболизма глюкозы имеет критические патофизиологические последствия. Несколько исследований показывают значительное снижение гликолитического процесса в мозге с деменцией [Simpson *et al.*, 1994; Hoyer, 2000, 2004]. Высокие концентрации аммиака приводят к повышенному содержанию астроцитарного глутамина с уменьшением концентрации глутамата, что вызывает снижение

активности малат-аспаратного челнока (*MAS*). В результате нарушения *MAS* соотношение пируват / лактат уменьшается в астроцитах. Не связанные с активностью *MAS* высокие концентрации аммиака в астроцитах и нейронах могут ингибировать декарбоксилирование альфа-кетоглутарата в цикле *TCA*, что приводит к ингибированию *PDH* [Hertz and Kala, 2007].

Из-за небольшого размера и незаряженного состояния, аммиак может диффундировать вниз по своему парциальному градиенту давления по липидным бислоям в кислые везикулы, такие как лизосомы, и нарушать соответствующую функцию везикул Гольджи и лизосомальных протеаз. Из-за его относительной щелочности, митохондриальный *pH* по сравнению с цитоплазматическим *pH* приводит к наружно направленному *IPNH3* от матрицы к межмитохондриальному пространству. Таким образом,  $NH^3$  выходит из митохондриальной матрицы вдоль этого градиента и связывается с  $H^+$  в межмембранном пространстве, тем самым устраняя градиент  $H^+$ , необходимый для синтеза АТФ. Таким образом, пониженный pH приводит к окислительному фосфорилированию, когда аммиак действует как  $H^+$ -градиент-расцепляющий. Существующие данные свидетельствуют о том, что энергетический метаболизм нарушен при Заболевании Альцгеймера, и аммиак участвует в нарушении энергетического обмена (т.е. дисфункции митохондрий) при Заболевании Альцгеймера. Тем не менее, требуется больше исследований для лучшего понимания того, как на митохондрии влияют высокие концентрации аммиака, как клетки при Заболевании Альцгеймера по сравнению с нормальными клетками мозга млекопитающих справляются с энергетическим дефицитом и как эти органеллы защищают себя от массивного притока токсического аммиака в мозг.

### 1.2.2 Мембранный потенциал

Аммиак в растворе состоит из газового ( $NH_3$ ) и ионного ( $NH_4^+$ ) компонента, оба способны пересекать плазматические мембраны путем диффузии, либо через каналы и транспортные механизмы [Adlimoghaddam A, *et al.*, 2016]. Кроме того,  $NH_4^+$  обладает такими же свойствами, как  $K^+$ , и поэтому конкурирует с  $K^+$  в  $K^+$ -каналах, что приводит к прямому влиянию на мембранный потенциал. Поскольку ионы  $K^+$  и  $NH_4^+$  сопоставимы во многих аспектах [Кнеппер *et al.*, 1989; Weiner and Hamm, 2007], повышенные концентрации  $NH_4^+$  могут влиять на гомеостаз  $K^+$  и поэтому конкурировать с  $K^+$  на  $Na^+/K^+$  и  $H^+/K^+$  АТФазных обменниках, а также с  $Na^+/K^+/Cl^-$  и  $K^+/Cl^-$  котранспортерами. Это, в свою очередь, может повлиять на потенциал Нернста для калия и потенциал покоя мембраны.

Высокие концентрации аммиака могут повысить мембранный потенциал, деполяризуя как нейроны, так и астроциты. Было продемонстрировано, что 2 мМ  $NH_4Cl$  может деполяризовать нейроны гиппокампа примерно на 10 мВ. У астроцитов, у которых более низкий потенциал мембран покоя, чем у нейронов, наблюдается зависящее от концентрации увеличение мембранного потенциала после применения 5, 10 и 20 мМ  $NH_4Cl$  [Allert *et al.*, 1998]. Аммиак (2 мМ), добавленный в суперфузат, вызывал очень небольшую деполяризацию (1,6 мВ) глиальных клеток в срезе сетчатки трутня домашней пчелы [Coles *et al.*, 1996]. Открытие канала контролируется мощным зависящим от напряжения блоком внешними ионами магния. Считается, что аммиак, повышая мембранный потенциал, удаляет магниевый блок, делая  $NMDA$ -рецепторы восприимчивыми к активации. В заключение, патофизиологические концентрации аммиака непосредственно повышают мембранный потенциал как у астроцитов, так и у нейронов, однако этого недостаточно для активации каналов с напряжением или генерирования потенциала действия в нейронах.

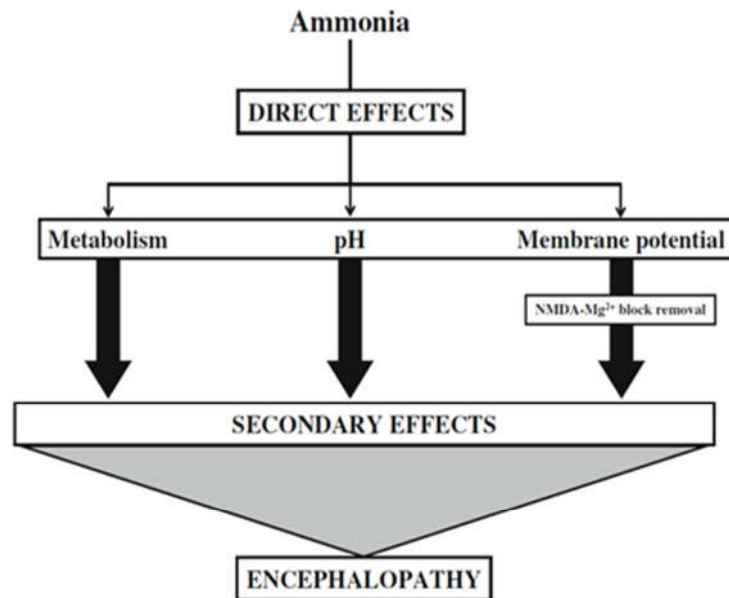
### 1.2.3 Энцефалопатии

Мозг гораздо более восприимчив к пагубным эффектам аммония на ранних стадиях онтогенеза, чем во взрослом состоянии. Концентрация аммиака в крови выше у новорожденных, чем у взрослых [Donn SS, Bangale RC, 1984]. В мозге нормальное содержание аммиака также уменьшается во время созревания [Oja SS et al, 1966]. В зависимости от степени гипераммонемии и ее продолжительности более или менее серьезный необратимый ущерб причиняется головному мозгу, что приводит к умственной отсталости. Гипераммонемия может нанести необратимый ущерб развивающейся центральной нервной системе, что приведет к атрофии коры головного мозга, увеличению желудочков и демиелинизации, что может привести к когнитивным нарушениям, судорогам, церебральному параличу и другим патологиям головного мозга [Cagnon L, Braissant O, 2007]. Показано, что повышенное воздействие аммиака в пренатальном периоде и периоде лактации вызывает длительное ухудшение функций рецептора N-метил-d-аспартата (*NMDA*) [Grisolia S. et al., 1995]. Нарушение энергетического обмена аммиаком и нарушение роста аксонов в процессе развития также могут быть факторами, способствующими развитию умственной отсталости [Bachmann C, 2002].

Повышенный уровень аммиака вызывает изменения в морфологии гематоэнцефалического барьера (*BBB*), таким образом влияя на прохождение различных молекул через гематоэнцефалический барьер. Он модулирует трансцеллюлярный проход молекул с низким и средним размером, воздействуя на их носители, расположенные на этом барьере [Laursen and Diemer, 1979 Skowrońska M, Albrecht J, 2012], вызывает модификацию морфологии астроцитов и нейронов [Gregorios et al., 1985 ], и *HE* [Butterworth, 2002].

Было также продемонстрировано, что высокие концентрации аммиака могут деполяризовать нейроны гиппокампа. Маркайда и коллеги обнаружили доказательства того, что токсичность аммиака опосредована чрезмерной

активацией глутаматных рецепторов *N*-метил-*D*-аспартата (*NMDA*) в мозге. Как следствие, церебральный АТФ истощается, а внутриклеточный  $Ca_2^+$  увеличивается с последующим увеличением внеклеточного  $K^+$ , что приводит к



гибели клеток [Marcaida, et al., 1992]. Считается, что токсические уровни аммиака и изменения *pH*, нарушение баланса электролитов, деполяризация мембранного потенциала приводят к неврологической дисфункции, в первую очередь вызывая клеточную опухоль, сопровождающуюся отеком мозга и метаболической дисфункцией (Рис 4) [Bosoi and Rose 2009].

Рис 4 Прямые эффекты аммиака, следовательно, приводят к побочным эффектам [Bosoi & Rose, 2008].

Аммиак особенно токсичен для астроцитов, поскольку они являются единственными клетками, которые обладают ферментом *GS*, ответственным за детоксикацию аммиака в мозге за счет конденсации с глутаматом [Martinez-Hernandez et al. 1977; Hertz and Zielke 2004].

Хорошо известно, что при гипераммонемических условиях подавление синтеза глутамина в астроците может приводить к: частичной выживаемости животных, снижению повышенного уровня внеклеточного калия и уменьшению

отека мозга. Блокада *NMDA*-рецепторов может также предотвращать или задерживать смерть животных, получавших летальные дозы аммиака. Помимо хорошо определенных изменений в метаболических и сигнальных системах астроцитов, заметные изменения в синхронной работе различных нейромедиаторных систем также наблюдаются при гипераммонемии.

Одной из решающих ролей астроцитов является защита нейронов от эксцитотоксичности за счет поглощения избытка аммиака ( $NH_3$ ) и глутамата и превращения его в глутамин через аденозинтрифосфатзависимую глутаминсинтазу (*GS*). В печени и нейронах глутамин гидролизуется через фосфатно-зависимую глутаминазу глутамат и аммиак ( $NH_3$ ). У индивидуумов с гипераммонемической энцефалопатией показано отсутствие баланса между возбуждающей и тормозной нейротрансмиссией. Основное ингибирование связано с уменьшением экспрессии рецепторов глутамата, что приводит к уменьшению глутаматергического тонуса. Более того, торможение переносчиков глутамата (*Glt-1*) у пациентов с гипераммонемической энцефалопатией приводит к сокращению повторного поглощения глутамата астроцитами после чрезмерного экстраинаптического накопления глутамата [Albrecht and Jones, 1999].

В итоге, наиболее негативные из описанных эффекты аммиака связаны с мозгом, поскольку мозг очень чувствителен даже к незначительному увеличению уровня аммиака в крови. В мозге, хотя повышенные уровни аммиака являются особо вредными для астроцитов, он также оказывает негативное воздействие на все клетки центральной нервной системы. Токсическое действие аммиака не ограничено мозгом, и есть данные, что аммиак является токсичным для других органов / тканей и клеток в организме.

### 1.3 Кальций-активируемые калиевые каналы большой проводимости (BK)

Ионный канал — это крупный белок, образующий центральную водную пору, которая сообщает наружную и внутреннюю среду клетки. Канал имеет наружное устье, обращенное в сторону межклеточной среды, и внутреннее, которое обращено в сторону цитоплазмы. Кроме этого канал имеет ворота - специальный участок, который может конформационно меняться и перекрывать водную пору. При помощи этого воротного механизма канал может открываться и закрываться [Kandel, Schwartz, Jessel, 2002].

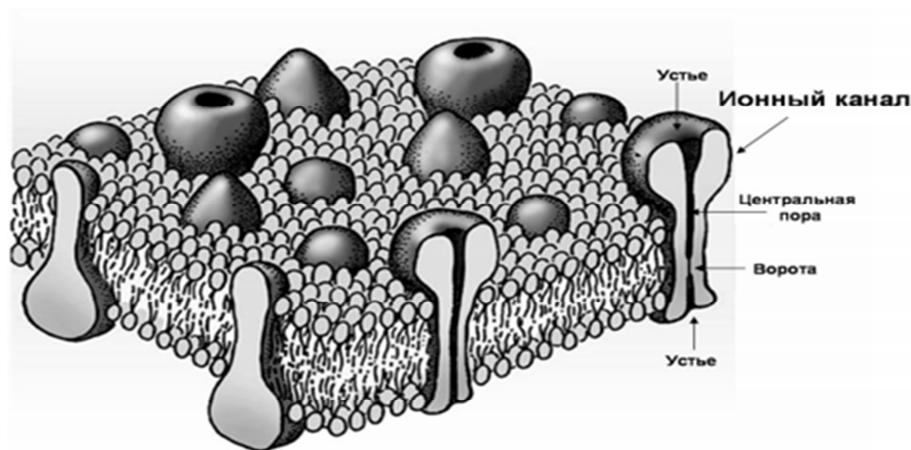


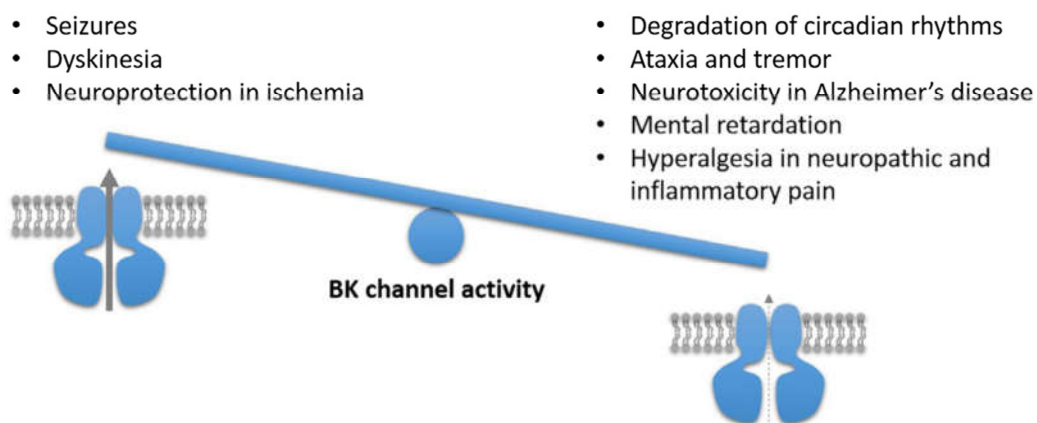
Рисунок 5- Ионные каналы клеточной мембраны [Moataz M.G., 2010].

Активируемые напряжением и  $Ca_2^+$  каналы  $K^+$  являются членами группы калиевых каналов, зависящих от кальция и напряжения, которые из-за их высокой проводимости калия называются *Maxi-K*, *BK* или *Slo1*. *BK*-каналы широко экспрессируются в различных клеточных мембранах у всех видов от бактерий до млекопитающих, и в самых разных тканях от сенсорной и сосудистой до мозговой. Как видно из названия, эти каналы активируются деполяризацией мембраны и повышением концентрации внутриклеточного  $Ca^{+2}$ . Открытие каналов *BK* приводит к массивному оттоку ионов  $K^+$ , который гиперполяризует потенциал клеточной мембраны и закрывает зависимые от

напряжения кальциевые каналы для уменьшения числа ионов  $Ca^{+2}$ , поступающих в клетку. Через отрицательную обратную связь между внутриклеточным  $Ca^{+2}$  и мембранным напряжением, мембранный потенциал смещается в сторону отрицательных значений, ослабляя возбуждающие сигналы [Wang, 2008].

В центральной нервной системе (ЦНС) каналы *ВК*, расположенные в плазматической мембране нейронов, влияют на форму, частоту и распространение потенциалов действия (ПД), а также на высвобождение нейромедиатора из пресинаптических терминалей и эндокринную секрецию.

Кроме того, *ВК*-каналы, выраженные в популяциях ненейронных клеток, таких как астроциты или клетки гладкой мускулатуры сосудов, могут



регулировать мозговой кровоток, тем самым влияя на активность мозга.

Функциональное значение *ВК*-каналов в ингибировании высвобождения нейромедиаторов играет важную роль в предотвращении возбуждения. В моносинаптически связанных неонатальных крысиных гиппокампальных *CA3* пирамидных нейронах, токи *ВК* уменьшают вероятность высвобождения медиатора и увеличивают частоту синаптической недостаточности [Raffaelli *et al.*, 2004].

Рис 6. физиологические и поведенческие результаты, вызванные чрезмерным (слева) и недостаточной (правой) активности канала *ВК* в ЦНС.



Благодаря их многогранной роли в регулировании активности нейронов, каналы *BK* помогают поддерживать физиологический диапазон сетевых сигналов в головном мозге и спинном мозге. Соответственно, как недостаточная, так и чрезмерная активность канала *BK* может оказывать пагубное воздействие на ЦНС (Рисунок 6).

### 1.3.1 Структура каналов

*BK*-каналы состоят из четырех порообразующих *K<sub>Ca1.1</sub>* альфа ( $\alpha$ )-субъединиц, кодируемых геном *Slo1*. ( $\alpha$ )-субъединица представляет собой большой белок, содержащий около 1200 аминокислот. Каждая  $\alpha$ -субъединица канала *BK* состоит из шести трансмембранных сегментов (*S1-S6*) с дополнительным трансмембранным сегментом на N-конце, обозначенном как *S0*. Сегменты *S1-S6* сохраняются, как и в других  $K^+$ -каналах, зависящих от напряжения. Каналы *BK* состоят из измерительных мембран с импульсным напряжением (*S1-S4*), где функционально распределены заряды. Сегменты формирования поры (*S5-S6*) каждой  $\alpha$ -субъединицы имеют аминокислотную последовательность в селективном фильтре (глицин-тирозин-глицин-*GYG*), который также встречается во многих других типах каналов  $K^+$ .

Концевой хвост карбоксила (*C*) содержит примерно две трети белка  $\alpha$ -субъединицы. В этой области происходят взаимодействия с различными каналобразующими белками, включая протеинкиназы и фосфатазы. Он также включает отрицательно заряженную область связывания  $Ca^{2+}$ , так называемую чашу  $Ca^{2+}$  (которая опосредует активацию кальция *BK*-каналов, [Wei, Gutman *et al.*, 2005]) и двойной отрицательный заряженный участок, который чувствителен к  $Mg^{2+}$ , а также для так называемого *RCK*-домена (регуляторный домен проводимости  $K^+$ ).

Помимо комплексной структуры стробирования канала по напряжению,  $Ca^{2+}$  и  $\beta$ -субъединиц, другие модулирующие факторы влияют на активность

канала *ВК*, например, *pH*, окислительно-восстановительное состояние или фосфорилирование канального белка.

Двойная модуляция *ВК*-каналов мембранным напряжением и внутриклеточным  $Ca^{2+}$  заставляет этот канал выступать в роли молекулярного интегратора электрических событий на плазматической мембране и внутриклеточной сигнализации через  $Ca^{2+}$ . Так как  $Ca^{2+}$  участвует во множестве процессов клеточной передачи сигналов, это также обеспечивает связь с метаболизмом клеток и активацией гена. *ВК*-каналы широко распространены в головном мозге и часто концентрируются в телах нейронов и нервных окончаниях. Они облегчают мембранную реполяризацию во время потенциала действия и таким образом участвуют в регуляции высвобождения нейротрансмиттеров. Активность *ВК*-каналов таким образом играет существенную роль в контроле активности разряда ПД, гормональной секреции или вазоконстрикции. Внешний поток  $K^+$ , проводимый каналом *ВК*, перемещает мембранный потенциал в гиперполяризационном направлении, подавляя активацию других зависимых от напряжения каналов, проницаемых для  $Ca^{2+}$  или натрия. Это обеспечивает отрицательную обратную связь для каналов  $Ca^{2+}$  по напряжению и, следовательно, предотвращает накопление внутриклеточного  $Ca^{2+}$ .

На пресинаптической мембране *ВК*-каналы контролируют высвобождение нейротрансмиттеров, уменьшая деполяризацию, вызванную входящими потенциалами действия. На постсинаптической мембране каналы *ВК* способствуют формированию и структурированию ПД и модулируют  $\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовую кислоту (*AMPA*) и *N*-метил-*D*-аспарагиновую кислоту (*NMDA*)-опосредованных возбуждительных постсинаптических потенциалов (*ВПВП*). Канал *ВК* также контролирует дендритную возбудимость и ретроградное распространение соматических ПД на дендритах.

### 1.3.2 Аммиак и K-каналы

$K^+$ -каналы, из-за их повсеместного клеточного присутствия, вероятно, являются одним из ключевых кандидатов на роль посредника трансмембранного  $NH_4^+$  транспорта. В соответствии с вышеупомянутой конкуренцией между  $K^+$  и  $NH_4^+$  было высказано предположение, что  $NH_4^+$  может проникать через *BBB* с возможным участием запрещающего барьерного канала  $K^+$  [Ott & Larsen, 2004]. Кроме того, было продемонстрировано, что в культивируемых астроцитах гены калиевых каналов внутреннего выпрямления (*K<sub>ir</sub>4.1* и *K<sub>ir</sub>5.1*) значительно снижаются в условиях гипераммонемии. Эти результаты показывают, что изменение структуры каналов  $K^+$  может либо выявлять защитный ответ астроцитов на повышенные уровни  $NH_4^+$  в крови, либо реагировать на увеличение внеклеточного  $K^+$  в мозге и концентрации  $K^+$  в плазме. Таким образом, изменение уровня мозгового  $K^+$  может иметь ключевое влияние на активность нейронов и активность нейронной сети во время и после гипераммонемии.

### 1.4 Кальциевые осцилляции

Кальциевая сигнализация является следствием сложного взаимодействия между активацией и инактивацией внутриклеточных и внеклеточных проницаемых для кальция каналов. Внутриклеточное высвобождение  $Ca^{2+}$  чаще всего происходит вследствие воздействия вторичного мессенджера, образованного фосфолипазой-C, - инозитол 1,4,5-трифосфата (*InsP3*) [Streb *et al.*, 1983], тогда как выведение  $Ca^{2+}$  осуществляется в результате активации управляемых концентрацией кальция каналов в плазматической мембране [Putney 1986].

С 1950-х годов известно, что периодическое открытие каналов  $Ca^{2+}$  плазматической мембраны в результате всплесков потенциала действия в

нейронах может приводить к колебаниям цитозольного  $Ca^{2+}$ . В некоторых клетках спонтанная электрическая активность достаточна для того, чтобы стимулировать внутриклеточную концентрацию кальция подняться выше порога, опосредуя секрецию и связывание стимул-транскрипции. В других случаях функция этих потенциалов действия заключается в поддержании клеток в чувствительном состоянии с цитозольным кальцием вблизи, но ниже порогового уровня. Обычно колебания  $Ca^{2+}$  характеризуются довольно постоянной амплитудой и переменной частотой, которая колеблется от 5 до 60 секунд в зависимости от типа клеток, а также от природы и силы стимула.

Изменение внутриклеточной концентрации кальция является повсеместным сигнальным механизмом, который часто сочетается с изменениями мембранного потенциала. Эти сигналы интегрируются путем активации гетерогенного семейства калиевых каналов,  $Ca^{2+}$ -активируемых калиевых каналов ( $K_{Ca}$ ), вероятность открытия которых увеличивается за счет повышения цитозольного уровня кальция, что вызывает гиперполяризацию мембраны. В невозбудимых клетках эти пики колебаний цитоплазматического уровня  $Ca^{2+}$  возникают из регенеративного выделения запасенного  $Ca^{2+}$  – процесс, обычно называемый «кальциевыми осцилляциями».

В нейронах ЦНС фармакологическое или генетическое ингибирование  $BK$ -каналов может увеличивать или уменьшать вызванную или спонтанную активность [Bielefeldt & Jackson, 1993; Jin, Sugaya, Tsuda, Ohguchi, & Sugaya, 2000; Li et al., 2007; Meredith et al., 2006]. Показано, что аммиак вызывает повышение внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , главным образом, из-за цитозольного подщелачивания *in vitro* и через менее хорошо изученные механизмы приводит к увеличению внутриклеточной передачи  $Ca^{2+}$  *in vivo*. Недавно было показано, что гипераммонемия нарушает астроцитарную кальциевую сигнализацию *in vivo*, которая тесно связана со многими астроцитарными функциями, такими, как,

например, гомеостаз  $K^+$  [Rose et al. 2005; Wang et al. 2012; Rangroo Thrane et al. 2013].