

**А.И. Сергеев**

**Регуляция гиперактивности нейронов  
блокатором калиевого тока замедленного выпрямления  
AM-92016 в культуре клеток гиппокампа крысы**

*Пушчинский научный центр биологических исследований Российской академии наук  
(Институт Биофизики Клетки РАН)*

**Резюме.** Гипервозбуждение нейронов нередко наблюдается при патологиях, связанных с нарушением их кальциевого гомеостаза (гипераммониемия, эпилепсия, инсульт, и другое). Это меняет множество биохимических процессов в клетке, и нередко приводит к ее апоптозу. Для предупреждения такой гибели часто используется стратегия нормализации кальциевого гомеостаза путем воздействия на ионные токи (в т.ч. блокаторами).

**Цель.** Выявить: может ли подавление калиевого тока замедленного выпрямления устранить кальциевый дисгомеостаз, вызванный гиперактивацией нейронов.

**Материал и методы.** Прижизненная флуоресцентная конфокальная микроскопия нейроглиальных культур.

**Результаты.** Было показано, что блокатор калиевого тока замедленного выпрямления, зависящего от внутриклеточного pH, AM-92016 (3 мкМ) полностью нивелировал колебания концентрации внутриклеточного кальция, вызванные 8 мМ NH<sub>4</sub>Cl (модель гиперактивности нейронов). При этом повышение базального уровня кальция не устраняется посредством AM-92016. Кроме того, AM-92016 (15 мкМ) внесенные до аппликации NH<sub>4</sub>Cl (8 мМ) полностью отменяли гиперактивное состояние. Стоит отметить, что AM-92016 даже при существенно больших концентрациях (10 мкМ) не влияет на частоту спонтанных осцилляций внутриклеточного кальция и слабо воздействует на их амплитуду, что в сопоставлении с результатом действия AM-92016 на фоне NH<sub>4</sub>Cl 8 мМ указывает на влияние гиперактивности в отношении исследуемых токов.

**Заключение.** Эти результаты обосновывают дальнейшее исследование каналов, связанных с калиевым током замедленного выпрямления в качестве предполагаемой терапевтической мишени при гипераммониемии и иной гиперактивности нейронов.

**Перспективы переноса лабораторных данных в клинику.** Поскольку в представленных экспериментах на фоне спонтанной активности наблюдается возможность поэтапного и постепенного снижения осцилляторной активности, то и для патологических состояний клеток в культуре предполагается возможность подобрать концентрации AM-92016 для тонкой регуляции колебаний. Если это реализуемо, то необходимо исследование на живых крысах (мышьях и др.) в моделях гипераммониемии, инсульта, или судорожной активности. Вероятное применение в ветеринарии. По результатам этого производится планирование исследований с информированным согласием.

**Ключевые слова:** K<sup>+</sup>-ток замедленного выпрямления, «гиперактивность нейронов, гипераммониемия, зависящие от внутриклеточного pH ионные каналы, внутриклеточный Ca<sub>2</sub><sup>+</sup>, глутаматная токсичность.

**Актуальность.** Кальциевый гомеостаз в нервных клетках может быть нарушен при их гипервозбуждении. Такие явления в нейронах и астроцитах нередко наблюдаются при патологиях, связанных с глутаматной токсичностью (гипераммониемия, эпилепсия, инсульт, нейродегенеративные заболевания, травмы мозга и др.) [1-9]. Динамика внутриклеточных ионов кальция ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) является мощным регуляторным фактором для сотен биохимических реакций [10]. При ее нарушении, ведущей к избыточному уровню [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, или Ca<sup>2+</sup>-перегрузке наблюдается

апоптотическая смерть нейронов [11]. Длительная деполяризация нейронов, поддерживающая их гиперактивацию является одним из ключевых процессов, ведущих к долговременно повышенному уровню  $[Ca^{2+}]_i$  [12]. Такое состояние многократно описано для клеток в качестве сопутствующих причин их смерти при глутаматной токсичности, опосредованной активацией NMDA-рецептора. При этом регистрируется повреждение цитоскелета, вызванное активацией  $[Ca^{2+}]_i$ -зависимых протеаз (кальпаинами и др.), рост уровня АФК, митохондриальная дисфункция, апоптоз. [13-16]. В этой связи, одной из перспективных стратегий предупреждения клеточной смерти является устранение гиперактивности.

Так же деполяризация создает дополнительные риски из-за увеличения потребности мозга в энергии, которая повышает синтеза аденозинтрифосфата (АТФ), что так же является кальций-зависимым процессом. [17] Принципиально, что потребление АТФ в мозге во время волн деполяризации становится существенно превышающим его производство. Например, это зарегистрировано при глюкозно-кислородной депривации, где в промежутках между волнами деполяризации потребление АТФ не велико, но во время их генерации резко возрастает [18]. Коллапс энергетического профицита АТФ особенно актуален для гипераммониемии, где токсикологическое воздействие  $NH_3/NH_4^+$  на мозг может длиться несколько суток.

Кроме того, деполяризации нейронов при названных патологиях сопутствует явление внутриклеточного ацидоза [19-21]. Оно может являться одной из причин развития деполяризационных сдвигов нейронов, поскольку существует ряд ионных каналов (или регистрируемых токов) зависимых от понижения внутриклеточного рН ( $[pH]_i$ ). Поэтому использование блокаторов или агонистов каналов зачастую устраняет деполяризацию клеток, и как следствие, снижает  $[Ca^{2+}]_i$ -нагрузку. Текущее исследование сфокусировано на одном из  $[pH]_i$ -зависимых ионных токов:  $K^+$ -токе замедленного выпрямления (delayed rectifier potassium current). Так методом patch-clamp установлено, что уже при значениях  $[pH]_i$  6.8 активность этого тока падает вполовину [22]. Учитывая эти показатели, мною выбрана исследовательская модель гипераммониемии: поскольку в ней создается устойчивая длительная деполяризация, схожая с выше описанными параметрам ацидификация цитозоля, и кальциевый дисгомеостаз [23, 24].

**Материал и методы исследования.** Подготовка культур клеток. Из мозга новорожденных мышей линии NMRI были получены клеточные культуры гиппокампальных нейронов и астроцитов были получены (1–3 сутки жизни), как это было описано ранее [25].

В чашки Петри мозг быстро извлекали с применением холодного раствора Hank's Balanced salt solution (HBSS), содержащим  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$ , и под стереомикроскопом тщательно отделяли менингеальные оболочки и выделяли гиппокамп, который измельчали ножницами и центрифугировали в течение 2 мин при 1000 об/мин. К осадку добавляли 500 мкл Trypsin-EDTA 0.05% (Gibco) и инкубировали при 37°C в течение 10 минут на шейкере. Пипеткой Пастера осадок

ресуспендировали в среде Neurobasal-A (Gibco) (НС), содержащей Penicillin-Streptomycin-Glutamine (Gibco) (1 мл на 99 мл среды), 5% Непес 1М (Gibco), 2% В-27 (Gibco). Суспензию клеток дважды центрифугировали в течение 3 минут при 1000 об/мин, осадок ресуспендировали в НС. По 50 мкл суспензии клеток наносили на дно лунки культурального планшета, которое предварительно обрабатывали полиэтиленимином (Sigma) (5 мкг/50 мл воды) следующим образом: 200 мкл полимера наносили на дно лунок, выдерживали 10 мин под УФ, потом еще 20 минут в темноте, после чего лунки дважды промывались дистиллированной водой и высушивались. Культуральные планшеты с клетками помещались в CO<sub>2</sub>-инкубатор (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) на 2 часа. После прикрепления клеток добавляли 2,5 мл НС и помещали планшеты в CO<sub>2</sub>-инкубатор. Каждые 6-7 дней заменяли треть среды на свежую. Эксперимент проводили через 14 дней после начала культивирования в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub> при 37°C.

Флуоресцентные измерения. Динамика внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> измерялась с помощью конфокального флуоресцентного микроскопа Leica TCS SP5 в комплектации с аргоновым лазером и акустооптическим фильтром (на базе ИБК РАН). Кальциевые сигналы были записаны при помощи одноволнового флуоресцентного зонда Fluo-4 (длина волны возбуждения 488 нм, регистрация эмиссии осуществлялась в диапазоне 530-590 нм интервал между кадрами съемки составил одну сек. Для увеличения скорости съемки поле регистрации также пришлось сократить, вследствие чего количество нейронов в эксперименте уменьшилось. Для Fluo-4 на вертикальной оси рисунка единицами измерения являются arbitrary units (A.U.) – относительные единицы, отражающие интенсивность эмиссии флуорофора (испускание количественно измеримых фотонов), регистрируемой детекторами Leica TCS SP5 . Для всех экспериментов количество нейронов, используемых в обработке (N) от 80 до 90 (ограничен размер поля при быстрой съемке на конфокальном микроскопе, влияет плотность культуры); количество астроцитов в обработке (N1) = 100, количество повторений экспериментов (n) = 3. Нейроны и астроциты в культуре при прокрашивании зондом были помещены в Hanks balanced salt solution (HBSS), состоящего из (мМ): 156 NaCl, 3 KCl, 2 MgSO<sub>4</sub>, 1,25 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 10 глюкозы и 10 NEPES, pH 7.4, при финальной концентрации зонда 5 мкМ (Fluo-4 AM, SNARF-1 AM), при 37°C в течение 40 мин, и затем отмыты в течение 15 минут. L-arginine (0,2 мМ) был включен в HBSS среду. Эксперименты выполнены с использованием микроскопических стекол с разными клеточными культурами. Эксперименты по регистрации [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> были проведены при 28–30°C.

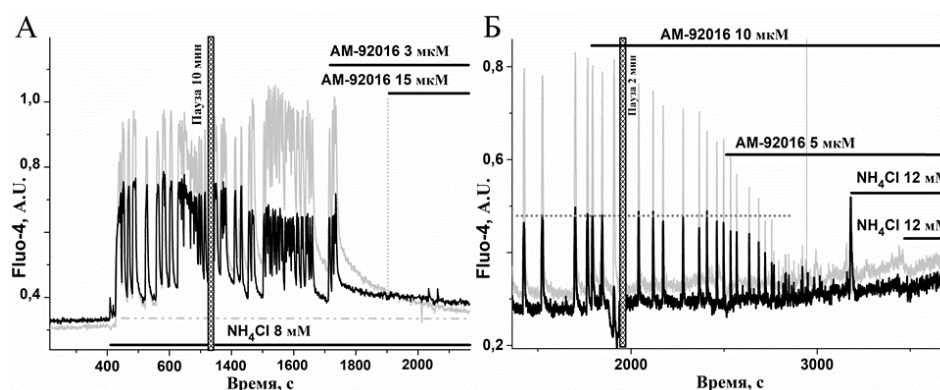
Пакеты прикладных статистических программ были использованы для анализа данных, создания графиков и статистической обработки данных.

Для идентификации нейронов и астроцитов было добавлено в среду культивирования KCl 35 мМ: по характерным формам ответа этих клеток можно их различить. Нейроны имеют существенно большую полуширину ответного спайка, и в подавляющем большинстве случаев не возвращают внутриклеточную концентрацию

кальция к первоначальному уровню, образуя плато. В астроцитах после одиночного ответного спайка  $[Ca^{2+}]_i$  возвращается к базовому уровню или даже падает ниже исходного значения. Исследование проводилось в соответствии с принципами Хельсинской Декларации.

**Реагенты.** Hank's Balanced salt solution (HBSS), neurobasal medium, B-27 Supplement, fetal bovine serum, fetal calf serum (Gibco); penicillin-streptomycin solution (Dalhimfarm, Russia); 0.1% poly-l-lysine; L-glutamine, L-glutamate;  $NH_4Cl$  (Dalhimfarm, Russia);  $KCl$  (Chimmed, Russia); embryo calf serum (MP Biomedicals, USA); 4% gentamicin (Dalhimfarm, Russia); versene (Paneco, Russia); Fluo-4 AM (Invitrogen, USA); AM-92016 (Sigma-Aldrich).

**Полученные результаты и их обсуждение.** Основной целью исследования является выявление роли калиевого тока замедленного выпрямления (delayed rectifier potassium current) при избыточной кальциевой нагрузке, вызванной гиперактивацией нейронов. Для этого использовался ингибитор (блокатор) AM-92016 для такого тока [26]. Кроме того, полученные данные были сопоставлены с воздействием этого блокатора на спонтанную активность нейронов в культуре. Результаты представлены на рисунке 1.



**Рис. 1. Изменения внутриклеточного  $[Ca^{2+}]_i$  в нейронах гиппокампа под действием блокатора калиевого тока замедленного выпрямления AM-92016 на фоне воздействия  $NH_4Cl$  8 мМ (А) и на спонтанную активность (Б).**

(А)  $NH_4Cl$  8 мМ вызывает колебания  $[Ca^{2+}]_i$  в нейронах и наращивает базальный уровень  $[Ca^{2+}]_i$ . Добавка AM-92016 3 мкМ во всех нейронах устраняет колебания, и меняет базальный уровень  $[Ca^{2+}]_i$ . 15 мкМ AM-92016 не вызывает изменений. (Б) Даже высокая концентрация AM-92016 15 мкМ не вызывает резких изменений в сравнении с Рис. 1А, лишь через 4 минуты происходит полное подавление импульсов. Дальнейшие добавки  $NH_4Cl$  12 мМ (2 раза) не вызывают признаков гиперактивации. Для (А) и (Б): (N) = 90; ( $N_1$ ) = 100. (n) = 3

Из данных рисунка следует, что  $NH_4Cl$  8 мМ вызывает колебания  $[Ca^{2+}]_i$  в нейронах и наращивает базальный уровень  $[Ca^{2+}]_i$ . Добавка AM-92016 3 мкМ устраняет колебания, и меняет базальный уровень  $[Ca^{2+}]_i$ . При этом ни в одной из клеток не происходит полного снижения базального уровня  $[Ca^{2+}]_i$  к значениям, фиксируемому до всех добавок (штрих-пунктирная линия для ориентира). Это говорит о неполном устранении гиперактивационной  $Ca^{2+}$ -нагрузки, отражая повышенный на

3-5 мВ уровень базального мембранного потенциала (МП) [23]. При этом сложно оценить, влечет ли за собой такой устойчивый и долговременный сдвиг патологические процессы.

Дальнейшее воздействие 15 мкМ АМ-92016 не оказывает никакого влияния на динамику кальция (в т.ч. не снижает базальный  $[Ca^{2+}]_i$ ), что прямо указывает на полное устранение влияния на дисрегуляцию  $[Ca^{2+}]_i$  мною исследуемых  $K^+$ -каналов всего лишь 3 мкМ блокатора. При этом, на Рис. 1Б видно, что в отсутствие  $NH_4Cl$  (на фоне спонтанной активности) существенно большие концентрации АМ-92016 (10 мкМ) никак не влияют (14 из 90 клеток). Для 76 из 90 нейронов лишь только после 350 секунд происходят какие-либо изменения: в частности, некритичное (особенно в сравнении с первыми импульсами) снижение амплитуды колебаний до 25%. При этом АМ-92016 не повлиял на базовый  $[Ca^{2+}]_i$ , частоту осцилляций нейронов. И лишь после достижения концентрации АМ-92016 в 15 мкМ происходит существенное снижение амплитуды во всех нейронах и увеличение частоты, а через 250 секунд полное подавление импульсной активности. Таким образом, на фоне аммонийной токсичности даже 3 мкМ АМ-92016 всего за несколько секунд устраняют осцилляции, в то время как при спонтанной активности (без  $NH_4Cl$ ) даже 15 мкМ блокатора далеко не сразу приводят к подавлению колебаний. Столь существенная разница в концентрированности реагента указывает на то, что при действии  $NH_4Cl$  активность части каналов калиевого тока замедленного выпрямления была уже подавлена, и это позволяет даже при концентрациях АМ-92016 в пять раз ниже (в сравнении со спонтанной активностью) полностью блокировать этот ток. Отдельного обсуждения заслуживает механизм подавления импульсов посредством АМ-92016. Для одного из типов каналов калиевого тока замедленного выпрямления были получены данные, объясняющие механизм. Предполагается, что блокирование этого типа  $K^+$ -каналов ведет к уменьшению извлечения натриевых каналов из инактивации, что ограничивало бы ток натрия, способный вносить вклад в возрастающую фазу последующих спайков пачки: уменьшалось бы количество  $Na^+$ -каналов, задействованных в импульсах. [24]. И даже если мембрана остается деполяризованной (при гиперактивности)  $Na^+$ -каналы остаются в инактивированном состоянии и не могут заново открыться до тех пор, пока мембранный потенциал не вернется к своему исходному отрицательному значению [28]. Этот механизм предположительно проявляется и в том, что аппликация АМ-92016 до добавки  $NH_4Cl$  12 мМ (дважды) приводит к полной отмене реакции на ионы аммония (Рис.1Б). При этом в контроле (на фоне спонтанных осцилляций)  $NH_4Cl$  12 мМ резко повышали  $[Ca^{2+}]_i$  до стабильного уровня без колебаний («полка») и плавной откачки (не показано).

Ионные калиевые токи регулируют  $[Ca^{2+}]_i$  через МП при гиперактивации нейронов.

Эксперименты в рамках этого исследования показали, что регуляция калиевых токов и как следствие мембранного потенциала эффективно воздействует на гиперактивную динамику  $[Ca^{2+}]_i$ . Ранее мною и соавторами такая динамика в

отношении активации нейронов ионом аммония была количественно измерена ( $VC_i = \Delta Ca$  (a.u.)/min) и определена как увеличенная более чем в 2 раза. Также были детектированы клетки выбывшие из сетевой регуляции (run out cells), где эти показателями существенно выше. При этом удалось установить, что кальциевые изменения коррелируют с пачечной гиперактивностью и повышение базального МП [23]. В сумме эти факты указывают на нарушения в работе сети нейронов, частичную потерю ее саморегуляции и физиологически нормальной нейротрансмиссии. Само по себе (помимо  $Ca^{2+}$ -зависимой смерти нейронов) такое явление представляет потенциальную опасность для гомеостаза всего организма, с точки зрения контроля гуморальных и висцеральных систем. Наиболее ярко нарушения сетевой электрохимической передачи между нейронами проявляются при судорожной активности (в т.ч. при гипераммонийной коме) [29, 30]. Вход кальция в клетку и рост его концентрации до избыточной происходит в основном через NMDA-рецептор и потенциалзависимые каналы L-типа. Этот факт указывает на изменения МП как на первопричину большинства патологических процессов в явлениях, связанных с гиперактивацией нейрональной сети, глутаматной токсичностью и т.п. Поэтому регуляция ионных токов имеет, возможно, первостепенное значение для коррекции вышеуказанных патологий. В проведенных экспериментах удалось доказать, что воздействие на калиевый ток замедленного выпрямления является существенным регулятором  $[Ca^{2+}]_i$ . Поскольку в экспериментах на фоне спонтанной активности наблюдается возможность «поэтапного и постепенного» снижения осцилляторной активности, то можно предположить, что и для патологических состояний клеток в культуре можно подобрать концентрации АМ-92016 для «тонкой» регуляции колебаний. Это является наиболее приоритетной задачей для дальнейших исследований. Ранее описано, что блокирование этого типа  $K^+$ -каналов ведет к уменьшению извлечения натриевых каналов из инактивации, и в итоге, полному блокированию нейротрансмиссии [27]. В этом случае можно предположить, что титровка АМ-92016 позволит выключать лишь часть таких каналов.

Гиперактивация нейронов частично ингибирует  $K^+$ -ток замедленного выпрямления

В экспериментах (Рис.1), в условиях  $NH_3/NH_4^+$  ( $NH_4Cl$  8 мМ), при блокировании этих каналов устранение осцилляций происходило при существенно меньших концентрация и кардинально быстрее, нежели при спонтанной активности (контроль). Это указывает на то, что каналы были уже достаточно ингибированы перед АМ-92016, но не в полной мере, что и позволяло развиваться гиперактивности. Эти факты подкрепляют гипотезу о воздействии падения  $[pH]_i$  на гиперактивность через  $[pH]_i$ -зависимые каналы. В частности установлено, что 5 мМ  $NH_4Cl$  снижали  $[pH]_i$  на 0,2-0,3 единицы в культурах гиппокампа: достигая значений в среднем 7,05 единиц (в некоторых клетках до 6,8; при значениях покоя 7,25) [24]. Добавка  $NH_4Cl$  8 мМ гарантированно достигнет такого же эффекта, сохраняя устойчивые показатели ацидификации на все время добавки  $NH_4Cl$  [23]. Этот диапазон значений рН при

действии  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (7,05 – 6,8 для культур или срезов), соответствует величинам активации\ингибирования (как инициирующего, так и модулирующего) множества рН-зависимых каналов. В частности каналы  $\text{K}^+$ -тока замедленного выпрямления при внутриклеточной ацидификации в значении 6,8 вполнину снижают свою активность, при 6,3 на 85%, при том что для величины 7,3 каналы полностью активны [22]. Так как  $\text{NH}_4\text{Cl}$  неминуемо вызывает закисление цитозоля до величин неизбежно ингибирующих эти каналы, и величины эти были установлены на токах whole-cell patch-clamp в целой клетке (т.е. в условиях цитозоля, но не искусственных сред), то довольно обоснованным выглядит предположение:  $\text{NH}_4\text{Cl}$  именно через падение [рН]; (может и дополнительно другими путями) часть каналов подавляет. И это может выражаться в том, что по сравнению со спонтанной активностью (т.е. без ацидификации) потребуется существенно меньшая концентрация блокатора для полного ингибирования. Это можно сравнить с поэтапным титрованием блокатора с той разницей, что перед последней добавкой (ингибирующей активностью «окончательно»), все предшествующие этапы воздействия осуществило закисление цитозоля.

**Выводы.** Ингибирование калиевого тока замедленного выпрямления посредством АМ-92016 (3 мкМ) полностью устранял колебания концентрации внутриклеточного кальция, в модель гиперактивности нейронов (8 мМ  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ). Устранение таких устойчивых деполяризационных явлений должно иметь нейропротекторный эффект. Также установлено, что гиперактивация влияет на активность калиевого тока замедленного выпрямления.

#### *Литература / References.*

1. Rodrigo R, Cauli O, Boix J, ElMlili N, Agusti A, Felipe V. Role of NMDA receptors in acute liver failure and ammonia toxicity: therapeutical implications. *Neurochem Int.* 2009 Jul-Aug;55(1-3):113-8.
2. Zhang K, Wen M, Nan X, Zhao S, Li H, Ai Y, Zhu H. NMDA receptors in neurodegenerative diseases: mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Front Aging Neurosci.* 2025 Jul 24;17:1604378. doi: 10.3389/fnagi.2025.1604378. PMID: 40778304; PMCID: PMC12328396.
3. Wu WL, Gong XX, Qin ZH, Wang Y. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to the pathogenesis of neurodegenerative diseases-an update. *Acta Pharmacol Sin.* 2025 May 19.
4. Verma M, Lizama BN, Chu CT. Excitotoxicity, calcium and mitochondria: a triad in synaptic neurodegeneration. *Transl Neurodegener.* 2022 Jan 25;11(1):3.
5. Arnold FJ, Putka AF, Raychaudhuri U, Hsu S, Bedlack RS, Bennett CL, La Spada AR. Revisiting Glutamate Excitotoxicity in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Age-Related Neurodegeneration. *Int J Mol Sci.* 2024 May 21;25(11):5587.
6. Hou J, Klippel K, Bose P. Glutamate Excitotoxicity: A Key Secondary Injury Mechanism of Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2025 Oct 31;30(10):38904. doi: 10.31083/FBL38904. PMID: 41198536.
7. Ivanova AV, Kutuzova AD, Kuzmichev IA, Abakumov MA. Alzheimer's Disease: From Molecular Mechanisms to Promising Therapeutic Strategies. *Int J Mol Sci.* 2025 Sep 26;26(19):9444. doi: 10.3390/ijms26199444. PMID: 41096712; PMCID: PMC12524813.
8. Khan S, Bano N, Ahamad S, John U, Dar NJ, Bhat SA. Excitotoxicity, Oxytosis/Ferroptosis, and Neurodegeneration: Emerging Insights into Mitochondrial Mechanisms. *Aging Dis.* 2024 Aug 1;16(5):2504-2543.
9. Lemes JA, Rosário BDA, Rocha SMS, Bandeira SS, Ribeiro AM, Vaz SH, Sebastião AM,

- Armada-Moreira A, Ribeiro DA, de Barros Viana M. The role of glutamate receptors and transporters in epilepsy: evidence from animal studies. *Rev Neurosci.* 2025 Apr 21;36(6):645-660.
10. Bagur R, Hajnóczky G. Intracellular Ca<sup>2+</sup> Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling. *Mol Cell.* 2017 Jun 15;66(6):780-788. doi: 10.1016/j.molcel.2017.05.028.
  11. Sattler R, Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med (Berl).* 2000;78(1):3-13.
  12. Zinchenko, V.P., Turovsky, E.A., Turovskaya, M.V. et al. NAD causes dissociation of neural networks into subpopulations of neurons by inhibiting the network synchronous hyperactivity evoked by ammonium ions. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A*, 2016, 10, 118–125
  13. Dawson, V. L. & Dawson, T. M. Deadly conversations: nuclear-mitochondrial cross-talk. *J. Bioenerg. Biomembr.* 36, 287–294 (2004). Return to ref 7 in article
  14. Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P. & Mahajan, R. T. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr. Neuropharmacol.* 7, 65–74 (2009).
  15. Zhou, Q. & Sheng, M. NMDA receptors in nervous system diseases. *Neuropharmacology* 74, 69–75 (2013).
  16. Yildiz-Unal, A., Korulu, S. & Karabay, A. Neuroprotective strategies against calpain-mediated neurodegeneration. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 11, 297–310 (2015).
  17. de Miguel R, Ortega P, Weber K, Kegler K, González-Ávila C, Vallejo R. Pathophysiology of Ischemic Cell Death in the Central Nervous System. *Toxicol Pathol.* 2025 Nov 5:1926233251389586.
  18. Schoknecht K, Baeza-Lehnert F, Hirrlinger J, Dreier JP, Eilers J. Spreading depolarizations exhaust neuronal ATP in a model of cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2025 May 13;122(19):e2415358122. doi: 10.1073/pnas.2415358122.
  19. Leng T, Shi Y, Xiong ZG, Sun D. Proton-sensitive cation channels and ion exchangers in ischemic brain injury: new therapeutic targets for stroke? *Prog Neurobiol.* 2014 Apr;115:189-209. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.12.008.
  20. McIntosh TK, Faden AI, Bendall MR, Vink R. Traumatic brain injury in the rat: alterations in brain lactate and pH as characterized by <sup>1</sup>H and <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance. *J Neurochem.* 1987 Nov;49(5):1530-40. doi: 10.1111/j.1471-4159.
  21. Mabe H, Blomqvist P, Siesjö BK. Intracellular pH in the brain following transient ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1983 Mar;3(1):109-14. doi: 10.1038/jcbfm.
  22. Sato R, Koumi S. Modulation of the delayed rectifier potassium channel gating in guinea-pig ventricular myocytes by intracellular acidification, *Journal of Nippon Medical School*, 1997; 64(1):71-73.
  23. Dynnik V.V., Kononov A.V., Sergeev A.I., Teplov I.Y., Tankanag A.V., Zinchenko V.P. To break or to brake neuronal network accelerated by ammonium ions? // *PLoS ONE.* 2015. V. 10. Article № e0134145
  24. Kelly T, Rose CR. Ammonium influx pathways into astrocytes and neurones of hippocampal slices. *J. Neurochem.* 2010; 115(2): 1123-1136.
  25. Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-Supplemental neurobasal medium, a new serum free medium combination. // *J Neurosci Res.*, 1993; 35(2):567–576.
  26. Connors SP, Gill EW, Terrar DA. Actions and mechanisms of action of novel analogues of sotalol on guinea-pig and rabbit ventricular cells. *Br J Pharmacol*, 1992, 106(4): 958-965
  27. Liu PW, Bean BP. Kv2 channel regulation of action potential repolarization and firing patterns in superior cervical ganglion neurons and hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci.* 2014; 34(14):4991-5002.
  28. Ulbricht W. Sodium Channel Inactivation: Molecular Determinants and Modulation. *Physiological Reviews.* 2005; 85(4): 1271–1301
  29. Karim N, Dawod G, Henkel ND, Sheikh AA. Risk Factors Associated With Hyperammonemia Following Unprovoked Convulsive Seizures. *Cureus.* 2020 Jun 8;12(6):e8504.
  30. Joshi S, Kapur J. Status epilepticus: Updates on mechanisms and treatments. *Epilepsia Open.* 2025 Sep 16. doi: 10.1002/epi4.70146.

**Abstract.**

**Sergeev A.I.**

**Regulation of neuronal hyperactivity by the delayed rectifier potassium current blocker AM-92016 in rat hippocampal cell culture**

*Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences*

Neuronal hyperexcitation is often observed in pathologies associated with disruption of their calcium homeostasis (hyperammonemia, epilepsy, stroke, neurodegenerative diseases, etc.). This alters numerous biochemical processes in the cell and often leads to its apoptosis. To address this issue, a strategy of normalizing calcium homeostasis by manipulating ionic currents (including with blockers) is often used.

The aim of the study: To determine whether suppression of the delayed rectifier potassium current can eliminate calcium dyshomeostasis caused by neuronal hyperactivation.

Materials and Methods: Intravital fluorescence confocal microscopy of neuroglial cultures.

Results. AM-92016 (3  $\mu\text{M}$ ), a blocker of the intracellular pH-dependent delayed-rectifier potassium current, was shown to completely neutralize intracellular calcium fluctuations induced by 8 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (a model of neuronal hyperactivity). However, the increase in basal calcium levels was not suppressed by AM-92016. Furthermore, AM-92016 (15  $\mu\text{M}$ ), administered prior to  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (8 mM), completely abolished the hyperactive state. It is worth noting that AM-92016, even at significantly higher concentrations (10  $\mu\text{M}$ ), did not affect the frequency of spontaneous intracellular calcium oscillations and had little effect on their amplitude. This, compared with the effect of AM-92016 in the presence of 8 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , indicates the influence of hyperactivity on the studied currents.

Conclusion. These results justify further investigation of slow rectifier potassium current-associated channels as a putative therapeutic target in hyperammonemia and other neuronal hyperactivity.

**Keywords:** «delayed rectifier potassium current»; «hyperactivity of neurons»; «hyperammonemia»; « $[\text{pH}]_i$ -dependent ion channels»; « $[\text{Ca}^{2+}]_i$ »; «glutamate toxicity».

**Сведения об авторах:** Сергеев Александр Игоревич – к.б.н., с.н.с., Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук (ИБК РАН), e-mail: walterwox@yandex.ru.